



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation des gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS chez Brucella SP

Piret, Jean-Pascal

Award date:
1998

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTÉRISATION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA
BIOSYNTHÈSE DU LPS CHEZ *BRUCELLA* SP.**

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

Jean-Pascal PIRET

Juin 1998

UNIVERSITÉ DE BRUXELLES
Lib. N. D. P.
FACULTÉ DE BIOMÉDECINE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE
2 JUIN 1998

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.41.11 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: Joëlle.Jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Caractérisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du LPS chez *Brucella* sp

PIRET Jean-Pascal

Résumé

Récemment, sept gènes du cluster *rfb* impliqué dans la biosynthèse du LPS de la bactérie gram négative *Brucella* ont été clonés et séquencés. Dans ce mémoire, nous étudions la fonction de deux de ces gènes (*abc1* et *abc2*). Sur base de similarité de séquences protéiques, les protéines ABC1 et ABC2 constitueraient la partie transmembranaire et la partie liant l'ATP d'un ABC transporteur. Afin de montrer que cet ABC transporteur intervient dans le transfert de la chaîne O vers le périplasme, nous avons créé, par "gene replacement", des mutants de ces deux gènes chez *Brucella melitensis* 16M. La copie des gènes ABC1 et ABC2 délétée par un marqueur de résistance à la kanamycine a été transférée dans *B. melitensis* 16M. Les copies sauvages de ces gènes ont été remplacées par la copie mutée suite à un double événement de recombinaison. Le phénotype des mutants a été analysé par deux techniques complémentaires: la coloration au cristal violet et l'utilisation d'anticorps monoclonaux en western blotting. L'analyse du phénotype des mutants par coloration sur colonie montre qu'ils sont « rough ». De plus, des anticorps monoclonaux anti-chaîne O mettent en évidence la présence de chaîne O dans un lysat des mutants. Nous en concluons que la délétion des gènes *abc12* empêche l'exportation de la chaîne O en surface mais pas sa synthèse.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1998

Promoteur: J.-J. Letesson

REMERCIEMENTS

Je tiens avant toute chose à remercier du fond du coeur mes parents qui m'ont permis de poursuivre des études. Par leur soutien perpétuel, ils ont su me réconforter dans les moments les plus critiques de ces quatre longues années, me soutenir quand le moral était « au ras des pâquerettes », me féliciter le moment venu... J'adresserai un remerciement tout particulier à ma maman qui s'est dévouée pour corriger l'orthographe du chapitre « introduction » de ce mémoire.

Je remercie également Mr Letesson pour m'avoir accepté dans son laboratoire mais aussi pour sa rigueur professionnelle qui, bien que parfois un peu difficile à accepter, m'a appris à mordre sur ma « chique » et à être plus rigoureux.

Fabrice, je voudrais te remercier le plus chaleureusement possible pour ton dévouement, ta gentillesse malgré parfois de bêtes questions de ma part (« mais j't'l'ai déjà dit Jean-Pascal ! Tu t'fous d'qui ? »), ton sens professionnel, tes encouragements continuels même quand la cause me semblait totalement perdue (« on l'aura ce mutant, tu verras ») tes conseils en informatique (c'est un grand mot je sais!) qui furent une corne d'abondance pour le pauvre néophyte que je suis, ne connaissant jusque là que le maniement des huit boutons de la playstation. Encore une fois merci pour tout.

Je tiens à remercier également Bernard pour m'avoir encouragé pendant toute la durée du mémoire en me rappelant régulièrement de me dépêcher à obtenir des résultats probants pour offrir la tarte (« et alors JPP, à quand la tarte? »). Merci aussi à Zette, Ayman, Fabrice ainsi que Bernard de m'avoir accueilli dans leur bureau et de m'avoir permis de squatter le coin ordinateur notamment lors du dernier mois. Merci à toi Bernard de m'avoir accompagné et aidé lors de l'ultime nuit.

Je voudrais également témoigner ma gratitude à toutes les personnes qui se sont spontanément proposées pour nous venir en aide lors des dernières heures de stress; je pense ici à Zette (merci pour les plasmides) à Rose-May, Calou, David, dj- π , Kataline, Christophe et ceux que j'oublie bien involontairement.

Un tout grand merci à Anne qui, malgré son emploi du temps chargé, a su me consacrer bien plus que quelques minutes pour essayer de venir à bout de ces « résultats » récalcitrants.

Merci à dj- π de nous avoir intégré à l'équipe de mini-foot et pour avoir joué le relais entre nous et le mondial. Merci aussi pour son aide à la mise en page de ce mémoire.

Merci à tous les autres membre du labo pour leur accueil chaleureux, pour leur enthousiasme, leur gaieté, leur bonne humeur et leurs encouragements.

Je m'en voudrais à ce stade, de ne pas remercier mon compagnon de labeur et de guindaille qui a su me supporter quatre années durant; quatre années au cours desquelles tu as su me remonter le moral quand il était au plus bas (comme en deuxième candi) mais également partager mes joies et mes guindailles.

Merci à mes grands-parents, ma grand-tante pour leurs innombrables prières, mais aussi à ma marraine, mon parrain, mon frère et mes soeurs.

Merci aussi à Philippe, Benoît et Eric pour avoir su me faire oublier les cours et le stress, les week-end et pendant des grandes vacances inoubliables.

Enfin, je voudrais remercier Anne pour tout ce qu'elle m'apporte et pour l'amour qu'elle me donne.

LISTE DES ABREVIATIONS

- aa: acide aminé
ABC: ATP binding cassette
Ac: anticorps
ADN: acide désoxyribonucléique
Ag: antigène
Amp^R: résistant à l'ampicilline
APS: ammonium peroxyde sulfate
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATP: adenosine triphosphate
bp: paire de bases
BSA: bovine serum albumine
CL: cardioline
Cld: O-chain length determinant
diaminoglucose: 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose:
DNP: 2,4 dinitrophénol
Δlac: opéron lactose
EAC: antigène entérobactérien commun
EDTA: éthylènedinitrotétraacétate
galE: UDP-galactose-4-épimérase
GAM: goat anti-mouse
GlcNac: N-acetylglucosamine
glucosamine: 2-amino-2-deoxy-D-glucose
Il: interleukine
kdo: acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique
LBP: LPS binding protein
LPS: lipopolysaccharide
N-formyl-perosamine: 4,6 dideoxy-4-formamido-D-mannopyranose
ManNac: N-acetyl-mannosamine
MCS: site multiple de clonage
MurNac N-acetylmuramique
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
NMP: nucléotide monophosphate
O.N.: overnight
ORF: open reading frame
Nal^R: résistant à l'acide nalidixique
PC: phosphatidylcholine
PCR: polymérase chain reaction
PE: phosphatidyléthanolamine
PG: phosphatidylglycérol
PMP: pyridoxamine-5'-monophosphate
quinovosamine: 2 amino-2,6-dideoxy-D-glucose
RBS: ribosome binding site
PMF: force proton motrice
Rol: regulator of O-chain length
rpm: round per minute
SDS: sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE: gel d'électrophorèse de polyacrylamide avec SDS
Sp^R: résistant à la spectinomycine
Sm^R: résistant à la streptomycine
TAE: tampon tris acétate EDTA
TBS: tris buffer saline
Temed: N,N,N',N'tétraméthyl-éthylène-diamine
Tm: température de fusion ou "melting"
Tet^R: résistant à la tétracycline
TNF-α: Tumor Necrosis Factor α
Tris: tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
UV: ultra-violet

Table des Matières

Introduction.....	Erreur! Signet non défini.
A) Introduction.....	3
B) Description de la membrane externe des gram-.....	4
B1 Les phospholipides.....	4
B2 Les protéines de la membrane externe.....	4
1) Les Lipoprotéines.....	5
2) Les porines.....	5
3) Les protéines spécifiques de canaux.....	5
B3 Le lipopolysaccharide (LPS).....	6
1) Le lipide A.....	6
2) Le core (ou noyau).....	7
3) L'antigène O (ou chaîne O).....	7
3.a) Organisation du cluster rfb et rôles des différents gènes dans la biosynthèse de l'Antigène O.....	8
3.a.1) Généralités.....	8
3.a.2) Exemples de <i>S. typhimurium</i> et d' <i>E. coli</i> K-12.....	8
3.b) Synthèse des unités O.....	9
3.b1) Synthèse dépendante de RfbP.....	9
i) Synthèse du dTDP-rhamnose.....	10
ii) Synthèse du GDP-mannose.....	11
iii) Synthèse des dideoxyhexoses.....	11
3.b2) Synthèse dépendante de Rfe.....	12
3.c) Polymérisation des unités O.....	14
3.c1) polymérisation par élongation à l'extrémité réductrice (Polymérisation dépendante de Rfc).....	15
3.c2) polymérisation par croissance à l'extrémité non réductrice (Polymérisation indépendante de Rfc).....	17
3.c2.1 Les ABC transporteurs.....	18
3.c3 Nouvelle voie de synthèse de l'antigène O.....	20
3.d) Transfert du complexe lipide A-core dans le périplasme.....	20
3.e) Exportation du LPS.....	20
C) La bactérie <i>Brucella</i>	22
1 La brucellose.....	22
2 <i>Brucella</i>	23
3 Pathogénicité.....	23
4 <i>Brucella melitensis</i>	24
5 Caractéristiques génétiques de <i>Brucella</i>	24
6 La membrane externe.....	25
6.1 LPS.....	26
a) Le lipide A.....	26
b) Le core (noyau).....	26
c) L'antigène O.....	26
But du mémoire.....	28
Résultats et discussion.....	29
A. Détermination de la fonction des gènes.....	30
A1. Caractérisation d'ABC1.....	30
A2. Caractérisation d'ABC2.....	30
A3. Conclusions.....	31
B. Construction de mutants de <i>Brucella melitensis</i> par « gene replacement ».....	32
B1. Principe.....	32
B2 Choix du vecteur et de la cassette de résistance.....	32
B3. Création de la copie délétée du gène cible par PCR.....	33

B3.1 Amplification séparée des trois fragments (Kan3 et les régions 5' et 3' des gènes <i>abc1</i> et <i>abc2</i>)	34
B3.2 Construction en une seule étape de la copie délétée du gène cible	34
B3.3 Construction en deux étapes de la copie délétée du gène cible	35
B3.4 Résumé	36
B4. Création de la copie du gène cible par restriction-ligation	36
B4.1 Construction du plasmide <i>pabc12</i>	37
B4.2 Délétion des ORFs <i>abc1</i> et <i>abc2</i> par introduction d'un gène de résistance à la kanamycine	37
B4.2.1 Excision des gènes <i>abc1</i> et <i>abc2</i> par restriction <i>NdeI-NruI</i>	37
B4.2.2 Excision des gènes <i>abc1</i> et <i>abc2</i> par restriction <i>EcoRV-NruI</i>	38
B4.2.3 Vérification des constructions par séquençage	39
B.5 Obtention de mutants ABC12 de <i>Brucella melitensis</i> par « gene replacement »	40
B.6 Analyse du phénotype des doubles recombinants	40
B.6.1 Coloration des colonies au crystal violet	40
B.6.2 Analyse par Western blotting	41
Conclusions et Perspectives	42
Matériels & Méthodes	48
A. Souches bactériennes:	49
A. 1. <i>E.coli</i> XL1-blue.....	49
A. 2. <i>E. coli</i> DH5 α	49
A. 3. <i>E. coli</i> S17-1 λ pir.....	49
A. 4. <i>Brucella</i> sp.	49
B. Plasmides utilisés	50
B. 1. Le pKS oriT	50
B. 2. pBBR1mcs4.....	50
B. 3. pGEM5-17.....	50
B. 4. B.4.pGEM-T.....	50
B. 5. pUC4K.....	50
B. 6. pUC18K2.....	51
C. Milieux de culture	51
C. 1. milieu Luria Bertani (LB)	51
C. 2. milieu solide (LB agar).....	51
C. 3. Milieu TSAYE.....	51
C. 4. Milieu 2-Y-T.....	51
C. 5. Les antibiotiques	51
D. Transformation bactérienne	52
D. 1. Principe	52
D. 2. protocole	52
D. 2.1. préparation d' <i>E. coli</i> compétentes	52
D. 2.2. Transformation proprement dite	53
D. 2.3. Témoins de transformation.....	53
E. Extraction de l'ADN plasmidique	53
E. 1. Minipréparation d'ADN plasmidique (miniprep)	54
E. 1.1. Principe.....	54
E. 1.2. Solutions, tampons & matériel.....	54
E. 1.3. Protocole.....	54
E. 2. Midipréparation d'ADN plasmidique (midiprep)	55
E. 2.1. Principe	55
E. 2.2. Solutions, tampons & matériel.....	55
E. 2.3. Protocole.....	56
F. Restriction de l'ADN.....	57
F. 1. Protocole	57
G. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	57
G. 1. Solutions, tampons & matériels.....	58
G. 2. Protocole.....	58
H. Extraction d'ADN sur gel d'agarose.....	59

H. 1. Protocole.....	59
I. Réaction de ligation	60
I. 1. Protocole.....	60
J. Amplification d'ADN par « polymerase chain reaction » (PCR)	60
J. 1. Protocole.....	61
J. 2. Solutions, tampons & matériels.....	61
J. 3. Protocole de purification.....	62
K. Conjugaison	62
K. 1. Bactéries et plasmides employés.....	63
K. 2. Les témoins de conjugaison	63
K. 3. Protocole.....	63
K. 3.1. Préparation des cultures liquides.	63
K. 3.2. La conjugaison s.s.	64
L. Coloration au cristal violet.....	64
M. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.	65
M. 1. Principe.....	65
M. 2. Solutions, tampons & matériel.....	65
M. 3. Protocole.	66
N. Western blot.	67
N. 1. Principe.	67
N. 2. Electrophorèse SDS-PAGE.	67
N. 3. Electrotransfert sur nitrocellulose.....	67
N. 4. Détection & révélation immunologique.	67
N. 5. Solutions, tampons & matériel.....	68
N. 6. Protocole.....	69
N. 6.1. Electrotransfert.	69
N. 6.2. Immunodétection des protéines d'intérêt.	69
O. Séquençage non radioactif à lecture automatique.....	70
<u>O. 1. Principe.</u>	70
<u>O. 2. Solutions, tampons et matériel.</u>	70
<u>O. 3. Protocole.</u>	70
O. 3.1. Préparation du mélange de réaction.	71
O. 3.2. Réaction PCR.	71
O. 3.3. Purification des produits d'extension.	71

Introduction

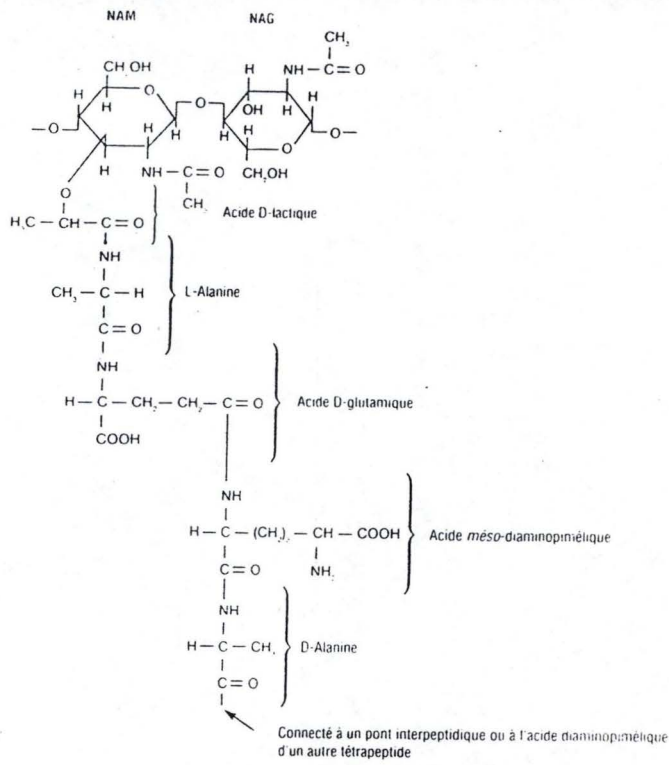


Fig 1 : Composition des sous-unités du peptidoglycane d'*E. coli*. NAM est l'acide N-acétylmuramique, NAG est la N-acétylglucosamine(Prescott et al., 1993).

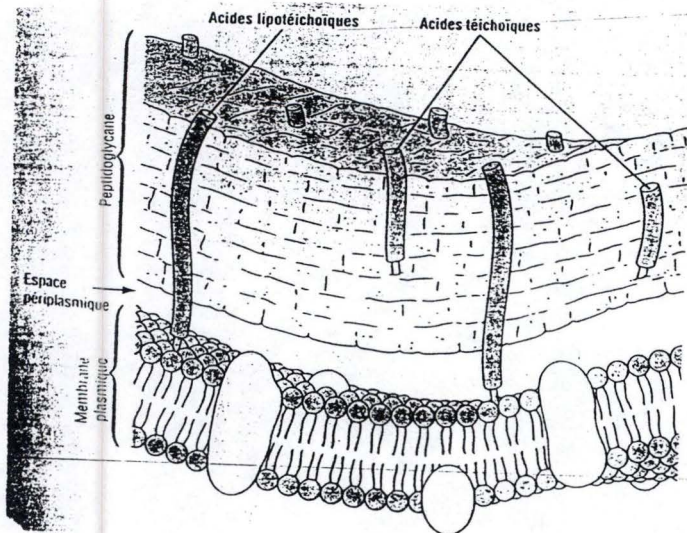


Fig 2 : Structure de la paroi des gram+(Prescott et al., 1993).

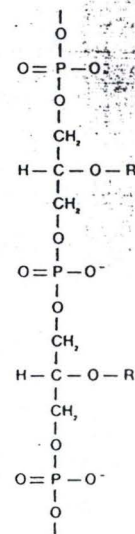


Fig 3 : Structure d'un acide teichoïque. R peut être de la D-alanine, du glucose ou d'autres molécules(Prescott et al., 1993).

A) Introduction

Les bactéries font partie, au même titre que les virus, beaucoup d'algues, de mycètes et les protozoaires de ce qu'on appelle les micro-organismes.

Ces micro-organismes, apportent de nombreux avantages à la société. Ils sont nécessaires à la production du pain, du fromage, de la bière, des antibiotiques, des vaccins, des vitamines... . Les micro-organismes sont également des acteurs indispensables de notre environnement et permettent au cycle du carbone, de l'azote, de l'oxygène et du soufre de fonctionner dans les milieux terrestres et aquatiques; ils sont à l'origine de toutes les chaînes alimentaires. Cependant, certains micro-organismes sont également des agents pathogènes pour l'homme. En ce qui concerne plus particulièrement les bactéries, de nombreuses maladies causées par ces organismes ont été décrites.

La coloration mise au point par le danois Gram a permis de classer les bactéries en deux grands groupes : les gram- et les gram+.

Suite à cette coloration les bactéries gram- apparaissent rouges alors que les gram+ sont bleues. Cette différence est due à la composition distincte de la paroi des gram- et des gram+.

La paroi des gram+ comprend une membrane plasmique composée d'une bicouche de phospholipides avec des protéines ancrées en mosaïque fluide. Cette membrane interne est entourée d'une épaisse couche de muréine ou peptidoglycan. Le peptidoglycan est un hétéropolymère constitué de sucres aminés et d'acide aminés. L'unité structurale de ce polymère est toujours formée par deux sucres aminés, le N acetylglucosamine (GlcNac) et l'acide N-acetylmuramique (MurNac) unis par des liens $\beta 1-4$ sur lesquels vient se greffer, au niveau du carboxyl du MurNac, un térapeptide synthétisé par voie enzymatique. La composition de ce térapeptide varie entre les groupes bactériens; néanmoins la séquence la plus fréquemment rencontrée est la suivante : L-alanine-acide-D-glutamique-acide-*méso*-diaminopimélique-D alanine (Fig. 1). Cette paroi contient également une grande quantité d'acides téichoïques, polymères de glycérol ou de ribitol reliés par des groupes phosphates (Fig. 2 et 3). Des acides aminés (aa), tels que la D-alanine ou des sucres comme le glucose sont attachés au glycérol ou au ribitol. Les acides téichoïques sont connectés soit au peptidoglycan lui-même, soit aux lipides de la membrane plasmique. Dans ce dernier cas, ils s'appellent des acides lipotéichoïques. Les acides téichoïques atteignent la surface du peptidoglycan et puisqu'ils sont chargés négativement, donnent à la paroi des cellules gram+ leur charge négative. Les fonctions de ces molécules sont encore inconnues, mais elles doivent être importantes pour maintenir la structure de la paroi. Il n'y a pas d'acides téichoïques chez les bactéries gram-.

La paroi des gram- (Fig. 4) comprend, en plus de ces deux éléments, une membrane externe. L'espace ainsi défini, entre la membrane externe et la membrane interne, où se trouve la couche

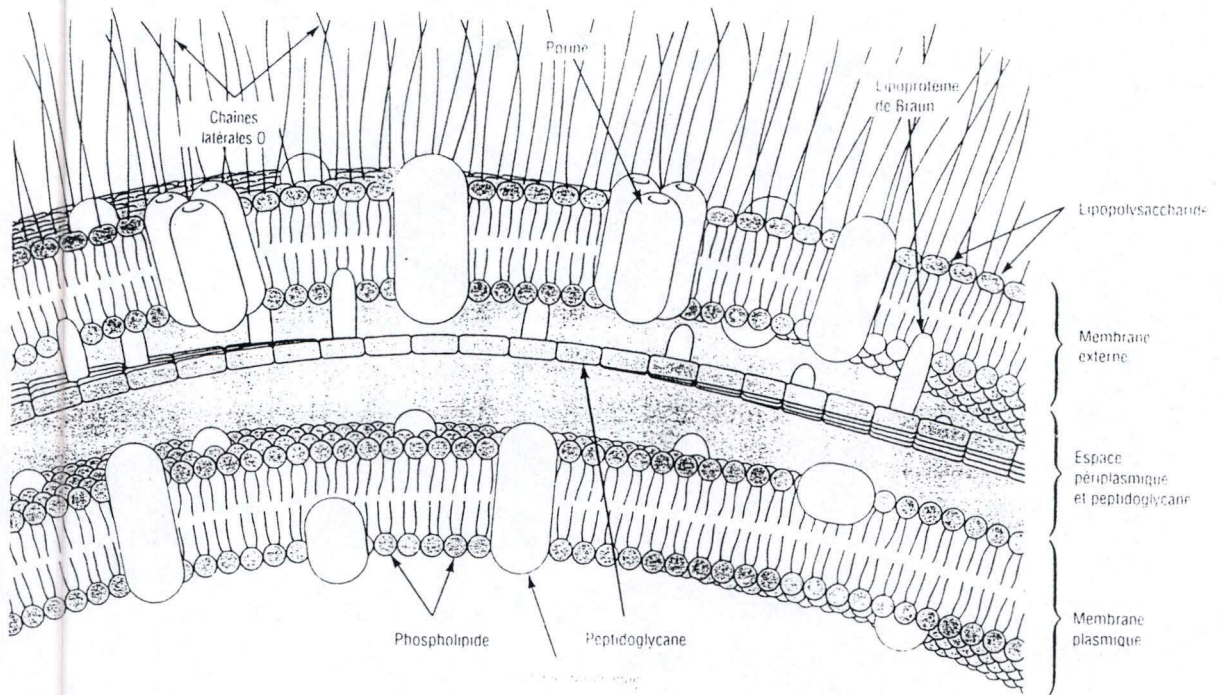


Fig 4 : Structure de la paroi des bactéries gram-(Prescott et al., 1993).

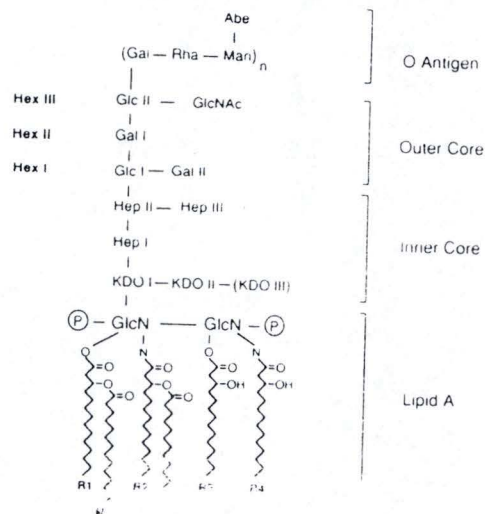


Fig 5 : Structure schématique du LPS de *S. typhimurium* LT2(Reeves, 1994). Les trois parties sont visibles : le LipideA, le core (inner core et outer core) et la chaîneO. Abréviations : R1,2,3,4 : acide R-3-hydroxymyristique; M : acide myristique; L : acide laurique.

de muréine (plus mince que celle trouvée chez les gram+) s'appelle le périplasme. Outre le peptidoglycan, on y trouve des protéines qui facilitent la nutrition ou inactivent des composés toxiques :

- * des protéines de liaison pour des acides aminés, des sucres, des ions...
- * des enzymes hydrolytiques (phosphatases, protéases, endonucléases)
- * des enzymes détoxifiant des antibiotiques (β -lactamase...)
- * des enzymes intervenant dans la synthèse du peptidoglycan, du LPS,...(Olivier, 1996).

B) Description de la membrane externe des gram-

La membrane externe des bactéries gram- est asymétrique : le feuillet interne est formé de phospholipides classiques, tandis que le composant majeur du feuillet externe est le LPS (lipopolysaccharide), molécule amphiphile(Hancock et al., 1994) formée de trois parties : le lipide A, constituant la partie hydrophobe et servant à ancrer le LPS dans la membrane externe, le core (ou noyau) et l'Ag O, formant les parties hydrophiles (fig 5). Outre le LPS et les phospholipides, la membrane externe contient également une population de protéines caractéristiques.

B1 Les phospholipides

La composition en phospholipides de la membrane externe est similaire à celle de la membrane interne avec néanmoins un enrichissement en phosphatidyléthanolamine. La membrane interne contient typiquement 70 à 80% de phosphatidyléthanolamine (PE), 15 à 25% en phosphatidylglycérol (PG) et 5 à 10% de cardiolipine (CL) (bien qu'il existe quelques variations dans les proportions des différents phospholipides suivant les souches et les conditions de croissance)(Kadner, 1996).

B2 Les protéines de la membrane externe

La membrane externe présente une composition protéique caractéristique qui est entièrement différente de celle de la membrane plasmique.

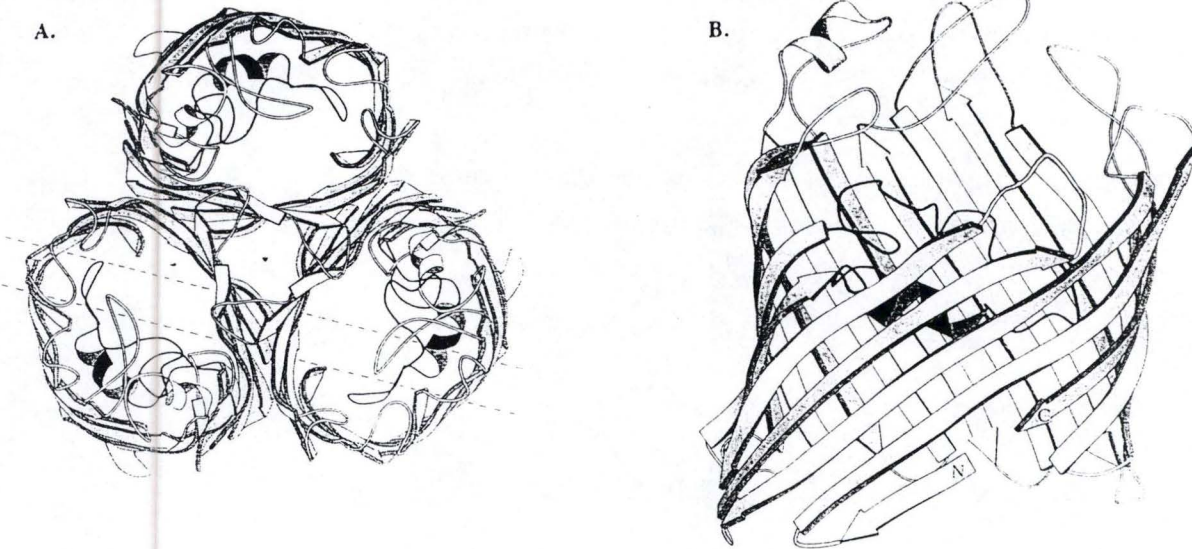


Fig 6 : Représentation tridimensionnelle d'une porine (Cowan and Schirmer, 1994).

- A. La porine trimérique.
B. Le tonneau β .

PROTEINES	RÔLE PHYSIOLOGIQUE
<u>Porines</u>	
OmpC	Forme de petits pores (1.1. nm)
OmpD	Présent seulement dans <i>S. typhimurium</i>
OmpF	Forme de plus larges pores (1.2 nm) que OmpC; réprimé par une température élevée et une pression osmotique plus haute
PhoE	Formé en réponse à une apport restreint de phosphate
<u>Canaux protéiques spécifiques</u>	
Lamb	Spécifique pour l'entrée par diffusion de maltose et maltodextrines; induit par maltose; site d'absorption des phages lambda
Tsc	Spécifique pour l'entrée par diffusion de nucléosides; site d'absorption du phage T6
TonA	Spécifique pour l'entrée par diffusion de ferrichrome; site d'absorption des phages T1 et T6

Tableau 1 : Canaux protéiques dans la membrane externe d'*E. coli* et *S. typhimurium*.

1) Les Lipoprotéines

La lipoprotéine muréique d'*E. coli* (lipoprotéine de Braun) est le premier exemple de protéine modifiée par une portion lipidique dans laquelle la structure du lien covalent avec le lipide fut élucidé (Wu, 1996). La lipoprotéine de Braun peut être prise comme exemple descriptif de la structure générique de ce type particulier de protéine. Cette lipoprotéine de 7200 Dalton présente une structure particulière; son extrémité N-terminale est substituée par des acides gras lui permettant de s'ancrer dans la membrane externe. Son extrémité C-terminale forme un lien covalent avec la couche de muréine (Nikaido, 1996). Des mutants dont le gène *lpp* (codant pour la lipoprotéine) est délété présentent une enveloppe cellulaire instable conduisant au relargage de vésicules de membrane externe et d'enzymes périplasmiques dans le milieu extérieur. Le rôle majeur de cette lipoprotéine de Braun est donc bien de stabiliser le complexe membrane externe-peptidoglycan.

2) Les porines

Les porines sont des protéines trimériques constituant des pores non-spécifiques permettant le passage de petites molécules hydrophiles à travers la membrane externe (tableau 1). Le monomère présente une structure particulière dite en tonneau β . Ce tonneau β est formé de seize brins β antiparallèles. A l'intérieur du canal, est présent un loop qui définit le diamètre du pore à travers lequel les molécules hydrophiles vont pouvoir passer (Fig.6).

3) Les protéines spécifiques de canaux

La membrane externe comprend également :

- * des protéines intervenant dans les processus de diffusion spécifique. Un exemple classique est la protéine LAM B (Tableau 1) qui permet le passage de maltose et de maltodextrines.

- * des protéines permettant le passage des transporteurs des ions ferriques (ces transporteurs sont trop gros pour passer par les porines).

- * des enzymes comme la phospholipase A1 et des protéases (Nikaido, 1996).

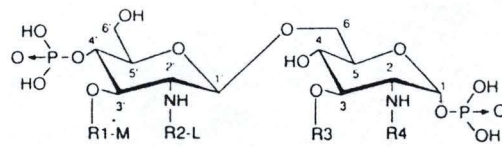


Fig 7 : Structure du Lipide A de *S. typhimurium* LT2(Reeves, 1994). R1,2,3,4 : acide R-3-hydroxymyristique; M : acide myristique; L : acide laurique.

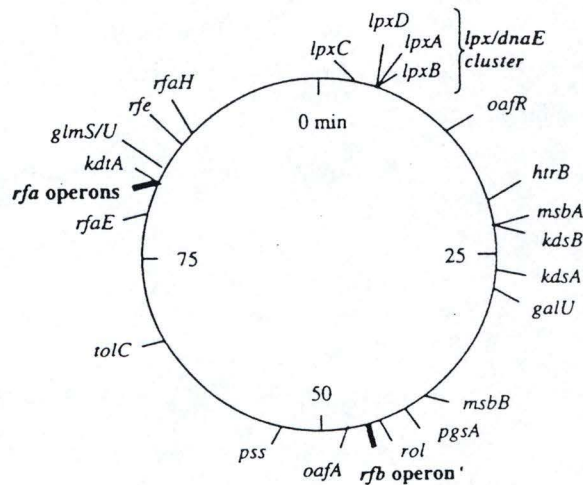


Fig 8 : Localisation des gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS chez *E. coli* K12 et *S. typhimurium* LT2(Raetz, 1996).

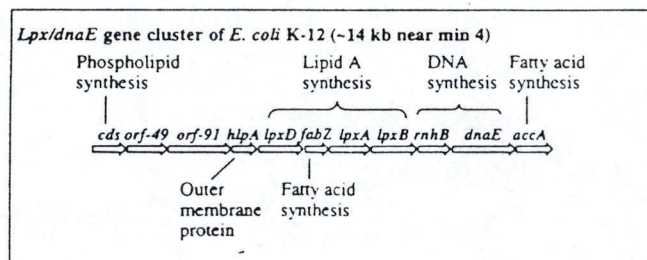


Fig 9 : Organisation et fonctions des gènes du cluster *lpx* d'*E. coli*.

B3 Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est le constituant majeur du feuillet externe de la membrane externe. Il forme une couche hydrophile rigide chargée négativement qui entoure la bactérie. Il est à l'origine de la faible perméabilité de la membrane externe aux composés hydrophobes (comparativement aux membranes plasmiques formées de phospholipides classiques)(Nikaido, 1996). Cette couche de LPS est stabilisée par des cations bivalents, notamment le Ca^{++} , qui neutralisent la répulsion électrostatique entre les molécules de LPS(Nikaido, 1996). C'est ainsi que le traitement de bactéries à l'EDTA (molécule chélatant les cations) déstabilise la couche de LPS(Nikaido, 1996).

Le LPS est constitué de trois parties (Fig.5) : le lipide A, le core et la chaîne O. Les bactéries qui possèdent un LPS complet sont appelées "smooth", celles qui sont dépourvues de chaîne O sont dites "rough". Cette distinction se base sur l'aspect des colonies sur milieux solides : les premières ont un phénotype lisse tandis que les secondes apparaissent rugueuses.

1) Le lipide A

Le lipide A est la portion qui sert à ancrer le LPS dans la membrane externe.

Il constitue également ce qu'on appelle l'endotoxine et est responsable du choc endotoxinique pouvant mener à la mort en quelques heures.

La structure du lipide A consiste en un disaccharide de glucosamines lié en β 1-6 et phosphorylé en position 1 et 4'[Rietschel, 1984 #1338] (le phosphate en position 1 est essentiel pour la toxicité du LPS). Il est acylé par quatre β -hydroxymyristoyl en position 2,3,2',3'[Takayama, 1983 #1343][Takayama, 1983 #1342][Rietschel, 1983 #1341][Rietschel, 1984 #1338][Oureshi, 1983 #1340][Imoto, 1983 #1339]. Sur les deux β -hydroxymyristoyls en position 2' et 3', sont ajoutés un résidu laurate (12 C) et un myristate (14 C) estérifiés à leur extrémité non réductrice. Les résidus KDO du core viennent se fixer sur le lipide A en position 6' (Fig. 7).

Les principaux gènes intervenant dans la synthèse du lipide A sont regroupés dans un cluster, le cluster *lpx/dna E* localisé à la minute 4 chez *E.coli* (Fig. 8). Le cluster *lpx/dna* d'*E.coli* K12 est représenté à la figure 9.

2) Le core (ou noyau)

Le core du LPS est la partie intermédiaire de la molécule faisant la jonction entre le lipide A et l'antigène O. On distingue généralement deux parties au core : l'inner core, partie la plus proche du lipide A et l'outer core, la partie la plus éloignée du lipide A (Fig. 10).

L'inner core, ainsi que le lipide A, sont très conservés entre les espèces tandis que l'outer core et l'antigène O sont beaucoup plus hétérogènes d'une espèce à l'autre (Proctor et al., 1995).

Les gènes intervenant dans l'assemblage du core font partie du cluster *rfa* (Fig. 8 et 11). La région *rfa* d'*E. coli* comprend 14 gènes organisés en deux opérons majeurs qui sont transcrits en sens opposé. Certains gènes comme *rfa* -Q, -S, -Y, -Z, et -K (chez *E. coli* et *Salmonella*) ne se sont pas encore vus attribuer un rôle jusqu'à maintenant.

3) L'antigène O (ou chaîne O)

La chaîne O correspond la partie externe du LPS; c'est également la partie la plus variable. Elle constitue la région immuno-dominante du LPS. C'est pourquoi elle est aussi appelée Antigène O. L'Antigène O est un facteur de virulence pour la bactérie et est formé d'une répétition d'unités oligosaccharidiques, appelées unités O et formées de trois à cinq sucres; le nombre et la composition des ces unités O varient d'une espèce à l'autre (Al-Hendy, 1992) voir Fig. 12.

Au sein même des espèces, la structure chimique de la chaîne O peut être aussi à la base d'une classification sérologique comme chez les *Entérobacteriaceae* (Al-Hendy, 1992). En fait, cette diversité structurelle de l'antigène O est due à des variations dans la composition en sucre ou dans la séquence des sucres constitutifs des unités répétitives et à leur liaisons, ainsi que dans la substitution des monomères avec soit des résidus sucrés soit non sucrés (Whitfield, 1995). Ce polymorphisme antigénique se retrouve au niveau génétique : la taille du cluster contenant les gènes de synthèse de l'Ag O, appelé *rfb*, reflète la taille et la complexité de l'unité O. Les différences observées dans les clusters *rfb* entre les sérovars traduisent les différences dans la composition des unités O.

De plus, plusieurs gènes qui font partie de la région *rfb* chez certaines souches sont localisés ailleurs sur le chromosome ou sur un élément extrachromosomique chez d'autres (Klena and Schnaitman, 1993). C'est notamment le cas pour le gène *rfc* (Ag O polymérase) faisant partie du cluster *rfb* chez *E. coli* K-12 mais pas chez *S. typhimurium*.

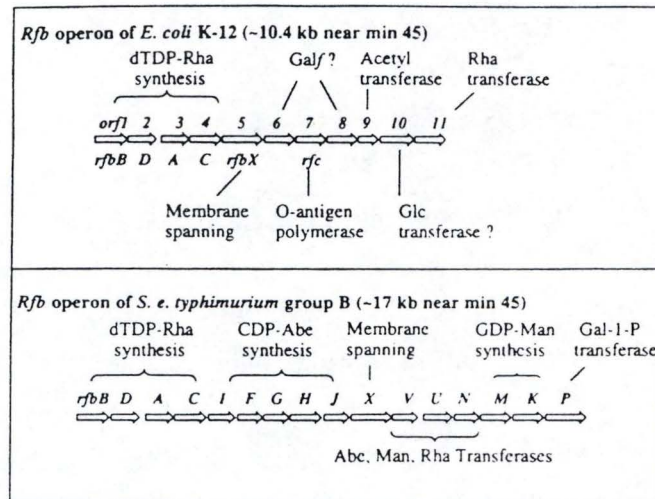


Fig 13 : Organisation et fonction des gènes de l'opéron rfb chez *E. coli* K12 , et chez *S. typhimurium* groupe B (Raetz, 1996).

3.a) Organisation du cluster *rfb* et rôles des différents gènes dans la biosynthèse de l'Antigène O

3.a.1) Généralités

Le cluster *rfb* regroupe les gènes qui codent pour les enzymes intervenant dans la synthèse des sucres spécifiques de l'unité O ainsi que pour des glycosyltransférases. D'autres gènes requis pour la biosynthèse des sucres également utilisés à d'autres fins que celle de la "construction" de l'Ag O, comme par exemple le gène de l'UDP-galactose-4-épimérase (*gal E*) et de la phosphomannose isomérase sont situés ailleurs sur le chromosome (Nikaido, 1996).

3.a.2) Exemples de *S. typhimurium* et d'*E. coli* K-12

Les clusters *rfb* d'*E. coli* K12 et de *Salmonella typhimurium* groupe B sont représentés à la Fig. 13.

Chez *Salmonella*, le cluster *rfb* regroupe les gènes intervenant dans la synthèse des sucres spécifiques de l'unité O : les gènes codant pour la synthèse du dTDP-rhamnose, le CDP-abequose, le GDP-mannose ainsi que pour les glycosyltransférases.

Chez *Salmonella* et *E. coli*, présentant du rhamnose dans leur chaîne O, les enzymes intervenant dans la production de dTDP-rhamnose sont encodées par les quatre premières ORFs de l'opérons *rfb* (Fig. 13). D'ailleurs, les séquences de ces quatre gènes sont fortement conservées (Reeves, 1993) (Reeves, 1994) (Stevenson et al., 1994) (Schnaitman and Klena, 1993).

Juste après ces gènes, on trouve, chez *S. typhimurium* groupe B, un deuxième ensemble regroupant les gènes *rfbI**FGHJ*. Ceux-ci encodent les enzymes intervenant dans la formation de 3,6-dideoxyhexoses. Ne produisant pas de 3,6-dideoxyhexoses, *E. coli* K12 ne possède pas de gènes liés à la production de ces sucres (Raetz, 1996). Le milieu du cluster *rfb* de *Salmonella* et d'*E. coli* K-12 contient une ORF *rfbX* qui code pour une protéine hydrophobe présentant 12 segments transmembranaires. Les séquences des gènes *rfbX* entre divers organismes, ne sont pas conservées. Néanmoins, le profil hydropathique des protéines codées par ces gènes est similaire. Bien que la fonction de *rfbX* soit jusqu'à présent inconnue (Jiang et al., 1991) (Reeves, 1993) (Schnaitman and Klena, 1993) (Stevenson et al., 1994); son profil d'hydropathie suggère un rôle dans le transport de l'Ag O vers le périplasme. Il a été également proposé que *rfbX* pourrait intervenir dans la ligation de l'Ag O sur le lipide A-core (Schnaitman

and Klena, 1993). Après *rfbX*, peut se trouver le gène de l'Ag O polymérase *rfc* comme c'est le cas chez *E. coli*.

Chez d'autres espèces, ce gène est localisé en dehors du cluster *rfb* comme chez *Salmonella* (Fig. 13). L'extrémité distale de l'opéron *rfb* de *Salmonella* et d'*E. coli* contient des gènes qui encodent des enzymes requises pour la formation de nucléotides « sucrés » comme par exemple le GDP-mannose (Fig. 13)(Stevenson et al., 1994)(Reeves, 1994); mais peut aussi coder pour des glycosyltransférases membranaires (abequose, mannose, rhamnose transférases) (Jiang et al., 1991) (Reeves, 1993) (Schnaitman and Klena, 1993) (Stevenson et al., 1994). Puisque les chaînes O varient considérablement en composition et configuration en oligosaccharides entre *E.coli* K12 et *S.typhimurium* LT2, ces gènes distaux sont comparativement variables(Raetz, 1996) (Fig. 13).

3.b) Synthèse des unités O

Les unités O ne sont pas transférées directement sur la molécule de LPS en "croissance". L'antigène O est synthétisé séparément du complexe lipide A-core sur un transporteur lipidique, l'undecaprenol phosphate (und-P) (ou bactoprénol-P), par les enzymes encodées par le cluster *rfb*. Ce transporteur lipidique, est un alcool polyisoprénol à 55 carbones (Whitfield, 1995)(Al-Hendy, 1992). L'antigène O est transféré et lié de façon covalente sur l'accepteur lipide A-core au niveau de la face périplasmique de la membrane plasmique. Cette ligation termine ainsi la synthèse de l'antigène O. Après cette étape, le LPS complet est transloqué jusqu'à la surface de la cellule par un mécanisme inconnu(Whitfield, 1995). Malgré la présence de précurseurs et d'intermédiaires identiques, Whitfield distingue deux mécanismes d'assemblage de la chaîne O sur base de la localisation des réactions de polymérisation et de la direction de croissance du polymère(Whitfield, 1995). On peut également diviser les bactéries entériques en deux classes suivant le gène qui initie la synthèse de l'antigène O. On distingue ainsi la classe RfbP-dépendante et la classe Rfe-dépendante.

3.b1) Synthèse dépendante de RfbP

Le mécanisme RfbP-dépendant prévaut pour les bactéries présentant une chaîne O hétéropolymérique (l'unité répétitive est constituée de quatre à cinq sucres et c'est la répétition, un grand nombre de fois de cette unité qui constitue l'antigène O).

RfbP est une galactosyl transférase qui catalyse le transfert réversible du galactose-1-P à partir du précurseur, l'uridine diphosphogalactose, sur l'und-P(Whitfield, 1995) lors de l'étape

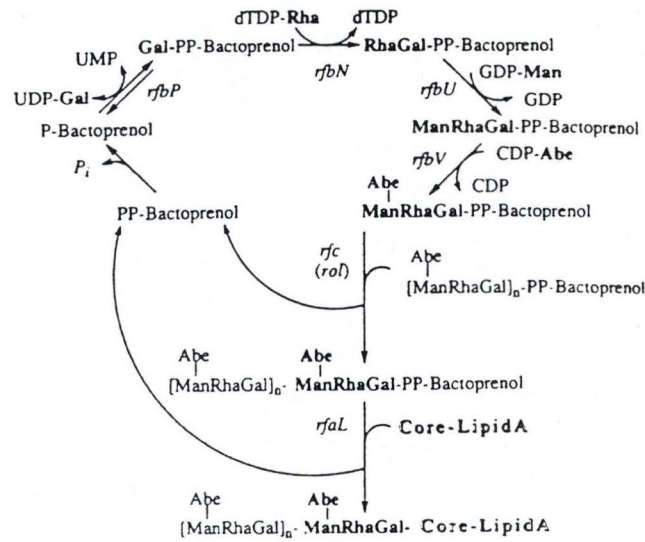


Fig 14 : Aperçu schématique de la synthèse de l'Ag O de *S. typhimurium* (Raetz, 1996). Abréviations : Gal, galactose; Rha, rhamnose; Man, Mannose; Abe, abeçose.

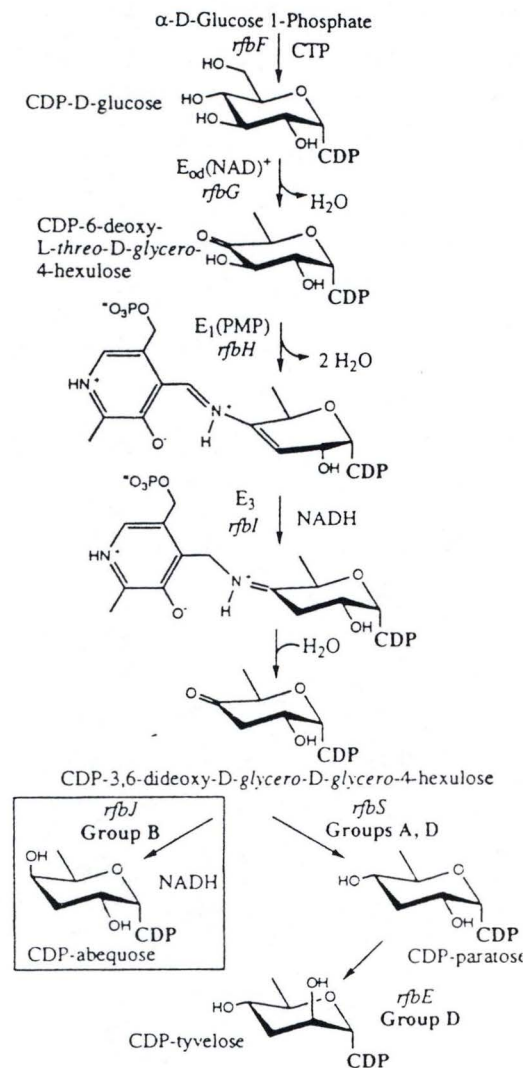


Fig 15 : Représentation de la synthèse enzymatique des 3,6 dideoxyhexoses (Raetz, 1996). E_{od}, oxydase; PMP, pyridoxamine 5'-monophosphate.

d'initiation de la synthèse de l'antigène O. RfbP interviendrait également dans l'exportation de l'Ag O (voir plus loin).

L'exemple pris en compte ici est celui de *S. typhimurium*.

La composition de l'unité O de *S. typhimurium* est la suivante : Abe-Man-Rha-Gal. Un schéma de la synthèse de l'unité O est représentée à la Fig. 14. La synthèse de l'antigène O commence par la fixation de galactose-1-P sur l'und-P (ou bactoprenol-P) par action de l'enzyme RfbP (Whitfield, 1995). Ensuite le bactoprenol pyrophosphate-galactose subit trois glycosylations catalysées par trois transférases encodées par les gènes *rfbN*, *U* et *V* (correspondant respectivement à une rhamnose transférase, une mannose transférase et une abequeuse transférase). Il y a ensuite transfert de la chaîne O naissante sur l'unité O nouvellement synthétisée par intervention de Rfc (Ag O polymérase). Pour terminer, la chaîne O complète est transférée sur le complexe lipide A-core grâce à l'Ag O ligase RfaL. Ces deux dernières étapes seront approfondies dans un chapitre ultérieur.

Dans cette cascade, seule RfbP est une protéine intégrale de membrane; les autres n'apparaissent pas être liées à la membrane plasmique.

A la figure 14, nous pouvons remarquer, la présence d'UDP-Galactose, de dTDP-rhamnose, de GDP-mannose ainsi que de dideoxyhexoses tel que le CDP-abequeuse. Tous ces sucres sont synthétisés séparément comme suit :

L'UDP-Gal est synthétisé par ce qu'on appelle des gènes de maintenance ou « house-keeping genes » soit à partir de galactose ou par épimérisation en c3 d'UDP-glucose. Les synthèses du mannose, rhamnose et des dideoxyhexoses sont réalisées par des protéines *rfb* et seule la synthèse du dideoxyhexose diverge quelque peu entre les différents groupes de *Salmonella enterica* (Fig. 15). Ces dideoxyhexoses sont hautement immunogènes et leur présence permet d'identifier sérologiquement les différents groupes de *S. enterica* (Verma et al., 1988).

i) Synthèse du dTDP-rhamnose

Quatre enzymes interviennent dans la synthèse du dTDP-rhamnose (Fig. 16) à partir d' α -D-glucose-1-phosphate.

Le gène *rfbA* code pour une pyrophosphatase qui active le glucose-1-P en dTDP-D-glucose.

La protéine RfbB est une déshydratase qui oxyde le dTDP-D-glucose en dTDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose.

La troisième enzyme qui intervient, RfbC (une épimérase)-(Schnaitman and Klena, 1993), convertit l'élément précédent en dTDP-6-deoxy-D-erythro-L-glycero-4-hexulose.

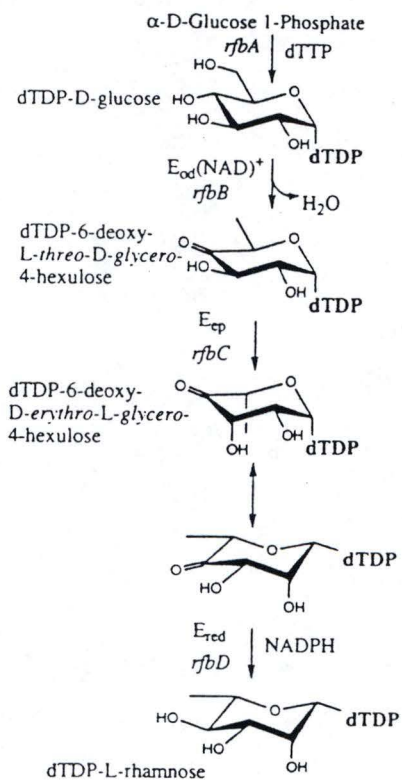


Fig 16 : Structure et synthèse du dTDP-L- rhamnose(Raetz, 1996). E_{od} , oxydase; E_{ep} , épimérase; E_{red} , réductase.

Pour terminer, l'enzyme RfbD, une déhydrogénase (Bastin and Reeves, 1995), transforme le sucre précédent en dTDP-L-rhamnose.

ii) Synthèse du GDP-mannose

La synthèse du GDP-mannose comprend trois étapes :

Premièrement, il y a transformation du fructose-6-P en mannose-6-P par la phosphomannose isomérase.

A partir du mannose-6-P, il y a formation de mannose-1-P par action de l'enzyme RfbK (phosphomannomutase) (Jayaratne et al., 1994).

Ensuite, l'enzyme RfbM (une GDP mannose pyrophosphorylase) (Jayaratne et al., 1994) active le mannose-1-P en GDP-mannose (Schnaitman and Klena, 1993) (Reeves, 1994).

La présence du GDP, comme de l'UDP pour le galactose et du dTDP chez le rhamnose permet d'adresser ces différents sucres à la machinerie enzymatique de synthèse de l'Ag O.

iii) Synthèse des dideoxyhexoses

La synthèse des dideoxyhexoses peut être divisée en deux parties : une première étape conduisant à la formation d'un intermédiaire commun à toutes les bactéries synthétisant des dideoxyhexoses, le CDP-3,6-dideoxy-D-glycero-D-glycero-4-hexulose, et une seconde spécifique du sucre formé. (Fig. 15).

A partir de α -D-glucose-1-P, il y a formation de CDP-D-glucose par action d'une pyrophosphorylase, RfbF.

Puis une oxydase, RfbG, faisant intervenir le NAD⁺ le convertit en CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose.

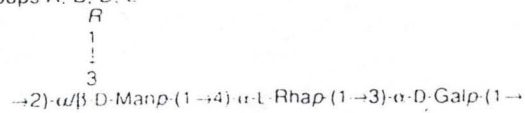
Ensuite une troisième enzyme intervient, RfbH, nécessitant la présence de pyridoxamine-5'-monophosphate (PMP). Ce dernier se lie au substrat pour permettre sa déhydratation.

Le complexe PMP-substrat subit finalement une réduction du C3 du sucre par RfbI.

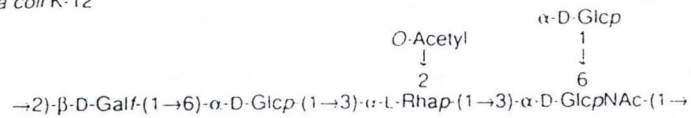
Cette cascade fournit l'intermédiaire CDP-3,6-dideoxy-D-glycero-D-glycero-4-hexulose à partir duquel les différents groupes vont synthétiser leur sucre spécifique. Pour le groupe B de *Salmonella enterica*, l'enzyme RfbJ le transforme en CDP-abequose en présence de NADH. Chez le groupe A, où le dideoxyhexulose utilisé est le paratose, c'est RfbS qui intervient pour modifier l'intermédiaire afin de donner le CDP-paratose. Le groupe D qui utilise aussi l'enzyme RfbS, présente une étape supplémentaire faisant intervenir RfbE au cours de laquelle le CDP-paratose est convertit en CDP-tyvelose.

(a)

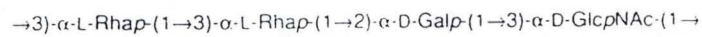
Salmonella enterica serogroups A, B, D, E



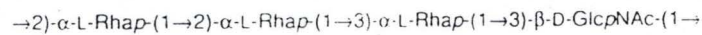
Escherichia coli K-12



Shigella dysenteriae type 1

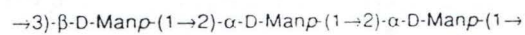


Shigella flexneri

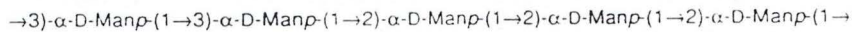


(b)

Escherichia coli O8 and *Klebsiella pneumoniae* O5



Escherichia coli O9 and *Klebsiella pneumoniae* O3



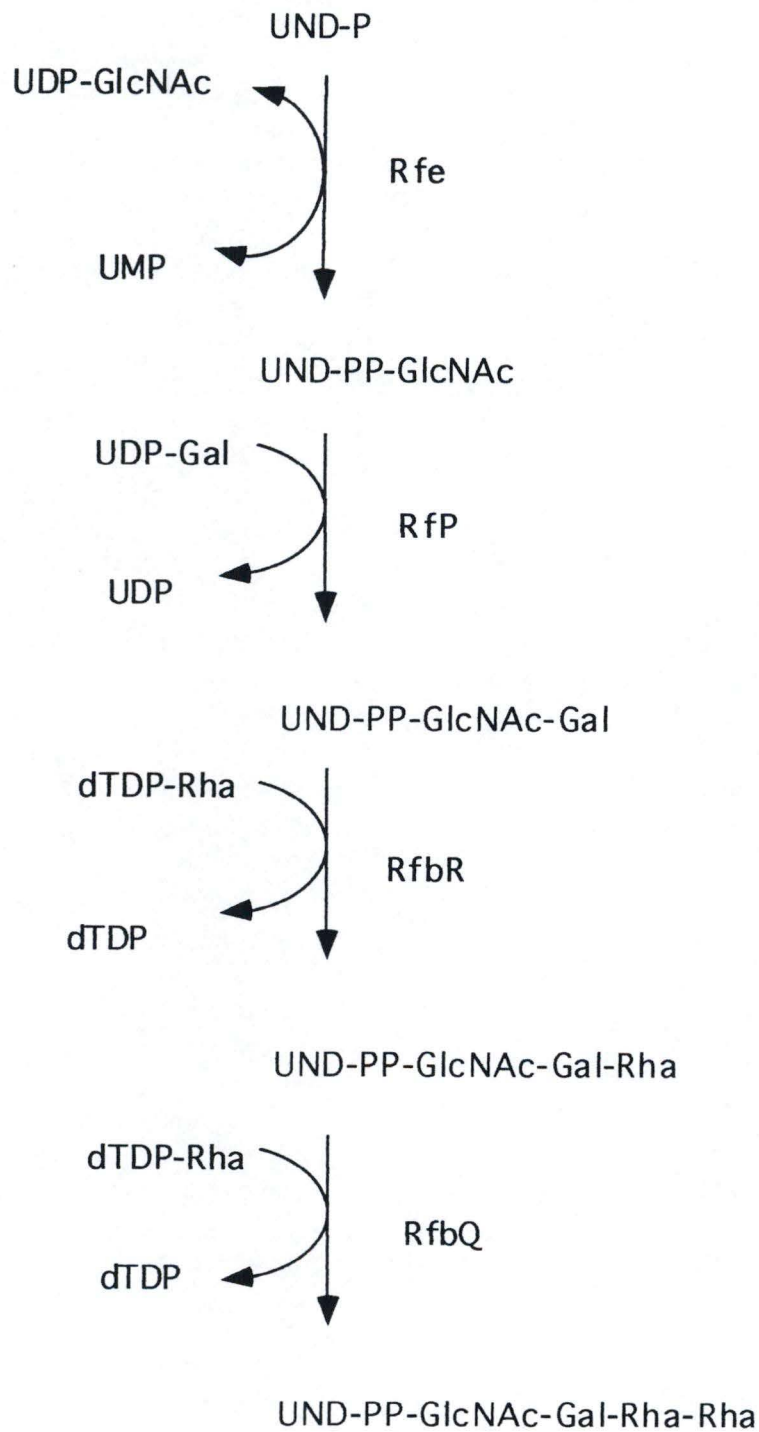
Klebsiella pneumoniae O1



Fig 17 : Structures d'Ag O (a) hétéropolymérique; (b) homopolymérique. R représente un résidu 3,6 dideoxyhexose(Whitfield, 1995).

3.b2) Synthèse dépendante de Rfe

Le gène *rfe* qui fait partie du cluster *rff* situé à 85 min chez *E.coli* code comme *rfbP*, pour une enzyme qui initie la synthèse des unités O. Rfe est une N-acetyl-glucosamine-1-P transférase. La protéine Rfe initie la synthèse des Ag O homopolymériques (c'est-à-dire dont l'unité O est formée d'un seul et même sucre répété tout au long de la chaîne O) comme ceux d'*E.coli* O9 et O8 et de *Klebsiella pneumoniae* O1 (Clarke and Whitfield, 1992). Dans ces trois cas, l'unité monomérique ne contient pas de GlcNAc, mais l'expérience a permis de montrer que l'und-PP-GlcNAc jouerait le rôle d'accepteur initial pour les mannoses (dans le cas d'*E.coli* O8 et O9) ou les résidus galactose (dans le cas de *Klebsiella pneumoniae* O1) sans faire partie de l'unité répétitive de l'antigène O (Rick et al., 1994). Elle intervient aussi dans le transfert de résidus GlcNAc-1-P trouvés dans les unités O de plusieurs sérotypes d'*E.coli*, chez *Shigella dysenteriae* type 1 (Klena and Schnaitman, 1993) et *Shigella flexneri* qui possèdent un Ag O hétéropolymérique (Fig. 17) (Yao and Valvano, 1994).



L'exemple qui suit concerne la synthèse d'unités O hétéropolymériques. La bactérie choisie est *Shigella dysenteriae* 1; l'unité O se compose de GlcNAc, Gal, Rham, Rham.

Lors de l'étape initiale catalysée par Rfe un, GlcNAc-1-P est transféré sur l'und-P pour former l'und-PP-GlcNAc(Rick et al., 1994)(Alexander and Valvano, 1994).

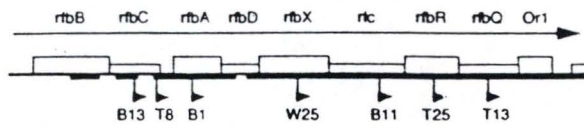


Fig 18 : Opéron *rfb* de *Shigella dysenteriae* 1 (Klena and Schnaitman, 1993).

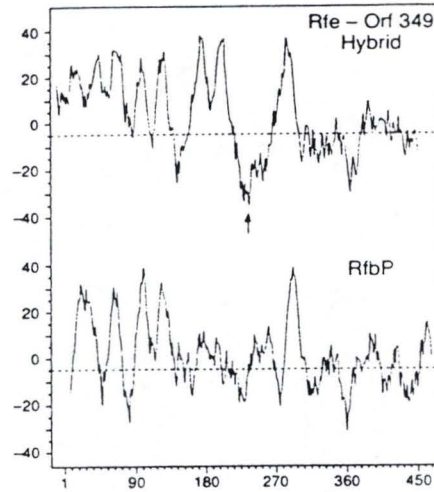


Fig 19 : Comparaison des profils d'hydropathie entre une protéine hybride constituée de la protéine Rfe (à gauche de la flèche) et de la protéine O349, et la protéine RfbP de *S. typhimurium* LT2 (Klena and Schnaitman, 1993).

(a)



(b)



Fig 20 : Polymérisation des unités O par croissance à l'extrémité réductrice (A), ou à l'extrémité non-réductrice (B) (Whitfield, 1995).

Ensuite la protéine RfbP, une galactosyl transférase, catalyse le transfert de galactose sur l'intermédiaire précédent à partir d'UDP-Gal pour donner de l'und-PP-GlcNAc-Gal. Les deux dernières étapes sont sous la dépendance des gènes *rfbR* et *rfbQ* qui codent respectivement pour la Rhamnose I et Rhamnose II transférase. On obtient ainsi finalement la séquence und-PP-GlcNAc-Gal-Rha-Rha. Cette unité répétitive pourra être polymérisée pour donner l'Ag O.

Seuls les deux gènes codant pour les rhamnose transférases se retrouvent à la fin de la région *rfb* de *S. dysenteriae* 1 (Fig. 18). Le gène *rfe* se trouve dans le cluster *rfe-rff* (situé à 85 min chez *E.coli*) (Daniels *et al.*, 1992) (Fig. 8). Le cluster *rfe-rff* comprenant 11 à 12 gènes et code pour les enzymes nécessaires à la construction de l'ECA composé d'unités répétitives formées de trois sucres et assemblé sur l'und-P à la manière de l'antigène O (Klena and Schnaitman, 1993). Le gène *rfp*, lui, se situe sur un plasmide de 9 kb présent en multiple copies chez les souches smooth de *S. dysenteriae* 1. Ce plasmide est requis pour la virulence et l'expression de l'Ag O (Hale *et al.*, 1984, Watanabe and Timmis, 1984).

Alors que RfbP est confiné à la synthèse de l'antigène O, Rfe est également requis pour la synthèse de polysaccharides de surface comme l'antigène T1 des espèces de *Salmonella* et de l'antigène entérobactérien commun (ECA). Les deux enzymes qui présentent une similitude fonctionnelle (Klena and Schnaitman, 1993) sont, bien que Rfe soit plus petite que RfbP, des homologues structuraux. En effet, les profils d'hydropathie entre les deux protéines sont semblables, si une portion de l'ORF suivant *rfe* dans le cluster *rfe-rff* (désigné O349 par Daniels *et al.*, 1992) est ajoutée à l'extrémité C-terminale de la protéine Rfe. La comparaison de RfbP et de l'hybride Rfe-O349 est montrée à la figure 19. Cet alignement suggère que RfbP pourrait être le résultat de la fusion de deux protéines ancestrales ressemblant à Rfe et O349 (Klena and Schnaitman, 1993).

3.c) Polymérisation des unités O

Withfield distingue deux types de mécanismes de polymérisation (Fig. 20) :

Le premier mécanisme est la polymérisation par élongation à l'extrémité réductrice qui prévaut chez les hétéropolymères. Les caractéristiques de ce premier mécanisme sont :

- 1) l'assemblage des unités O se réalise dans le périplasme.
- 2) la chaîne O est allongée par addition d'unités répétitives à l'extrémité réductrice du polymère en croissance.
- 3) ce mécanisme requiert les protéines RfbX, Rfc et Rol (ou Cld), toutes des protéines membranaires.

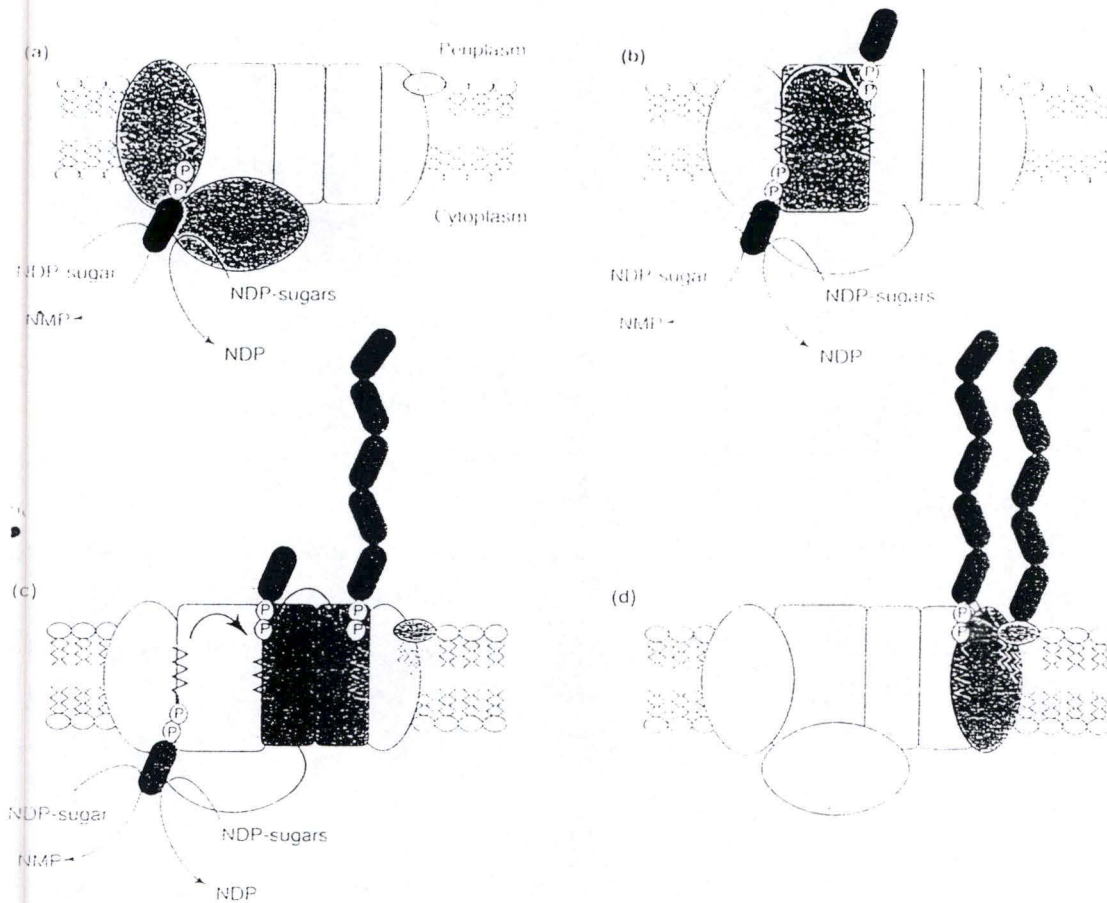


Fig 21 : Modèle de polymérisation de la chaîne O chez les bactéries présentant un LPS hétéropolymérique, par élongation à l'extrémité réductrice (dépendante de Rfc) (Whitfield, 1995).

Genes(s)	Probable function of gene products	Exemplar(s) and reference(s)
<i>rfbCAD</i>	Synthesis of TDP-rhamnose from glucose-1-phosphate	<i>Salmonella</i> (65) and <i>Shigella</i> (77) spp
<i>rfbKM</i>	Synthesis of GDP-mannose from mannose-6-phosphate	<i>Salmonella</i> spp (65)
<i>rfbFG[HI]</i>	Synthesis of CDP-4 keto-3,6 dideoxyglucose (common precursor of dideoxy sugars) from CDP-glucose	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbJ</i>	Synthesis of CDP-abequose from common precursor in <i>Salmonella</i> group B	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbS</i>	Synthesis of CDP-paratose from common precursor in <i>Salmonella</i> groups A and D	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbL</i>	Synthesis of CDP-xylose from CDP-paratose in <i>Salmonella</i> group D	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbP</i>	Initiates synthesis of O unit by addition of galactose-phosphate to ACL to form galactose-pyrophosphate-ACL; may be bifunctional and encode RfbT function involved in transfer of O unit to LPS core	<i>Salmonella</i> spp (65)
<i>rfe</i>	Initiates synthesis of O unit by addition of GlcNAc phosphate to ACL to form GlcNAc-pyrophosphate-ACL	<i>Shigella</i> spp (77)
<i>rfbN</i>	Synthesis of O unit, rhamnosyl transferase in groups A, B, D, and E-I of <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbQ</i>	Synthesis of O unit, rhamnosyl transferase I in <i>S. dysenteriae</i> 1	<i>Shigella</i> spp (77)
<i>rfbR</i>	Synthesis of O unit, rhamnosyl transferase II in <i>S. dysenteriae</i> 1	<i>Shigella</i> spp (77)
<i>rfbU</i>	Synthesis of O unit, mannosyl transferase in groups A, B, and D of <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfbV</i>	Synthesis of O unit, abequosyl transferase in groups B and D of <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp (139)
<i>rfp</i>	Synthesis of O unit, plasmid encoded galactosyltransferase in <i>S. dysenteriae</i> 1	<i>Shigella</i> spp (74)
<i>rfbX</i>	Assembly or transfer of O units, exact function unclear	<i>Salmonella</i> (139) and <i>Shigella</i> (77) spp
<i>rfe</i>	Polymerization of O units on ACL by repeated transfer of growing chain to single O unit on ACL; may play role in ligation of polymeric O antigen to core	<i>Salmonella</i> (21) and <i>Shigella</i> (77) spp
<i>rfaL</i>	Required for ligation of polymeric O antigen, single O units, or partial O units to core	<i>E. coli</i> (74) and <i>Salmonella</i> (92) spp.
<i>rfaI (dli)</i>	Regulation of chain length of polymeric O antigen.	<i>E. coli</i> (9) and <i>Salmonella</i> (8) spp.

* Brackets indicate genes which have not yet been located

Tableau 2 : Gènes impliqués dans la synthèse des unités O et dans la polymérisation.

Les caractéristiques du second mécanisme appelé polymérisation par croissance à l'extrémité non-réductrice d'application chez les homopolymères, sont les suivantes :

- 1) l'assemblage des unités O se passe dans le cytoplasme.
- 2) la polymérisation se fait du côté de l'extrémité non-réductrice de la chaîne O.
- 3) dans ce cas-ci, c'est un complexe d'exportation appartenant à la super famille des ABC (ATP binding cassette) transporteurs qui est utilisé.

Le premier mécanisme correspond à la polymérisation dépendant de Rfc et le second à la polymérisation indépendante de Rfc.

3.c1) polymérisation par élongation à l'extrémité réductrice (Polymérisation dépendante de Rfc)

Ce processus est d'application chez les bactéries présentant un Ag O hétéropolymérique comme *E.coli* K12, les différentes espèces de *Shigella*, ainsi que les divers sérogroupes de *Salmonella enterica*.

A la figure 21, est représenté un modèle résumant la polymérisation par élongation à l'extrémité réductrice de l'Ag O en croissance. Lors de la première étape, l'étape d'initiation, il y a fixation d'un sucre sur l'und-P et libération du nucléotide monophosphate (NMP). Ensuite les diverses transférases agissent séquentiellement pour donner l'unité O (cylindre noir). Dans une deuxième étape, l'und-PP-unité O est « flippée » à travers la membrane et se retrouve à la face périplasmique où la polymérisation a lieu par intervention de Rfc (l'Ag O polymérase) (étape c). Finalement l'Ag O complet est attaché sur le complexe lipide A-core par la ligase RfaL. Une description un peu plus détaillée de ce mécanisme de polymérisation est présentée ci-dessous.

L'Ag O est élaboré par addition d'unités O à l'extrémité réductrice du polymère en croissance. Après transfert du résidu initiateur sucre-1-P sur l'und-P, les différentes enzymes du cluster *rfb* (Tableau 2) catalysent l'ajout successif des sucres pour former l'unité O liée à l'und-PP. Une fois les unités O synthétisées, il y a transfert dans le périplasme et polymérisation de celles-ci dans une réaction faisant intervenir l'enzyme Rfc (antigène O polymérase). Une mutation dans le gène *rfc* conduit à un phénotype semi-rough (SR-LPS) (Whitfield, 1995) (Collins and Hackett, 1991) à savoir que le LPS ne présente qu'une seule unité O fixée sur le lipide A-core. La protéine Rfc est une protéine hydrophobe (Fig. 22) présentant 11 à 13 segments transmembranaires (Whitfield, 1995) (Morona et al., 1994).

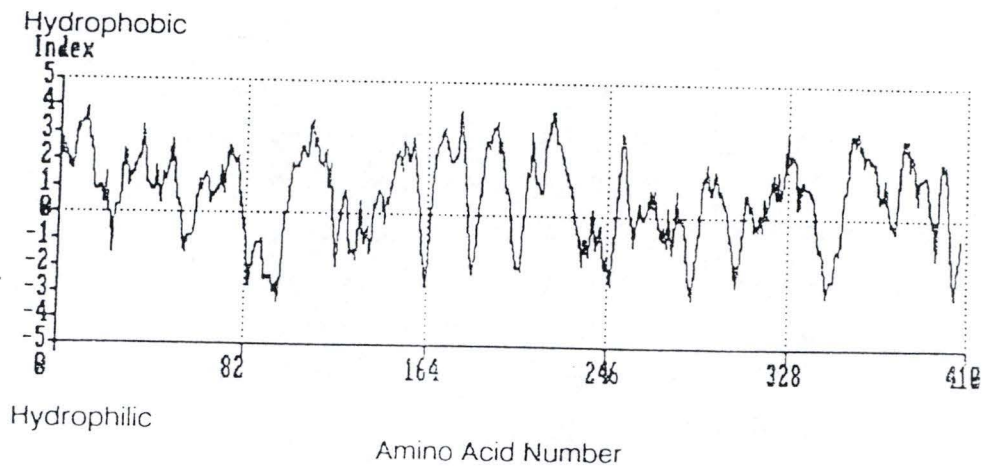


Fig 22 : Profil hydropathique de la protéine Rfc(Collins and Hackett, 1991).

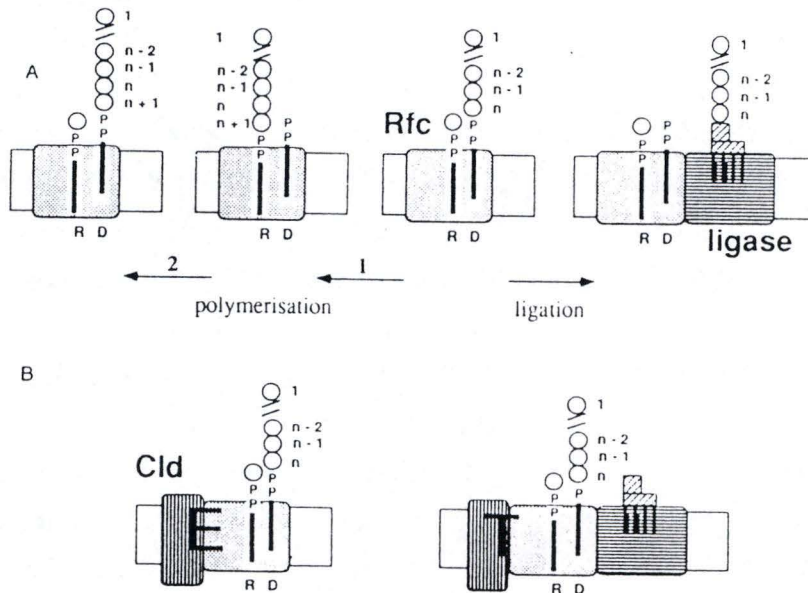


Fig 23: A Modèle de polymérisation de la chaîne O dépendante de Rfc selon Bastin *et al*(Bastin *et al.*, 1993).
 B Modèle de l'action de la protéine Cld (Rol). E : étape d'élongation; T : étape de transfert.

Ces segments semblent être constitués presque exclusivement de feuillets β reliés par des domaines β -turn- β alors que la structure secondaire de la majorité des domaines transmembranaires est formée d'hélices α . (Collins and Hackett, 1991). Bastin *et al.* ont suggéré que Rfc possède deux sites, appelés R et D, liant respectivement l'und-PP transportant l'unité O nouvellement synthétisée et l'und-PP portant le polymère en croissance. La polymérisation (Fig. 23) inclut le transfert de la chaîne O naissante se trouvant au site D, sur la nouvelle unité O au site R. Ensuite l'und-PP-On+1 passe au site D d'où l'und-PP est éjecté. Le site R, de nouveau libre, peut accueillir une nouvelle unité O et le cycle peut recommencer (Reeves, 1994). Une fois terminé l'Ag O peut être attaché sur le complexe lipide A-core par la ligase RfaL. La localisation du gène codant pour Rfc varie suivant l'espèce considérée : chez les *Salmonella* de sérogroupes A, B et D, le gène *rfc* est localisé en dehors du cluster *rfb* (Mäkelä and Stocker, 1984) alors que chez *Salmonella* groupes C2 et E1, *Shigella dysenteriae* 1 et *Shigella flexneri* 2a, ce même gène se trouve dans le cluster *rfb* (Morona et al., 1994) (Mäkelä and Stocker, 1984) (Klena and Schnaitman, 1993).

Une caractéristique importante de la polymérisation médiée par Rfc est le contrôle de la longueur de la chaîne O. Ce processus est réalisé par la protéine Rol (regulator of O-chain length) ou Cld (O-chain length determinator). Bastin *et al.* postulent que Cld interagit avec la polymérase pour former un complexe. Suivant son « état », Cld influence la polymérase pour qu'elle catalyse des cycles de polymérisation (état E) ou induise, dans l'état T, l'arrêt de la polymérisation et le transfert la chaîne O sur le core (Reeves, 1994) (Fig. 23).

La biosynthèse de l'Ag O nécessite un processus d'assemblage membranaire dans lequel RfbP, Rfc, RfbX, Rol et RfaL sont toutes des protéines intégrales de membrane. Les transférases intervenant après RfbP dans la formation de l'unité O sont des protéines périphériques. Selon Whitfield (Whitfield, 1995), il semble acceptable de concevoir que les enzymes sont arrangées en complexe. Comme l'activité de biosynthèse est localisée dans la membrane et que les précurseurs sont cytoplasmiques, le complexe doit être localisé à la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Cependant des résultats expérimentaux indiquent que la réaction de polymérisation (médiée par Rfc) a lieu à la face périplasmique de la membrane interne (Whitfield, 1995). Donc, il semble que le système « d'assemblage » transfère les unités O liées au transporteur lipidique à travers la membrane. En ce qui concerne la ligation, deux gènes semblent être requis pour cette fonction (*rfaL* et *rfbT*). Cependant il a été démontré récemment par séquençage et complémentation que *rfbT* était identique à *rfbP*. Les mutants *rfbP* (T) sont toujours capables de synthétiser des und-PP-unités O mais il n'y a plus de polymérisation. En contraste, quand l'Ag O ligase encodée par *rfaL* est défectueuse, les cellules accumulent le polymère O à la surface périplasmique de la membrane interne (Raetz, 1996).

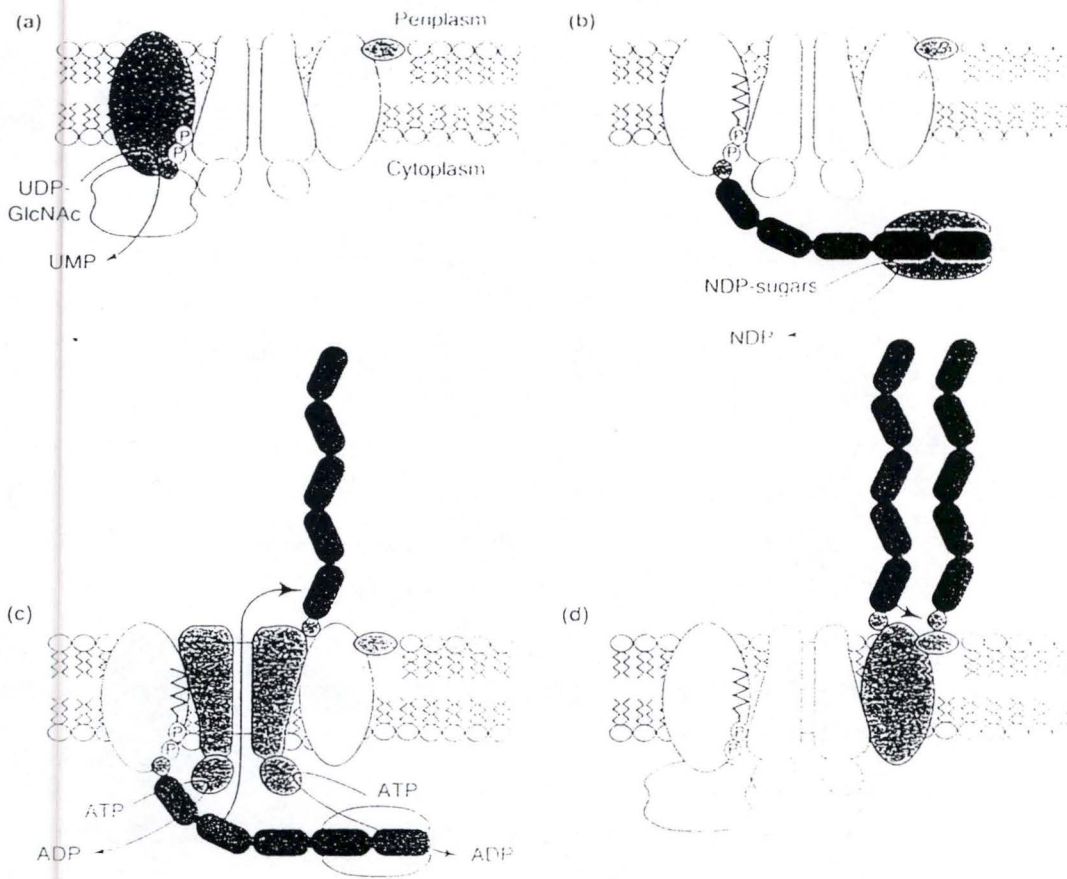


Fig 24 : Modèle de polymérisation de la chaîne O chez les bactéries possédant un LPS homopolymériques, par élongation à l'extrémité non-réductrice (indépendante de Rfc) (Whitfield, 1995).

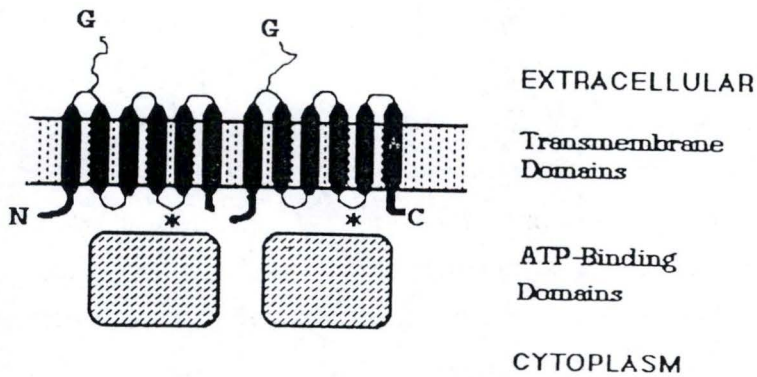


Fig 25 : Organisation stucturelle d'un ABC transporteur typique(Higgins, 1992). Les deux domaines membranaires, possèdent chacun six segments transmembranaires reliés par des loops. Le « G », représente le site pontentiel de glycosilation des ABC transporteurs eucaryotiques. Les domaines liant l'ATP sont cytoplasmiques.

En fait, les mutants rfbP ne présentent pas un défaut de ligation, mais sont incapables de « flipper » les und-PP-unités O à travers la membrane plasmique afin que la polymérisation puisse s'effectuer au niveau de la face périplasmique (Whitfield, 1995). Ceci permet de suggérer que RfbP est une enzyme bifonctionnelle (Whitfield, 1995) (Reeves, 1994) (Raetz, 1996). Wang et Reeves ont proposé que le domaine N terminal de RfbP fonctionnerait comme une « flippase » tandis que le domaine C terminal constituerait le site catalytique pour le transfert du galactose-1-P (Raetz, 1996). Le phénotype observé chez les mutants RfbP pourrait aussi refléter une altération dans l'interaction protéine-protéine entre RfbP et une « flippase » adjacente du complexe. Le candidat le plus probable pour cette fonction est RfbX. Néanmoins, actuellement, le rôle du gène rfbX codant pour une protéine possédant 12 segments transmembranaires est inconnu (Raetz, 1996) (Whitfield, 1995).

3.c2) polymérisation par croissance à l'extrémité non réductrice (Polymérisation indépendante de Rfc)

C'est ce mécanisme qui est utilisé pour la synthèse de l'homopolymère O d'*E. coli* O8 et O9 et *K. pneumoniae* O1 (Fig. 17). Ces bactéries font partie du groupe rfe-dépendante. L'étape d'initiation de cette voie catalysée par Rfe implique le transfert d'un résidu (le GlcNAc) initiateur ne faisant pas partie de l'unité répétitive sur l'und-P. L'und-PP-GlcNAc ainsi formé, joue le rôle d'accepteur pour les monomères de l'Ag O (Whitfield, 1995).

La grosse différence avec le processus précédent est la polymérisation intracytoplasmique : la polymérisation complète des unités O se réalise dans le cytoplasme et non pas à la face périplasmique de la membrane interne (Fig. 24). Par rapport au premier mécanisme, ici, c'est une longue chaîne O hydrophile qui doit traverser la membrane interne hydrophobe et non pas 4 à 5 sucres liés à un transporteur lipidique. Pour faire face à ce problème, les bactéries homopolymériques ont "mis en place" un transporteur appartenant à la famille des ABC (ATP binding cassette) transporteurs ou « trafic ATPase », (Fig. 25). Les transporteurs ABC comprennent une protéine intégrale possédant de multiples domaines transmembranaires (cinq ou six) et une protéine hydrophile intervenant dans la ligation et l'hydrolyse de l'ATP et contenant une séquence consensus, l'ATP-binding motif ou motif de walker. Le transporteur fonctionnel, est formé de deux sous-unités de chaque composant protéique. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire pour permettre le passage de la chaîne O par le canal transmembranaire formé par les deux protéines intégrales. L'Ag O est alors transféré dans le périplasme où il sera lié au complexe lipide A-core avec le sucre « initiateur » par la ligase RfaL. La présence de cet ABC2 transporteur explique l'absence de Rfc et RfbX dans cette voie de synthèse de l'Ag O (Whitfield, 1995).

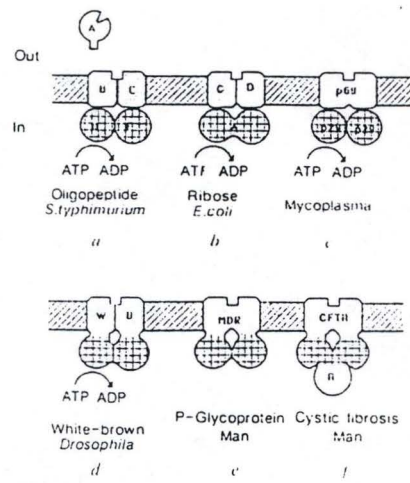


Fig 26 : Exemple d'ABC (ATP binding cassette) transporteurs (Hyde et al., 1990).

3.c2.1 Les ABC transporteurs

Les ABC transporteurs ont été identifiés aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes et sont responsables de l'importation ou l'exportation des différentes protéines, peptides, polysaccharides et drogues (Fath and Kolter, 1993). Ainsi la superfamille des ABC transporteurs comprend les ABC transporteurs procaryotiques dépendant des "periplasmic binding protein" (ou "periplasmic permeases"), les exporteurs bactériens comme les transporteurs des polysaccharides capsulaires, des protéines eucaryotiques incluant le pfMDR (multi drugs resistance) impliqué dans la résistance à la chloroquine chez le *Plasmodium*, la protéine STE6 médiant l'exportation de la phéromone de « mating » "a" chez la levure ... (Hyde et al., 1990). Récemment, des systèmes de transport ABC ont été identifiés pour l'exportation de la chaîne O du LPS chez *Yersinia enterocolitica* O:3, *K. pneumoniae* O1, *E.coli* O9, *Serratia marcescens* O16, *Vibrio cholerae* O1 et *Myxococcus xanthus* (Rocchetta and Lam, 1997). En général, chaque transporteur consiste en quatre domaines ou sous-unités. Ces quatre domaines présentent plusieurs possibilités d'arrangement (Fig. 26). Les quatre domaines peuvent faire partie d'un même polypeptide, constituer quatre protéines distinctes ou être fusionnés deux-à-deux (Fig. 26). Deux de ces quatre domaines sont fortement hydrophobes et sont inclus dans la membrane. Ils présentent six hélices α transmembranaires reliées par de courtes séquences hydrophiles (Higgins et al., 1990) (Fig. 25). Ils lieraient le substrat et permettraient son passage à travers la membrane. Ils détermineraient également la spécificité du transporteur pour le substrat (Higgins, 1992). Les deux autres domaines contiennent le site de liaison à l'ATP et sont associés à la face cytoplasmique de la membrane interne, ce sont les "ATP binding domains" (Hyde et al., 1990) (Higgins et al., 1990).

Dans la plupart des cas, ces quatre domaines sont suffisants pour médier la translocation du substrat à travers la membrane. Cependant, pour certains systèmes, des domaines supplémentaires sont nécessaires:

1) Une partie importante des systèmes de transport médiés par les protéines ABC des bactéries gram- requiert une protéine périplasmique soluble de liaison au substrat (Fig. 26a), c'est ce qu'on appelle les transporteurs ABC dépendant des "binding proteins" périplasmiques.

2) Certains ABC transporteurs possèdent un domaine supplémentaire qui sert à la régulation (Higgins, 1992). C'est le cas du produit du gène de la fibrose kystique qui présente un cinquième domaine, le domaine R (Fig. 26f), qui ne se retrouve chez aucun autre ABC transporteur (Higgins, 1992).

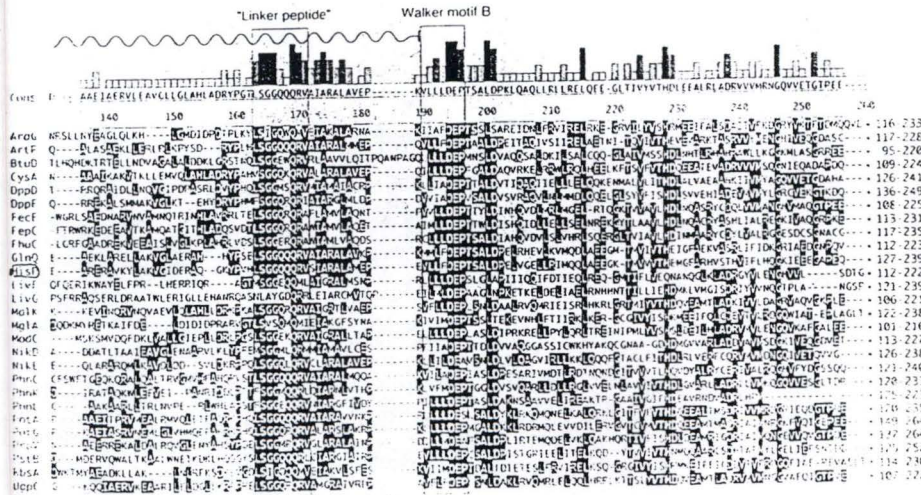
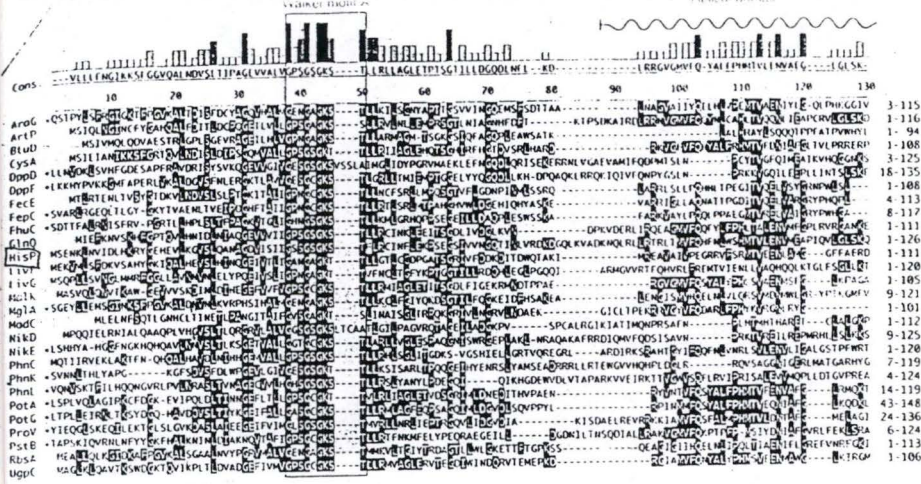


Fig 27 : Alignement de sous-unités liant l'ATP de 27 binding protein dependent ABC transporters(Boos and Lucht, 1996). Les deux motifs de Walker, le « linker peptide » et le domaine hélicoïdale sont indiqués. Les séquences consensus sont pour le motif A : XXGXXGKST, et pour le motif B : VLLLLDEP.

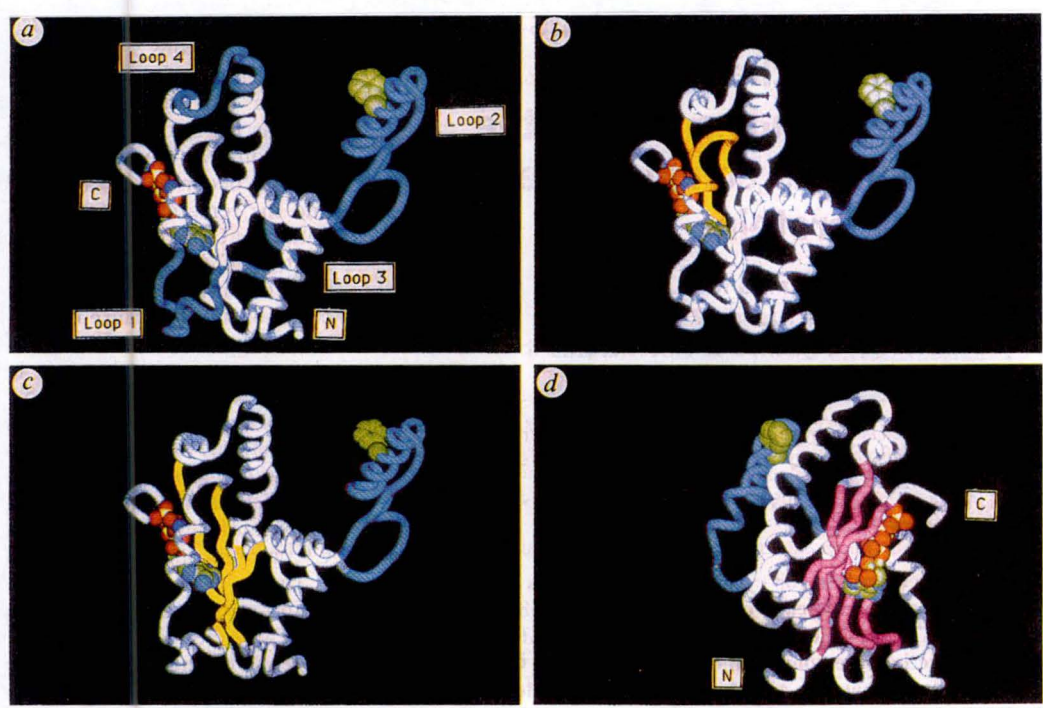


Fig 28 : Modélisation de la structure tertiaire de la cassette ABC(Hyde et al., 1990). a) Les deux loops 2 et 3 sont représentés en bleu. b) les deux motifs de Walker sont représentés en jaune et le loop 2 en bleu. c) les cinq brins β du motifs de Rossman sont en jaune. d) représentation de la structure après rotation de 90° : les cinq brins β sont en rose et le loop 2 en bleu.

Les différents transporteurs ABC, bien qu'ils soient chacun spécifiques du substrat transporté(Higgins, 1992), partagent des similarités de séquence(Covitz et al., 1994). Ainsi, on remarque que le domaine qui lie et hydrolyse l'ATP est fortement conservé au cours de l'évolution entre les différents membres(Higgins, 1992). Cette région de 200 acides aminés (aa) a reçu plusieurs noms : le fold de Rossmann, le motif Doolittle, mais le plus courant est le motif de Walker(Fath and Kolter, 1993). Ce motif fortement conservé a été appelé l'ATP-binding cassette (ABC) et les protéines qui contiennent cette cassette font partie de la superfamille des ABC transporteurs(Fath and Kolter, 1993). Cette dernière comprend deux courtes séquences fortement conservées, le motif A de Walker ou P-loop (phosphate binding loop)(Chu and Trust, 1993) (riche en glycine) et le motif B de Walker qui constitueraient une "nucleotide binding pocket"(Covitz et al., 1994)(Boos and Lucht, 1996) (Fig. 27).

Le P-loop, dont la séquence consensus est XXGXGKST (X= n'importe quel aa) est localisé près de l'extrémité N-terminale de la protéine qui est une hélice α (Chu and Trust, 1993). Ces résidus forment un "turn" qui rapproche un résidu lysine à proximité des phosphates du complexe Mg^{++} -ATP. L'acide aspartique hautement conservé du site B (séquence consensus : VLLLDEP) se trouvant à proximité du site A dans l'espace pourrait interagir avec le Mg^{++} (Fath and Kolter, 1993).

Le modèle de la structure de HisP, « l'ATP-binding protein » du complexe HisQ, M, P de *S. typhimurium*, un ABC transporteur dépendant des « periplasmic binding protein » intervenant dans le transport spécifique de l'histidine a été réalisé par Hyde *et al.*. Celui-ci fait état d'un domaine central formé de cinq brins β parallèles hydrophobes formant le « nucleotide binding motif » de Rossmann, connectés par des hélices α et des "turns". A l'extrémité C-terminale de deux de ces brins β sont localisés le P-loop (riche en glycine) ou motif de Walker A et le motif de Walker B. Faisant saillie de ce domaine central entre les brins β 2 et 3, une extension de conformation hélicoïdale correspond à 1/3 de la protéine HisP. Il est connecté au brin β 3 par un "linker" peptide riche en glycine/glutamine(Fig. 27). Ce domaine hélicoïdal a été modélisé en deux loops (loops 2 et 3) par Hyde *et al.* (Hyde et al., 1990) (Fig. 28). Hyde *et al.* suggère que ces deux loops (loops 2 et 3), constituant le domaine hélicoïdale, sont responsables du couplage du transport aux changements conformationnels induits par l'hydrolyse de l'ATP probablement par interaction, via le « linker peptide », avec les domaines hydrophobes transmembranaires du complexe de transport (Hyde et al., 1990).

Au niveau des protéines transmembranaires du complexe de transport, une séquence conservée d'approximativement 20 aa a été mise en évidence chez les ABC transporters dépendant des « periplasmic binding protein », et notamment pour le système de transport du maltose chez *E. coli* (Dassa and Hofnung, 1985).

Protein	Residue	Sequence	Distance from C-terminus
FeoP	184	A L N S L S L G S D T A T A L G S R V A R T O L I G L A I T	194 aa
FeoC	184	O L N L L N L S D S T A H T L G V N L T R L R L V I N M L V L	191 aa
FeoF	184	D L D L L A L G D A R A T T L G V S V P H T R F W A L L L A V	191 aa
FeoG	184	P M N M L A L G E I S A R O L G L P L W F W R N V L V A A T G	192 aa
FeoP	184	R M R L L E M G D D T A C A L G V R L E R S R L L M M L V A V	193 aa
ReoY	184	S G K V N E K S S A A G L A L G V W F L F V L V F D L V L L A	192 aa
FeoB	184	P L T L M G L I D D C V A R N L G L A L S L A R L A A I S L A I	194 aa
FeoH	184	W L T I L F L G C D T A R A V G M A L T F T R I A L L L L A A	194 aa
OppA	184	L O S I F F S L I E A A A I D G A G P I R R F F K I A L P L I	191 aa
OppB	184	L K A I F D D L Y E A S A M D C A G P F O N F F K I T L P L L	191 aa
OppC	184	L K A I F D D L Y E A S A M D C A G P F O N F F K I T L P L L	191 aa
OppD	184	L I N O V P A D L I E A S R S F G A S P R O M L F F K V Q L P L A	191 aa
DppE	184	L E V L G E D Y I R T A R A K G L T R M R V I I V H A L R N A	191 aa
NykE	184	L D V A G Q R H V T W A R L R G L N D K O T E R R H I L R N A	191 aa
OppE	184	V E V H T Q D Y I R T A K A K G L S P F K I I V K H A L R N A	191 aa
OppF	184	I E V L N S D Y I R T A K A K G L S R P A L T V R H A I R N A	191 aa
OppG	184	I E V L H S N F I R T A R A K G L P M R R I I F R H A L P F A	191 aa
OppH	184	I D L O S Q D F V F F A R A K G L S E K E I S N K H I F K N A	191 aa
OppI	184	A W E A L G E D E I A C R S L G L S P R R I K L T A F T I S A	191 aa
OppJ	184	A W E A L R E D E I A C R S L G L S P T R I K L T A F T I S A	191 aa
OppK	184	I S L R O R E F V L A S R L S C A G H V R V E V D H L A G A V	191 aa
DppC	184	L E V E V N R D Y V T A S R V A C A G A M R O M F I N I F P R C	191 aa
OppL	184	L S L K R R E F I E A A Q V G V I S T A S I V I R H I N P R V	191 aa
HgIC	184	N I F A I G G N F E A A K M S C V N V G L N L L M I Y A L S G	191 aa
HgSC	184	Y I Y A L G G N E R A T R L S C I N V N K I K I I V Y L C G	191 aa
RvAB	184	N T L A I C G N E E A A R L A G M P V V R T K I I I F V L S G	191 aa
OppM	184	L O L K N O E Y V E A S O T L G A K T S R L L F K H I V E N A	191 aa
OppN	184	L O I K N Y E Y V E A S K T G A K T F R I I R K N I D E N T	191 aa
OppO	184	L R Y R D L E Y N E A S R T L G T P T L K I V A K N I M S Q L	191 aa
OppP	184	F M T L F D E L V E A A R I D C A S P M R F F C D I V F P L S	191 aa
OppQ	184	F M A V P F C H I E A A T A H G T H G O T F R R I M F B A M	191 aa
OppR	184	L K A V P V G O W E S G O A L G L S E S A I P F R L V M B A E	191 aa
OppS	184	I R S V F H G E I E A A R A Y G F S S F K M Y K C I I L S A	191 aa
OppT	184	I R A I P E G Q W G S C S A L G M S K K D T L A I L L F Y A F	191 aa
OppU	184	V L S I H E G F R E A G L A L G L S R W E T I R Y V I L E L A	191 aa
OppV	184	A C R A C A E D L F M A S L L G I N T D R V I A L T F V I G A	191 aa
OppW	184	A C R A C A E D L K M A S L L G I N T D R V I A L T F V I G A	191 aa
OppX	184	F E T I D S S L E E A A L D G A T P W O A F R L V L L P L S	191 aa
OppY	184	F E T I D S S L E E A A L D G A T P W O A F R L V L L P L S	191 aa
OppZ	184	F E O T P V M K K E A A Y G I G C T T W E V I W R I V L P F T	191 aa
PstA	184	L L K L V P Y S L R E A A Y A L G T P K W K M I S A I T L K A S	191 aa
CysW	184	M L S O G S O E D E A A I L L G A S G W O M P R R V T L P N I	191 aa
CysT	184	L E E L G P E Y E E A A E T L G A T R W O S F C K V V L P E L	191 aa
OppAA	184	L K G F D V R M L E A A K D L G A S E F T I L R K K I I L P L A	191 aa
OppAB	184	L R E L D R S I E E A A M D L G A T P L K V F F V I T L P M I	191 aa
OppAC	184	I E K L D K F L L E A A R D L G A S K L Q T F I R I I I P L T	191 aa
OppAD	184	L I R I D Y S L V E A A L D L G A R E L K T F F T V I V P L T	191 aa
OppAE	184	E F P T T F E A A E A S E F H G M N V L M G A P N I V E P S S	191 aa

Fig 29 : Aligement des composants hydrophobes de plusieurs ABC transporteurs autour de la région conservée EAA(Boos and Lucht, 1996).

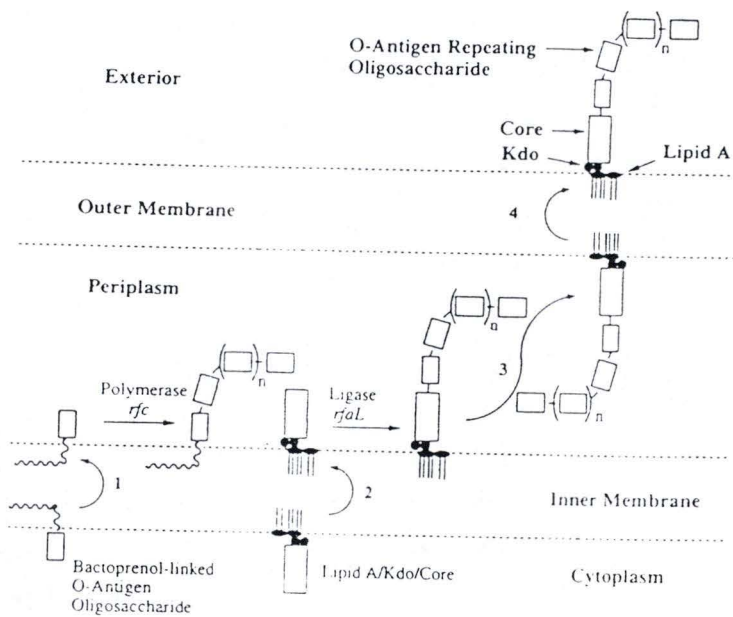


Fig 30 : Schéma hypothétique de l'exportation d'une molécule de LPS nouvellement synthétisée vers la membrane externe(Raetz, 1996).

Cette région, appelée région EAA et localisée à approximativement 100 résidus de l'extrémité C terminale de la protéine, possède la séquence consensus EAA---G-----I-LP (Fig.29). Cette séquence de 20 aa présente un profil hydrophile et se trouve sur un "loop" cytoplasmique. Cette région interagirait avec le domaine hélicoïdale du nucleotide binding domain permettant un assemblage et un fonctionnement du complexe de transport (Mourez et al., 1997).

3.c3 Nouvelle voie de synthèse de l'antigène O

Il faut signaler qu'un troisième mécanisme de biosynthèse de la chaîne O a récemment été découvert intervenant dans la construction de l'homopolymère O:54 chez *Salmonella enterica* serovar Borreze (Keenleyside and Whitfield, 1996). Cette voie de synthèse est indépendante de Rfc et demande toujours Rfe comme enzyme d'initiation. Cependant, l'exportation du polymère O ne requiert pas la présence d'ABC transporteurs. Il semblerait que la glycosyl transférase RfbB intervienne pour polymériser l'homopolymère de N-acetyl-mannosamine (ManNac) tout en couplant le transport à la polymérisation. La région C terminale transmembranaire de RfbB formerait un pore à travers lequel la chaîne O en croissance pourrait passer dans le périplasme (Keenleyside and Whitfield, 1996).

3.d) Transfert du complexe lipide A-core dans le périplasme

Par utilisation de 2,4 dinitrophénol (DNP) (un agent découplant), Mc Grath et Osborn ont prouvé que le transfert du lipide A-core vers la face périplasmique de la membrane interne est dépendante du maintien de la force proton motrice (pmf) (McGrath and Osborn, 1991) (Mc Grath and Osborn, 1991). Le transfert du core pourrait être facilité par l'existence d'un « translocateur » dépendant de cette pmf ou d'une « flippase ». Néanmoins des mutants déficients dans le transfert du core n'ont pas encore été décrits, en raison de l'absence de LPS dans la membrane externe (ce qui est léthal pour la bactérie) (Mc Grath and Osborn, 1991).

3.e) Exportation du LPS

Lorsque l'Ag O complet a été lié sur le reste de la molécule de LPS, celle-ci est exporté vers la membrane externe où elle se retrouve au niveau du feuillet externe. Le mécanisme exact n'est pas connu. Un schéma hypothétique pour l'exportation du LPS est représenté à la figure 30 : après l'étape de polymérisation et de ligation (étape 1 et 2), des transporteurs hypothétiques

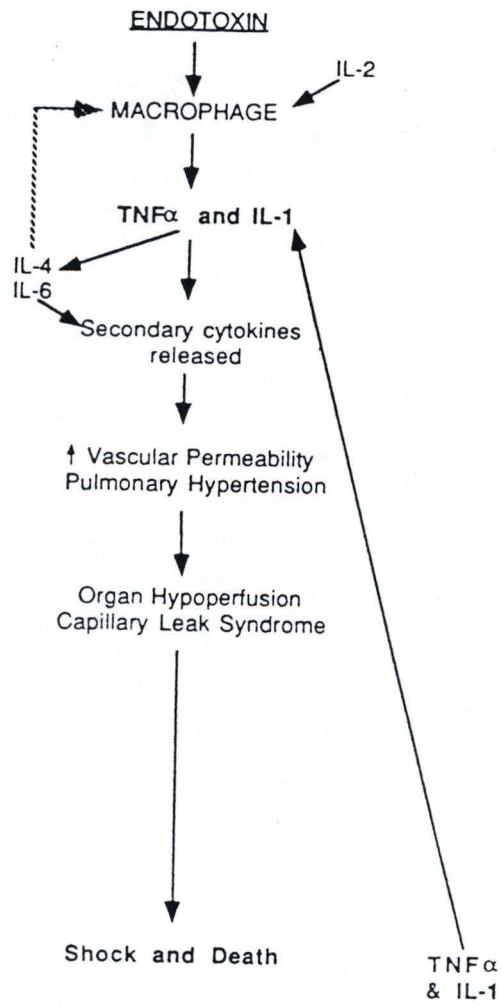


Fig 31 : Les différentes étapes du choc endotoxinique(Proctor et al., 1995).

permettraient le transport du LPS dans le périplasme et puis son passage au feuillet externe de la membrane externe (étape 3 et 4) (Raetz, 1996).

Actuellement, une autre hypothèse suggère que le transfert pourrait se faire par les jonctions de Bayer (= jonctions entre la membrane interne et externe).

4) Interaction du LPS avec l'hôte

Lors d'une infection par des gram-, la libération de LPS, suite par exemple à la destruction massive des bactéries peut mener au choc endotoxique. En fait, le lipide A (aussi appelé endotoxine) constitue la partie suffisante pour induire ce choc. Lors du relargage de LPS, celui-ci peut agir sur les macrophages pour induire la synthèse de cytokines, spécialement du TNF- α , de l'Il-1 α et de l'Il-6. Ces cytokines vont induire la libération de cytokines secondaires et de médiateurs lipidiques. L'ensemble de ces médiateurs va augmenter la perméabilité vasculaire, diminuer la contractibilité cardiaque, induire une hypertension pulmonaire et une vasodilatation généralisée ainsi que la formation de caillot sanguin intravasculaire (Fig.31). Finalement, cela conduit à la mort (Proctor et al., 1995). Lors de la libération dans la circulation sanguine, le LPS est pris en « charge » par une protéine du sérum la LBP (LPS binding protein) qui est produite par les hépatocytes en réponse aux cytokines. La LBP servirait à délivrer le LPS aux glycoprotéines de surface CD14 que l'on trouve notamment chez les macrophages (il existe aussi une forme soluble de CD14 dans le sérum). Le domaine N-terminal de la protéine CD14 contient le site de liaison au LPS et est suffisant pour l'activation de la cellule. CD14 transférerait le LPS sur une autre protéine transmembranaire encore inconnue à ce jour capable d'induire la production de signaux intracellulaires menant à la réponse de la cellule. Chez les macrophages, les signaux résultant de cette association entre le LPS et la protéine inconnue stimule la transcription d'ARNm codant pour des cytokines, comme le tumor necrosis factor (TNF) et l'Il-1 (Raetz, 1993). La production excessive de ces cytokines et de médiateurs non protéiques incluant le NO et le platelet-activating factor est responsable des symptômes observés lors du choc endotoxique (Dinarello, 1991) (Anderson et al., 1985) (Morrison and Ryan, 1987) (Raetz, 1996).

L'Ag O, dernière partie du LPS, est un facteur de virulence pour la bactérie: il interagit avec la voie alterne du complément en le maintenant à distance de la paroi bactérienne (distance directement proportionnelle à la taille de l'Ag O), empêchant ainsi l'action néfaste de ce système de défense. Pour les bactéries infectieuses pénétrant par voie digestive, l'antigène O constitue également un mécanisme de protection contre l'acidité du suc gastrique (Skurnik and Toivanen, 1993).

Le LPS joue également un rôle essentiel en constituant une barrière rigide hydrophile contre les antibiotiques hydrophobes (les rifamycines, l'actinomycine D, la novobiocine...), les détergents (SDS, sels biliaires, triton x-100) et les colorants hydrophobes (comme l'éosine, le bleu de méthylène...)(Nikaido, 1996). Ce rôle important du LPS est confirmé par l'utilisation d'EDTA (molécule chélatant les cations), de polycations comme la polymyxine B, qui déstabilisent la couche de LPS et disruptent la membrane externe permettant alors le passage des antibiotiques hydrophobes(Raetz, 1996)(Nikaido, 1996). Il interviendrait également dans l'interaction avec la membrane des cellules eucaryotiques(Batchelor et al., 1992).

Il faut signaler aussi que les mutants rough par rapport aux cellules sauvages smooth, sont beaucoup moins virulents. Les bactéries rough ne survivent généralement pas bien longtemps dans les macrophages au contraire des cellules smooth(Al-Hendy, 1992) (Batchelor et al., 1992). Elles sont également moins résistantes à l'action néfaste du complément.

C) La bactérie *Brucella*

1 La brucellose

La Brucellose est une maladie mondiale qui sévit principalement dans la région Méditerranéenne, dans l'ouest Asiatique et dans certaines régions d'Afrique et d'Amérique Latine. Cette zoonose touche essentiellement les animaux et provoque l'avortement chez les femelles et la stérilité chez les mâles. L'homme peut être infecté par consommation de nourriture contaminée ou par contact direct avec un animal malade. La transmission d'homme à homme par transplantation de tissus ou par rapports sexuels est insignifiante.(Corbel, 1997)(Corbel, 1997)

La bactérie pénètre dans l'hôte suivant plusieurs voies: grâce à des coupures ou des abrasions de la muqueuse orale, conjonctive, génitale et du nasopharynx. Chez le porc, elle semble aussi capable de traverser la peau intacte(Smith and Ficht, 1990)

Les symptômes observés chez l'homme, sont des complications gastro-intestinales, respiratoires, neurologiques, des manifestations épidermiques et une fièvre ondulante. Le traitement de la brucellose humaine consiste en une cure journalière de rifampicine et de doxycycline pendant six semaines. Pour les infections conduisant à des complications comme des méningoencéphalites ou des endocardites, il faut utiliser une combinaison de rifampicine, tétracycline et d'un aminoglycoside.(Corbel, 1997).

2 Brucella

Le genre *Brucella* fait partie de la famille des coccobacilles gram négatifs.(Smith and Ficht, 1990).

Cette famille est rattachée au groupe α -2 des *Proteobactériaceae*. Il comprend six espèces différenciées suivant l'hôte cible, les voies métaboliques utilisées, le besoin en CO₂ et en sérum pour la croissance ainsi que suivant les caractéristiques immunologiques(Smith and Ficht, 1990) IL s'Ag it de

B. melitensis (chèvres)

B. abortus (bétails)

B. suis (porcs)

B. ovis (moutons)

B. canis (chiens)

B. neotomae (rats du désert)(Smith and Ficht, 1990) (Cherwonogrodzky et al., 1990)

Les trois premières sont les plus virulentes et les plus dangereuses pour l'homme. Cependant, il faut signaler la découverte récemment de souches *Brucella* chez des animaux marins aux Etats-Unis et au Royaume-Uni qui pourraient être pathogènes pour l'homme et augmenter encore la taille de la zone de répartition de *Brucella* dans le monde.(Corbel, 1997)(Corbel, 1997).

3 Pathogénicité

Les bactéries du genre *Brucella* sont des parasites intracellulaires capables de survivre dans les cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales mais également dans les cellules phagocytaires(Smith and Ficht, 1990). Pour ce faire, elles disposent de plusieurs mécanismes afin d'échapper ou de supprimer les réponses bactéricides des phagocytes. *Brucella* produit de l'adénine et de la guanine monophosphate qui inhibent la fusion phagolysosomiale ainsi que de la Cu-Zn superoxyde dismutase qui détruit les radicaux libres produit par les phagocytes. Pendant plusieurs années, on pensait également que le LPS smooth (S-LPS) jouait un rôle primordial dans la survie intracellulaire car les organismes smooth semblaient se répliquer plus efficacement que les organismes rough.(Corbel, 1997)(Corbel, 1997)(Harmon et al., 1988). Mais, toutes ces observations se basaient sur l'étude de mutants naturels.

Aucune certitude ne pouvait donc être avancée pour savoir si cette difficulté à survivre dans les phagocytes, pour les organismes rough, était uniquement due à la perte de l'Ag O et pas à celle d'un autre constituant indispensable à la bactérie.

Récemment, cependant, il a été démontré par insertion d'un mini-tn5 (transposon) dans le gène codant pour la pérosamine synthétase (intervenant dans la synthèse de l'Ag O) qu'il n'y avait pas de grande différence dans la survie intracellulaire entre le mutant rough obtenu et la souche parentale (Godfroid et al., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus par Price *et al* en comparant la survie, dans des macrophages mammaires de bovins, de souches smooth 2308 et 19 (souche vaccinale) avec les souches mutées par transposition correspondantes (Price et al., 1990). L'Ag O n'est pas donc pas essentiel dans la résistance de *Brucella* aux défenses de la cellule cible (Godfroid et al., 1998) (Price et al., 1990).

4 *Brucella melitensis*

B. melitensis est la première espèce du genre *Brucella* à avoir été décrite. Elle a été isolée pour la première fois en 1887 par Bruce à partir de rate de soldats souffrant de la fièvre de Malte (ou fièvre ondulante). Cependant, les hôtes naturels de *B. melitensis* sont les chèvres et les moutons adultes. Elle induit chez les femelles l'avortement et dans certains cas la rétention des membranes foetales.

B. melitensis sévit en Méditerranée, spécialement le long des côtes Nord et Est ; également en Asie Centrale ainsi que dans la péninsule arabe. Certaines régions d'Amérique Latine sont également infectées, tout particulièrement Mexico, le Pérou et l'Argentine du Nord. Ce phénomène est probablement dû à la migration de population originaire de la région Méditerranéenne.

5 Caractéristiques génétiques de *Brucella*

Les différentes espèces de *Brucella* présentent plus de 95% d'homologie concernant l'ADN au vu des expériences d'hybridation ADN-ADN (Corbel, 1997) (Corbel, 1997) (Smith and Ficht, 1990). C'est pourquoi Verger *et al* ont postulé qu'en fait, il n'y aurait qu'une seule et même espèce regroupée sous le patronyme de *B. melitensis*.

Le génome de *Brucella* contient deux chromosomes de 2,1 et 1,5 millions de paires de bases. En revanche, la bactérie ne possède pas de plasmide (Smith and Ficht, 1990). Le contenu du génome de *Brucella* en G+C est de 58-59%, ce qui est légèrement supérieur à ce que l'on trouve chez *E. coli* et *Salmonella enterica* ($\pm 50\%$).

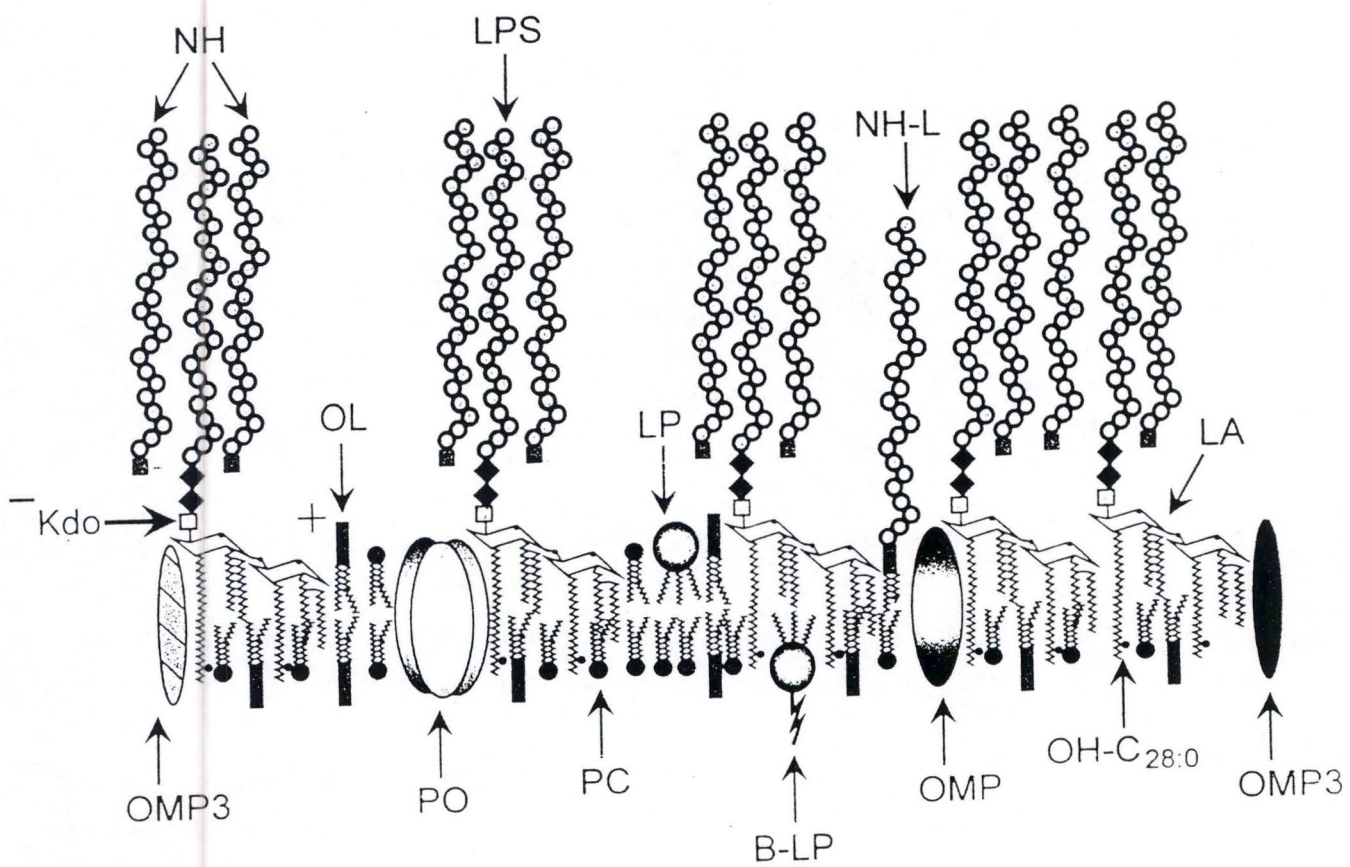


Fig 32 : Représentation schématique de la membrane externe de *Brucella* (Freer et al., 1996).

6 La membrane externe

La membrane externe de *Brucella* diffère assez bien de celle des *Enterobacteriaceae*. Notamment, on remarque que le phospholipide dominant chez *Brucella* est la phosphatidylcholine (PC) alors que chez les Entérobactéries c'est la phosphatidyléthanolamine (PE). Ceci est d'autant plus étonnant que la PC est généralement absente dans la plupart des espèces bactériennes (Nielsen and Duncan, 1990).

On trouve également des phospholipides liés à une molécule d'ornithine. Ces derniers comprennent quatre composants : de l'ornithine, de l'éthylène glycol et deux acides gras différents (Freer et al., 1996).

Une autre caractéristique assez étonnante est la présence de lipoprotéines dans le feuillet externe de la membrane externe. La membrane externe contient aussi un haptène polysaccharidique qui pourrait être associé avec l'Ag O du LPS. (Fig. 32).

Le LPS de *Brucella* est également assez différent de ce qui est trouvé chez d'autres gram-.

Toutes ces propriétés expliquent que la membrane externe de *Brucella*

- * présente une plus grande perméabilité pour les substances hydrophobes

- * soit résistante - à l'action des enzymes lysosomiales des phagocytes

- aux molécules chélatantes comme l'EDTA ainsi qu'aux molécules cationiques bactéricides comme la polymyxine B (antibiotique) et la lactoferricine B (Nielsen and Duncan, 1990). En effet il a été démontré que des liposomes de PC étaient résistants à l'action destructrice de cet antibiotique ce qui n'est pas le cas pour les liposomes de PE (Nielsen and Duncan, 1990). De plus, le faible taux de groupements chargés négativement dans le LPS de *Brucella* peut expliquer le peu d'affinité de la membrane externe pour ces peptides cationiques (Freer et al., 1996). La résistance aux substances chélatantes comme l'EDTA s'expliquerait par le faible taux en cations bivalents de la membrane comparativement à une grande partie des gram- et notamment *E. coli* où les cations bivalents stabilisent la membrane externe en interagissant avec la portion hydrophile du LPS.

Le mécanisme par lequel la couche de LPS est stabilisée n'est pas connue. Plusieurs hypothèses sont proposées :

La couche de LPS serait, selon Morison *et al*, stabilisée grâce à la longueur des chaînes d'acides gras du lipide A (+de 30 carbones) qui établiraient des interactions hydrophobes entre eux. Une autre possibilité serait que les groupements anioniques du LPS soient liés par les lipides portant une molécule d'ornithine chargée positivement. Une dernière hypothèse serait l'interaction entre la chaîne O du LPS et l'haptène polysaccharidique qui stabiliserait le LPS (Freer et al., 1996)

6.1 LPS

Le LPS est l'Ag majeur de la membrane externe de *Brucella*. Il intervient dans la protection de la bactérie contre la voie alterne du complément en maintenant celui-ci à distance de la membrane externe. Il participe également à la résistance aux peptides cationiques et aux agents chélatants (Freer et al., 1996). Il est de plus impliqué dans les mécanismes d'adhérence, de pénétration et de pathogénicité de la bactérie.

a) Le lipide A

Le lipide A de *Brucella* est une molécule disaccharidique formée de 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (diaminoglucose) et de glucosamine liée en β 1-6. Cependant, on ne sait si le 2,3 diaminoglucose et la glucosamine sont liés de manière covalente et forme un disaccharide hétérogène ou si ils constituent deux entités différentes de lipide A (Nielsen and Duncan, 1990). A chaque sucre est fixé par liaison ester et amine deux acides gras saturés très longs (28-30 carbones) et hydroxylés. Par contre on trouve très peu ou pas de phosphates (Freer et al., 1995) (Escola et al., 1994).

Le lipide A de *Brucella* apparait être lié à différentes protéines de la membrane externe (Freer et al., 1995).

b) Le core (noyau)

Le core relie l'Ag O au lipide A. Il est composé de mannose, glucose, quinovosamine (2-amino-2,6-dideoxy-D-glucose), de glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose), d'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique (kdo) et de sucres non identifiés (Freer et al., 1995) (Escola et al., 1994).

c) L'antigène O

C'est en 1932 que Wilson et Miles montrent que la différence sérologique majeure entre *B. abortus* et *B. melitensis* pouvait être attribuée à deux antigènes de surface : l'Ag A qui est prépondérant chez *B. abortus* et l'Ag M chez *B. melitensis* (Smith and Ficht, 1990). Ces antigènes ont été rattachés à la chaîne O du LPS. Depuis il a été démontré que toutes les souches lisses de *Brucella* portent sur leur LPS smooth, les deux types d'Ag.

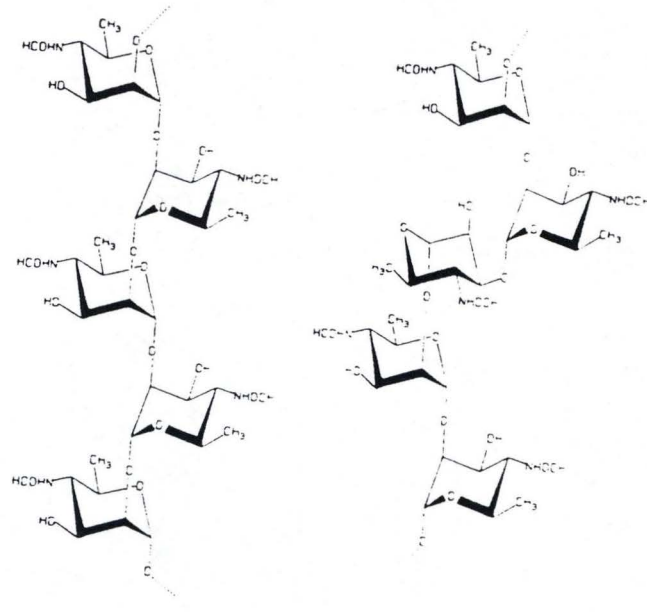


Fig 33 : Structure chimique des A antigènes et M antigènes de Brucella (Bundle et al., 1989). A) A>M : homopolymère de 4,6-didéoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyles unis par des liaisons α -1,2.
 B) M>A : polymère linéaire d'unités répétitives composées de 4,6-didéoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyles dont quatre liaisons sont de type α -1,2 et une du type α -1,3.

La quantité relative de ces Ag A et M varient entre les souches smooth de *Brucella* et sont absentes des souches rough auxquelles il manque l'Ag O. Ces souches smooth sont classées en trois sérotypes : A+M- (A>M), A-M+ (M>A), A+M+ suivant l'agglutination induite par l'utilisation de sérum anti-A et de sérum anti-M(CloECKaert et al., 1993). L'Ag A et l'Ag M sont tous les deux des homopolymères de résidus N-formyl-pérosamine (4,6 dideoxy-4-formamido-D-mannopyranose)(Bundle et al., 1989)(Meikle et al., 1989)(Escola et al., 1994). L'Ag A est un polymère linéaire dont les résidus sont liés en $\alpha 1,2$. L'Ag M, quant à lui, est aussi un polymère linéaire qui est formé d'unités répétitives pentasaccharidiques contenant un résidu lié en $\alpha 1,3$ et quatre résidus liés en $\alpha 1,2$.(Fig. 33)

La longueur de la chaîne O de *B. abortus* est de 96 à 100 unités répétitives(Wu and Mackenzie, 1987).

Il faut signaler aussi que la présence de pérosamine dans l'Ag O de *Brucella* est à l'origine de la cross-réactivité de cette bactérie avec *Escherichia hermanni*, *E. coli* O157, *Salmonella* O30, *Vibrio cholerae* et *Yersinia enterocolitica* O9(Corbel, 1997). En ce qui concerne *Yersinia enterocolitica*O9, son Ag O est identique à celui de *Brucella* (Wu and Mackenzie, 1987), ce qui génère des difficultés dans l'établissement de diagnostics chez des animaux infectés par l'une ou l'autre espèce.

But du mémoire

Le LPS est un facteur de virulence chez *Brucella*. Récemment sept gènes impliqués dans la synthèse de l'Ag O ont été identifiés. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à deux gènes en particulier. Ils coderaient pour la partie membranaire et le « nucleotide binding domain » d'un ABC transporteur. Pour vérifier cela, nous avons réalisé des alignements protéiques de ces gènes avec d'autres membres de cette superfamille des ABC transporteurs. De plus, afin de mettre en évidence que ces deux gènes codent bien pour des protéines intervenant dans le transport de la chaîne O vers le périplasme, nous avons décidé de créer des mutants de ces deux gènes par "gene replacement". La copie chromosomique du gène cible est remplacée par la copie disruptée du gène par un marqueur de résistance à un antibiotique (Kan dans notre cas). Cette construction est alors introduite dans *Brucella* pour y remplacer les gènes cibles par double crossing-over. L'étape suivante étant de déterminer le phénotype des mutants obtenus à l'aide d'anticorps monoclonaux en ELISA et Western blot.

Pour réaliser cette construction deux méthodes s'offraient à nous : la technique PCR et la réalisation du mutant par clonage.

*Résultats
et
discussions*

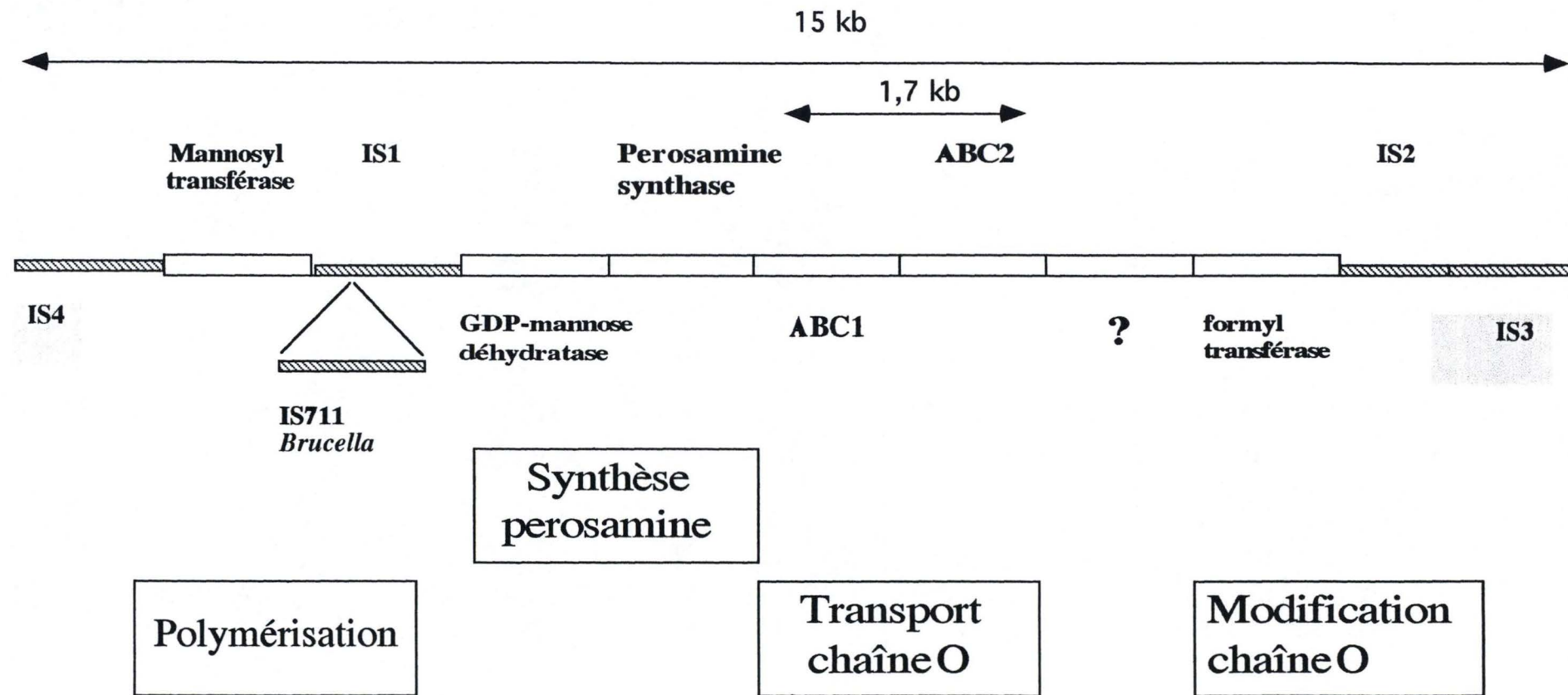


Fig. 1 : Schéma représentant l'organisation du cluster *rfb* de *Brucella melitensis* 16M.

Récemment le cluster *rfb* de *Brucella melitensis* 16M, impliqué dans la biosynthèse de la chaîne O, a été cloné et séquencé au laboratoire (Fig.1). Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à deux gènes de ce cluster.

A. Détermination de la fonction des gènes

Les séquences nucléotidiques et protéiques déduites de ces deux gènes ont été comparées à celles disponibles dans les banques de données grâce aux programmes Blast N et Blast X. La comparaison des séquences nucléotidiques n'a pas permis de mettre en évidence de séquences similaires à nos deux gènes, les pourcentages d'identité étant très faibles. Par contre la comparaison des séquences protéiques indique que les deux protéines constitueraient un ABC transporteur. La première protéine est similaire au constituant transmembranaire d'un ABC transporteur. La seconde présente une similarité significative avec l'« ATP binding domain » d'un ABC transporteur. Les gènes encodant ces protéines ont été appelés respectivement *abc1* et *abc2* et les protéines correspondantes ABC1 et ABC2.

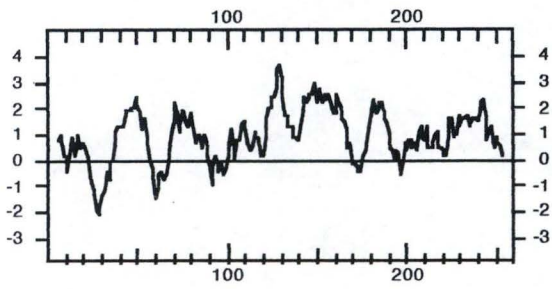
A1. Caractérisation d'ABC1

Des alignements pairés et multiples de séquences ont été réalisés (à l'aide du programme Matchbox et du logiciel gap du package GCG-Genetics Computer Group-) entre ABC1 et quatre protéines transmembranaires intervenant dans le transport de la chaîne O vers le périplasme de divers genres bactériens. ABC1 a été comparé grâce au logiciel gap avec la protéine RfbH de *Vibrio cholerae*, RfbD de *Yersinia enterocolitica*, ABC de *Synechocystis*, RfbA de *Klebsiella*, et montre, respectivement 36%, 39%, 34%, 32% de similarité avec chacune de ces protéines. Ces pourcentages sont relativement faibles.

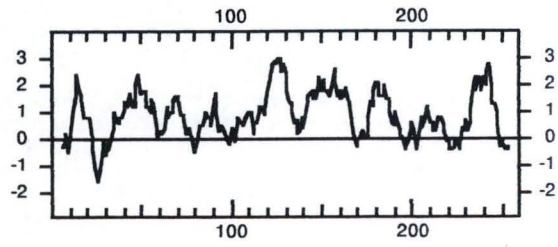
Cependant, la caractéristique essentielle de ces protéines membranaires est le nombre de segments transmembranaires. Ainsi la comparaison de profils d'hydropathie (Kyte et Doolittle) d'ABC1 et de ces différentes protéines a mis en évidence la présence de six régions hydrophobes qui correspondraient à des segments transmembranaires (Fig. 2). La présence de ces six segments est caractéristique des protéines transmembranaires d'ABC transporteur [Higgins, 1992 #1364].

A2. Caractérisation d'ABC2

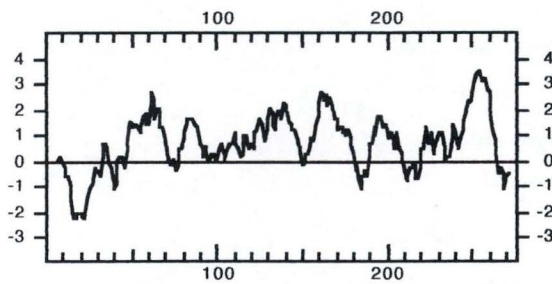
rfbD *Yersinia enterocolitica*



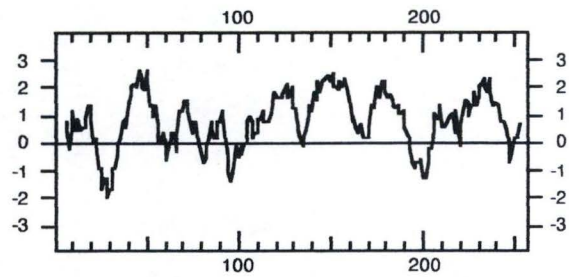
Rfa1 *Klebsiella pneumoniae*



ABC *Synechocystis*



Rfb H *Vibrio cholerae*



ABC1 *Brucella melitensis*

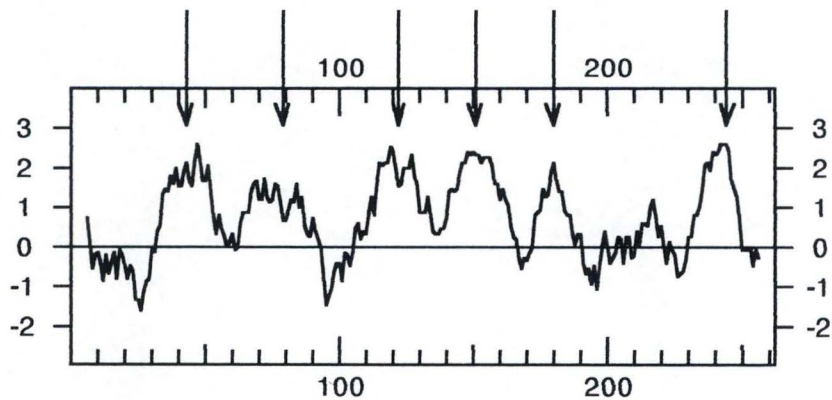


Fig.2 : Comparaison des profils hydrophatiques entre RfbD (*Y. enterocolitica*), Rfa1 (*K. pneumoniae*), ABC (*Synechocystis*), RfbH (*V. cholerae*) et ABC1 (*B. melitensis*) selon l'algorithme de Kyte et Doolittle.

L'abscisse représente la séquence de la protéine en acides aminés; l'ordonnée, l'échelle d'hydrophobicité.

Les flèches indiquent les 6 pics d'hydrophobicité correspondant aux tronçons transmembranaires.

1 ABC2 (*B. melitensis*) 2 ATP (*P. aeruginosa*) 3 RfbB (*M. xanthus*)
 4 RfbE (*Y. enterocolitica*) 5 HisP (*E. coli*) 6 ATP (*E. coli*)

```

1 -----LSNVHLHYAASAFKERSVKTLLVNALLSMRRSAGANTIEDIhalkgisvdiargervaligh
2 -----MQQIRVSVGLGKAYKQYPNRWSRLFEWLVPPSPRRHLLwilvereftieppeavgivgv
3 MPESMDAIIKLDVVKSFRRKRTIRGEYTPFKSELLRWLRGKRQSRDASLItalrginltipkgtvigiir
4 ---MTSLIFKNVIMSYPYIYNAHSQSLRNQLVVRVSTGGRIGGSRGEVVTvtalndisfelnsqdsvgligh
5 -----MSENKLNVIDLHKRYGEHevlkqvsalqanagdvisiigs
6 -----MSIKVQHVGRKAYKYYPKWSRVIEKLLPGDKPRHSHKwvlkdinfsieppeavgivgv
                                     66666666665555444433
  
```

```

1 ngagkstkflktiaglypissgtlkvtgtvrsldDIGLGFEdatgrenilyRGLLLGLTPRFMREIEDEI
2 ngagkstkllkmiagttqptogeirvagrvaalleELGMGFHpdftgrqnvfMAGQLLGMQVEEQALMPDI
3 nsgskstkllklitgiytpstgdlqingrisalldLGAGFHpdfsgrenilingIILGMTRAEVRRMDEI
4 ngagkstkllrtmagiypassgeiiregsvatvfeLGAGMDpelsayenimRMLLLGNSVASAKSKIPEI
5 ssgskstkflrcinlefkpeegsivvngqtinlv-----rdkdgqlkvaDKNQRLRLRLTMVPOHPN
6 ngagkstkllklltqtgtpkgsieiqgrvaalleELGMGFHpdftgrqnvfMSGLMMGLGREETERLMPDI
33333333334455666655555555556666 6666666666
  
```

Walker A

```

1 IEFAD--lgdfidypik-----tysagmqvrlafaistavdgd
2 EAFAE--igeaiegpvr-----tyssgmqmlafsvatarrpd
3 IAFSE--lgefidepvr-----tyssgmymrlafavathvdpd
4 EEFCE--lgdflvlpvr-----tyssgmtmrImfavatsmrpe
5 LWSHMTVlenvmeapiqVLGLSKQEARERAVKYLAKVGDIDERAQKYPVhlsqgqqqrvsialamepe
6 EAFAD--igdyieepvr-----tyssgmqmlafavatasrpd
   5555555555 55555555555555556444
  
```

Région du « linker peptide »

```

1 illldeivigagdaAFMTKAKARIMNMVEKaeimvlashdlanvrqLCTRALVFKAGTIAFDGRVEDAISF
2 ilivdealsvgdaYFQHKSFERIRSFRAgttllivshdrsaiqsICDSAILLEQGRMAMRGRPEEVM DY
3 illideilavgdeHFSKSLAKMMDFKRQgktivlvthelgtverWCDLAAWIDGGYVRRVKGKPEVTAE
4 illidemfgtgdafQEKAEKRMRDWIAGsdifvfashdrslikkLCNRIFRLEHGLIYEESMDIL----
5 vllfdeptsaldpELVGEVLRIMQQLAEegktmvvvtthemgfarhVSTHVI FLHQKIEEGAPEQLFGN
6 ilivdealsvgdsRFQAKYARIADFKQgttlllvshsagdivkHCDRAIFLKNQDIDMDGTARDVTNR
   44444444555666 655555555555555555
  
```

Walker B

```

1 YNSGMGATA-----
2 YNALLAEREGQTVRQEMLADGQVRTISGTGEAAILDVRMVDQRQRALEVVEVGQAVTLEVEVEVRQDIER
3 YREAI SLAEQAQSAAPTPPALTEGGALPQVPSSELP AEGPVRIRHRVQLLDARGESLEVLSP EEGLEVRAD
4 -----
5 PQSPRLQRFKLSLK-----
6 YLDELFGKPKDKSATKSAIATSSASGESQMSLDEIEDVYHTRPGYRPEEYRWGQGGAKIIDYHIQSAGVD
  
```

```

1 -----
2 LILGFMIKDRLGQPMYGINTHRLDKALTDLKAGERITYRFAFDMRLGKGHSVALSLSRLDSHLDRNFEW
3 FSVEGPCEDVDHFVRLQAADGRTL YETSTRSEAVVLSRMPNPGVLRFPVVERLGALGGDYSLVVSARASKG
4 -----
5 -----
6 FPPSLTGNQQTDFLKMVVFYDFDCVVPGLIKTL DGLFLYGTNSFLASEGRENISVSRGDRVRFKFSLP
  
```

```

1 -----
2 RDYGLV FHV INNRQEDFVGC SWLGAETHISRSGEAALDPTSAESTP-----
3 ESSGRCAFRVVSATEEGVFRPPHRWLVEPGANSQAGVRFEPGTSRVEVG-----
4 -----
5 -----
6 VDLNSGDYLLSFGISAGNPQTDMTPLDRRYDSIILHVTKSMDFWGVIDLKSSFTSY
  
```

Fig. 3 : Alignement multiple (programme MATCHBOX) de ABC2 de *Brucella melitensis* 16M avec RfbB de *Myxococcus xanthus*, RfbE de *Yersinia enterocolitica*, « l'ATP binding protein » de *Pseudomonas aeruginosa*, « l'ATP binding domain » de l'ABC transporteur d'*E. coli* et la protéine HisP d'*E. coli*.

Les Majuscules correspondent à des zones non-alignées.

Les minuscules font référence à des régions qui sont alignées : le chiffre indiqué pour chaque acide aminé (aa), au niveau de ces zones, donne la confiance dans l'alignement entre les aa. Exemple : un « 1 » indique que les aa présents à la position définie sont alignés avec une très faible probabilité d'erreur. Plus le chiffre augmente, plus cette probabilité d'erreur augmente.

La séquence protéique d'ABC2 a été alignée de manière pairée (gap) et multiples (Matchbox) avec les séquences de quatre « ATP binding domain » d'ABC transporteurs d'autres genres bactériens, intervenant dans le transport de la chaîne O : RfbE de *Yersinia enterocolitica* (50,8% de similarité avec ABC2), RfbB de *Myxococcus xanthus* (50,6%), , et l'« ATP binding domain » de l'ABC transporteur d'*E. coli* O9 (47,3%) et une « ATP binding protein » de *Pseudomonas aeruginosa*; (49%). Une cinquième protéine, HisP (26% de similarité), appartenant au groupe des ABC transporteurs dépendant des « periplasmic binding proteins » a été ajoutée à cet alignement. En effet, bien que n'intervenant pas dans le transport de la chaîne O, HisP présente les deux motifs de Walker et a très bien été caractérisée dans la littérature [Hyde, 1990 #1350]. Ces deux motifs de liaison à l'ATP (motif A et B de Walker), sont bien conservés entre ces six protéines (Fig. 3). Ceux-ci sont caractérisés par une séquence consensus, respectivement XXGXGKST (X= n'importe quel aa) et ILLXDE. Ils forment une poche qui lie l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire pour la translocation du substrat. Ces deux régions sont représentées à la fig. 3. Le logiciel motifs du package GCG utilisé pour mettre en évidence des régions protéiques caractéristiques, a également montré la présence de ces deux motifs. Une séquence consensus YSXGMXXRL a été mise en évidence entre les cinq protéines médiant le transport de la chaîne O vers le périplasme. Cette région correspond au « linker peptide » trouvé chez les ABC transporteurs dépendants des « periplasmic binding proteins », dont fait partie HisP [Boos, 1996 #1351] (Fig. 3). Cette observation laisse penser qu'il y aurait également chez ces protéines médiant l'exportation de la chaîne O vers le périplasme, une région fonctionnant de façon similaire au « linker peptide ». Cette région permettrait donc la liaison entre les protéines liant l'ATP et les protéines transmembranaires en couplant le transport du substrat aux changements conformationnels induits par l'hydrolyse de l'ATP (voir Point 3.c2.1, Introduction).

A3. Conclusions

Au niveau du cluster rfb de *B. melitensis*, les ORFs d'abc1 et d'abc2 se suivent et ne sont séparées que de 17 nucléotides. Cette organisation se retrouve également au niveau de l'opéron rfb d'autres genres bactériens : *E. coli* O9 [Kido, 1995 #1243], *Klebsiella pneumoniae* O1 [Szabo, 1995 #564], *Vibrio cholerae* O1 [Manning, 1995 #1369]. L'analyse de la séquence protéique déduite des ORFs abc1 et abc2 indique que la protéine ABC1 présente les caractéristiques du composant transmembranaire d'un ABC transporteur et que la protéine ABC2 est similaire au domaine de liaison de l'ATP.

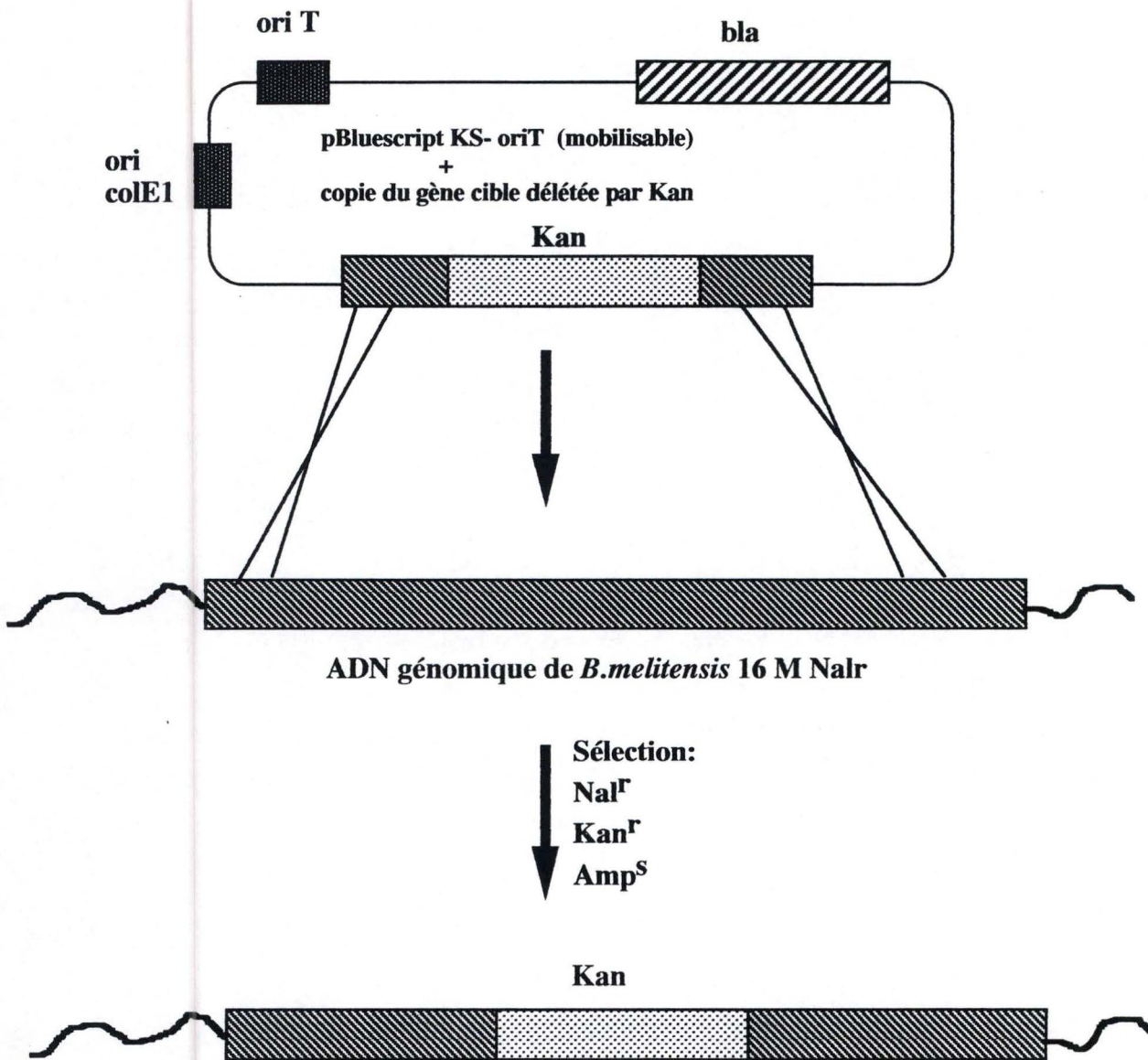


Figure 4
Schéma de déletion de gènes par "gene replacement"

oriT : origine de transfert

ori colE1 : origine de répliation en *E. coli*

bla : gène encodant la résistance à l'ampicilline

Kan : gène encodant la résistance à la kanamycine

Sur base de la séquence protéique primaire, il n'est pas possible d'identifier le substrat transporté par l'ABC transporteur constitué d'ABC1 et ABC2. Toutefois, la localisation des ORFs *abc1* et *abc2* dans le cluster *rfb* et le fait que *B. melitensis* soit une bactérie appartenant au groupe des bactéries possédant un LPS homopolymérique (médiant le transport de la chaîne O par un complexe ABC), suggèrent très fortement que ce transporteur interviendrait dans l'exportation de la chaîne O vers le périplasme.

Afin de déterminer le rôle de cet ABC transporteur, nous avons décidé de créer des mutants de ces deux gènes par « gene replacement » et d'analyser leur phénotype. Si ABC1 et ABC2 interviennent dans le transport de la chaîne O vers le périplasme, chez les mutants obtenus, l'antigène O synthétisé s'accumulera dans le cytoplasme, conduisant à un phénotype « rough ».

B. Construction de mutants de *Brucella melitensis* par « gene replacement »

B1. Principe

La technique de « gene replacement » consiste au remplacement de la copie sauvage chromosomique du gène cible par une copie de ce gène délétée à l'aide d'un marqueur de résistance à un antibiotique (Kan). La copie mutée du gène cible est clonée dans un plasmide non répliquatif chez *Brucella* sp. (pKS_{OriT}). Celui-ci est transféré par conjugaison d'*E. coli* S17-1 à *Brucella melitensis* 16M résistante à l'acide nalidixique (Nal). Après conjugaison, les *E. coli* sont éliminés en présence d'acide nalidixique. Le maintien de la copie mutée du gène et donc du marqueur de résistance ne sera possible que via l'intégration de celui-ci au sein du chromosome (Fig. 4). Les mutants résultant d'un double événement de recombinaison seront résistants à l'acide nalidixique, à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline.

B2 Choix du vecteur et de la cassette de résistance

Le phagemide pKS_{OriT} a été choisi pour la technique du « gene replacement » car il possède une origine de transfert (OriT) permettant son transfert conjugal d'*E. coli* à *Brucella*, un marqueur de résistance (Amp) différent de celui utilisé pour la délétion du gène cible et également une origine de répllication chez *E. coli* inefficace chez *Brucella*.

La cassette Kan utilisée pour la délétion et appelée Kan₃, comprend le gène *Apha-3*, provenant du plasmide pUC18K2 (Fig. 5). Cette cassette *Apha-3* a été mise au point afin d'être utilisée dans la délétion de gènes organisés en opéron [Ménard, 1993 #1368]. Elle permet

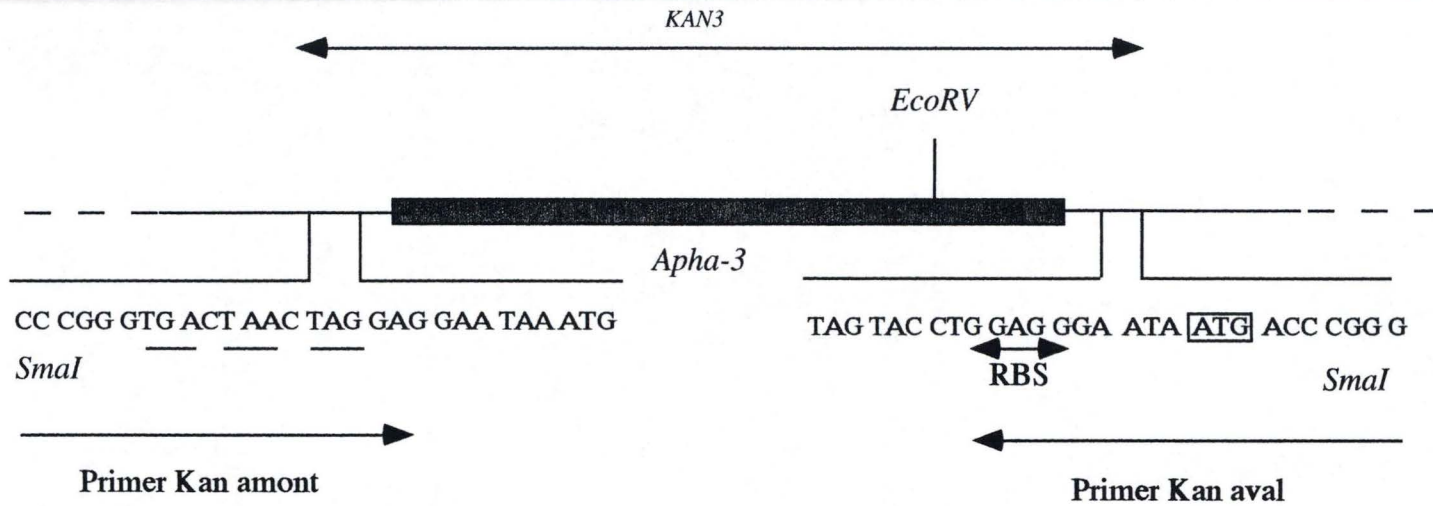


Fig. 5 : représentation schématique de la cassette *Kan3* comprenant le gène *Apha-3*

(un gène de résistance à la kanamycine), flanqué de deux séquences en amont et en aval.

La séquence située en amont de *Apha-3* contient des stops de traduction dans les trois phases de lecture ainsi qu'un codon d'initiation de la traduction du gène *Apha-3*.

La région située en aval comprend un site de fixation au ribosome (RBS) et un codon d'initiation de la traduction.

Deux primers ont été définis sur base des régions flanquant *Apha-3*, afin d'amplifier la cassette *Kan3*.

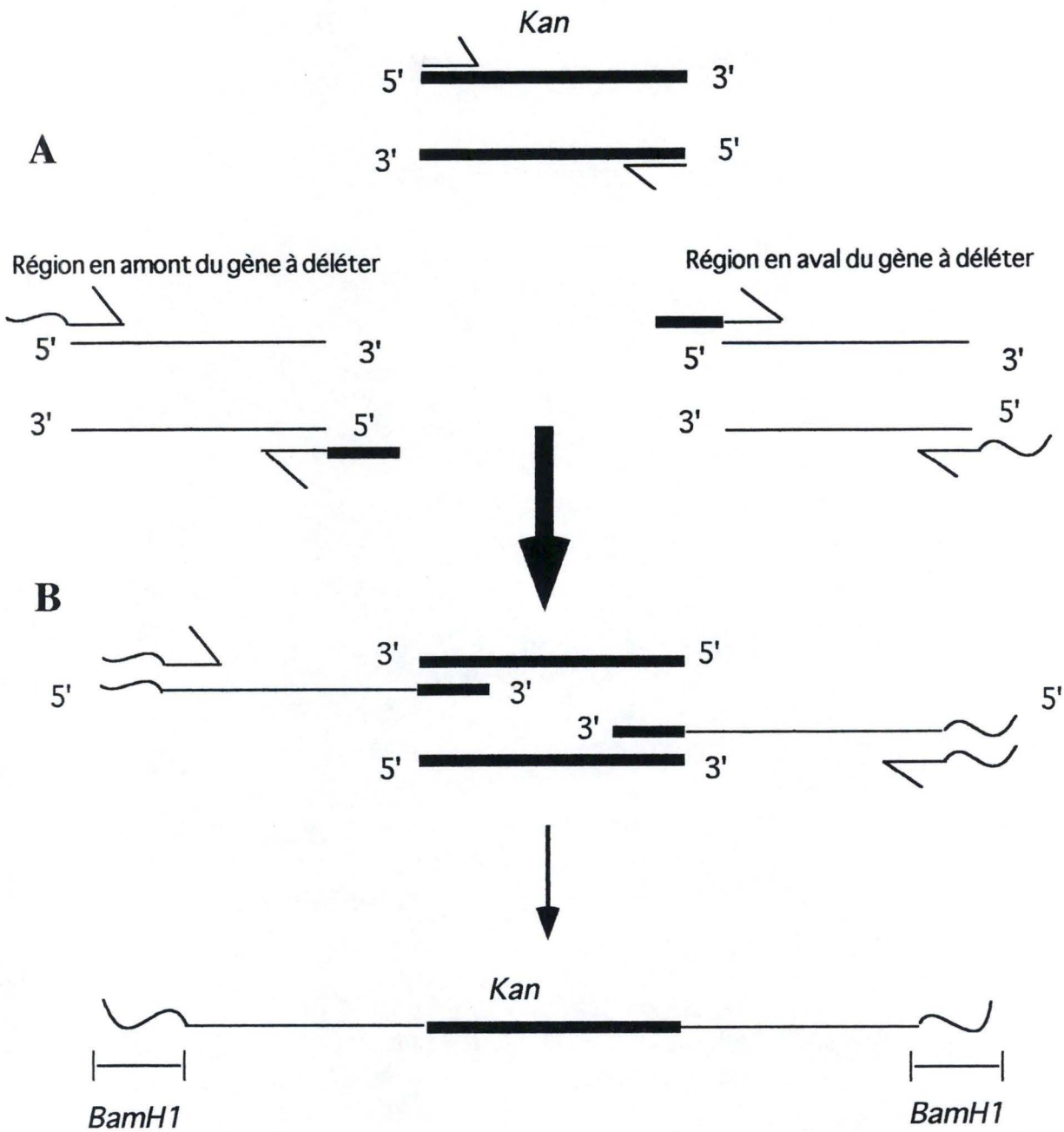
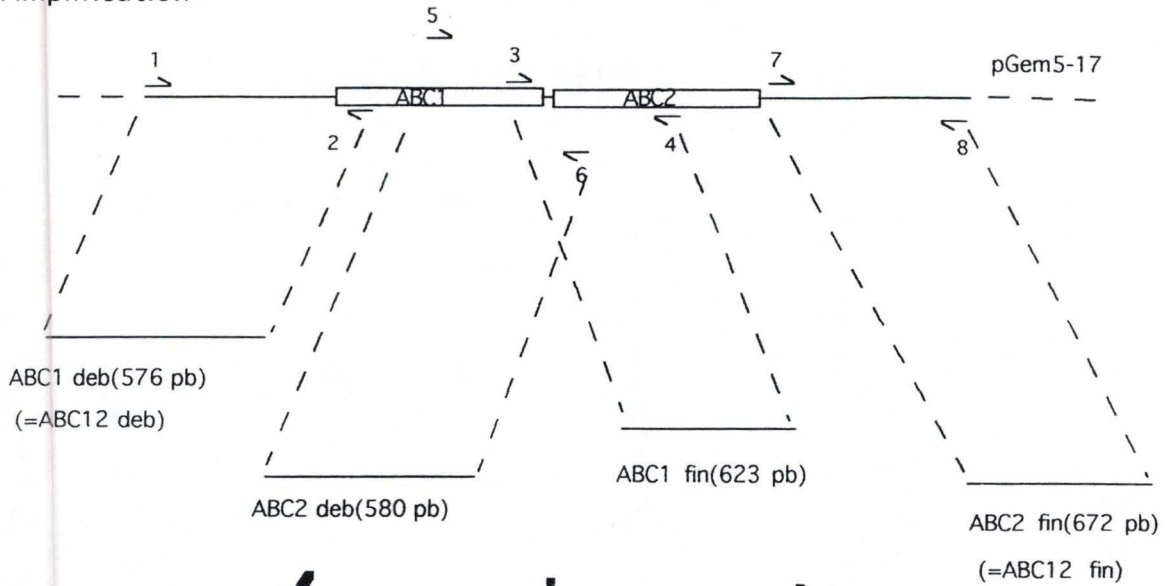


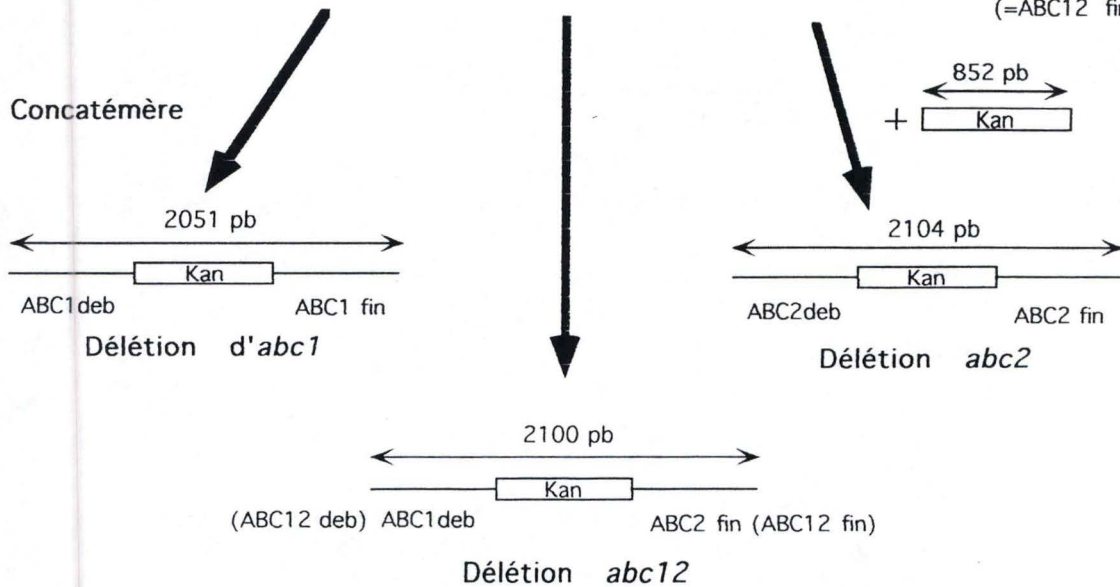
Fig. 6 : Création de la copie délétée du gène cible par PCR.

- A.** Amplifications indépendantes du gène *Kan* et des régions amont et aval du gène à déléter.
- B.** Amplification du concatémère suite à la mise en présence des trois amplicons dans une même réaction PCR.

A) Amplification



B) Concatémère



Légende :

- | | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 : ABC1 DEB1 | 2 : ABC1 DEB2 | 3 : ABC1 FIN1 | 4 : ABC1 FIN2 |
| 5 : ABC2 DEB1 | 6 : ABC2 DEB2 | 7 : ABC2 FIN1 | 8 : ABC2 FIN2 |

Fig. 7 : Représentation schématique des régions amplifiées séparément par PCR (A) et des trois possibilités de délétion (B).

d'éviter les effets polaires, c'est-à-dire un effet de la délétion de l'ORF cible sur l'expression des gènes situés de l'opéron en aval. Ceci assure que le phénotype du mutant soit le résultat de la délétion du gène cible. Pour ce faire, la cassette Apha-3 ne présente pas de terminateur de transcription et possède, à son extrémité 3', un site de liaison au ribosome et un codon d'initiation de la traduction. Ceci devrait éviter que la traduction des gènes situés en aval de Kan, ne soit perturbée par l'intégration de ce dernier.

Par ailleurs, cette cassette est dépourvue de promoteur. Afin de permettre l'expression correcte du gène Kan sous la dépendance du promoteur de l'opéron, des codons stop de traduction dans les trois phases de lecture ont été ajoutés en 5' du gène. Ceci évite la production de protéines fusionnées avec Kan.

Nous avons également utilisé une deuxième cassette Kan possédant cette fois-ci un promoteur mais dépourvu de terminateur de transcription (Kan pro). Signalons que le promoteur de Kan pro pourrait entraîner la surexpression des gènes situés en aval. Cette cassette a été choisie pour assurer néanmoins une expression du gène Kan dans le cas où l'autre cassette ne serait pas transcrite à un taux suffisant sous le contrôle du promoteur de l'opéron rfb. Le gène Kan pro est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pUC4K (Pharmacia).

Deux techniques ont été envisagées en parallèle pour construire la copie délétée du gène cible sur un plasmide : la PCR et le clonage.

B3. Création de la copie délétée du gène cible par PCR

Le principe de cette construction est d'amplifier par trois PCR indépendantes, les séquences situées en amont et en aval des gènes abc1 et abc2 (approximativement 500 pb) ainsi que le gène Kan3 (852 pb). Les trois fragments sont ensuite mis en présence dans la même réaction de PCR afin de former un concatémère. L'hybridation des trois fragments est rendue possible par la présence de séquences complémentaires à Kan3 dans les amorces spécifiques des fragments situés en amont et en aval du gène cible (Fig. 6). Cette construction devra ensuite être clonée dans le pKSOriT et introduite dans *Brucella*.

Cette stratégie permet de réaliser trois constructions, l'une correspondant à la délétion du gène abc1, une seconde à la délétion d'abc2 et une dernière à celle d'abc1 et abc2 simultanément (Fig. 7B).

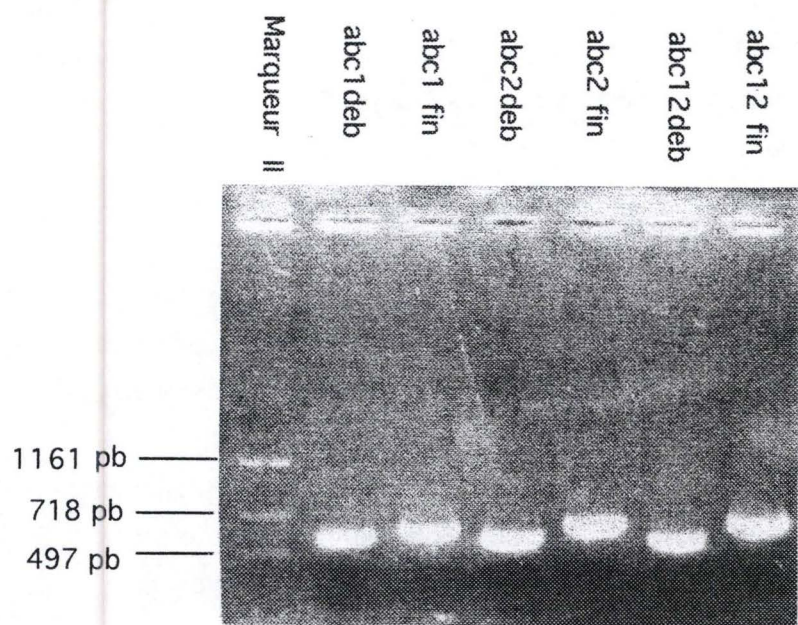


Fig. 8 : Amplification des régions 5' et 3' des gènes *abc1*, *abc2* et *abc12*.

Tailles attendues (en bp) : *abc1* deb (576), *abc1* fin (623), *abc2* deb (580), *abc2* fin (672), *abc12* deb (576), *abc12* fin (672).

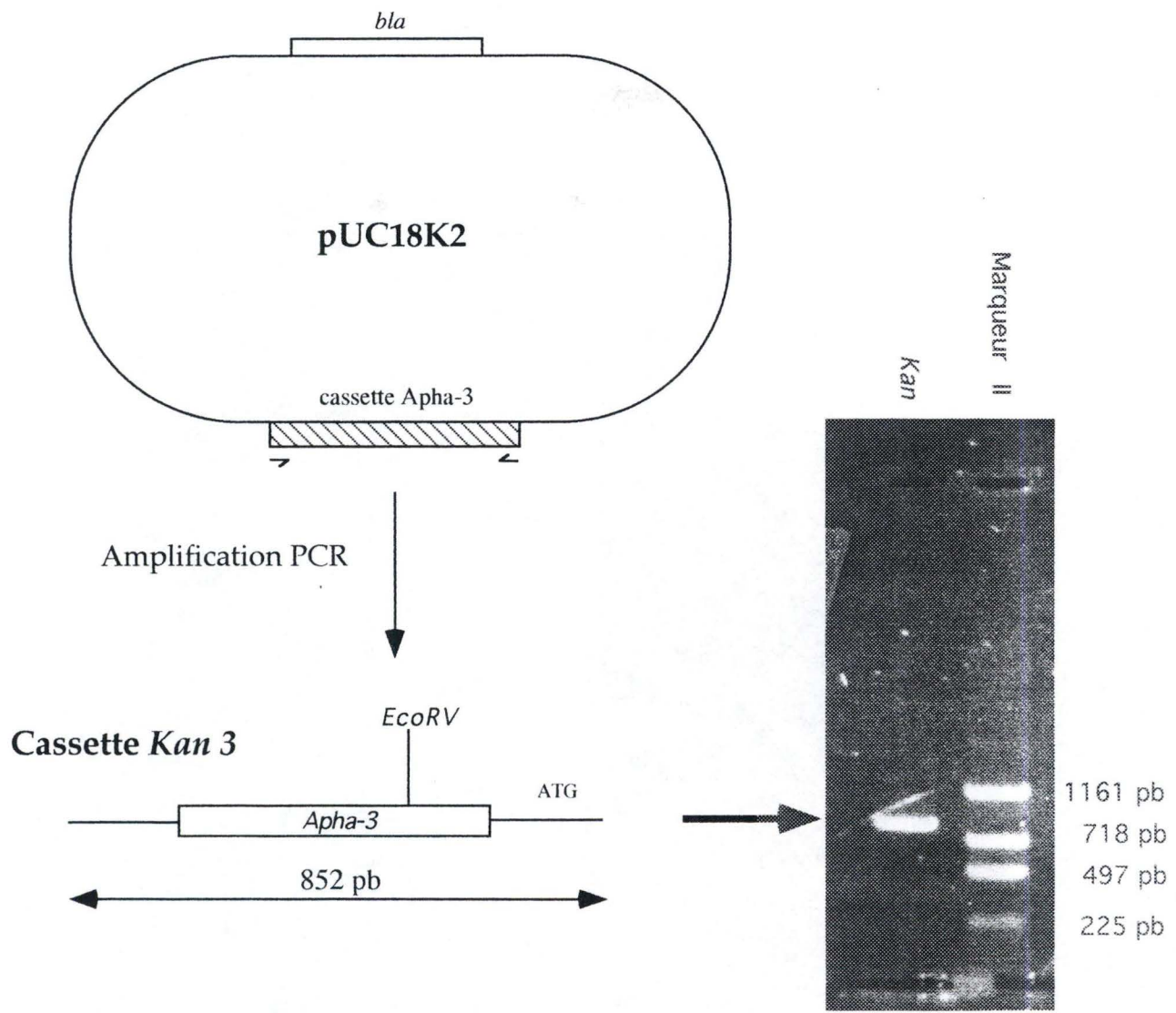


Fig.9 : Amplification de la cassette *Kan 3* (852 pb).

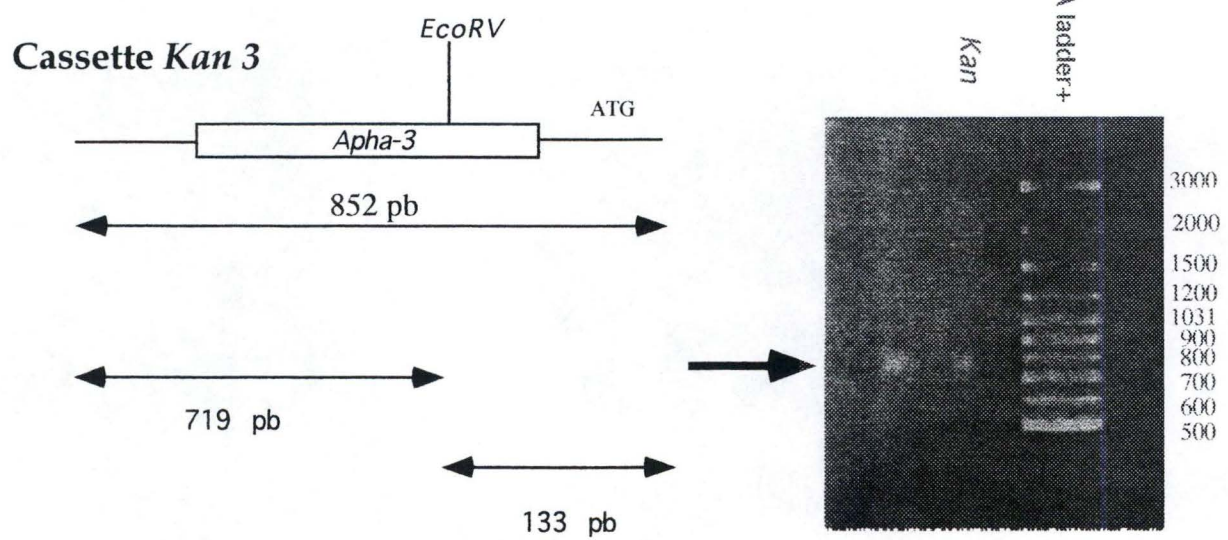


Fig.10 : Restriction *Eco RV* de la cassette *Kan 3* : la bande à 719 pb est visible mais pas celle à 133 pb.

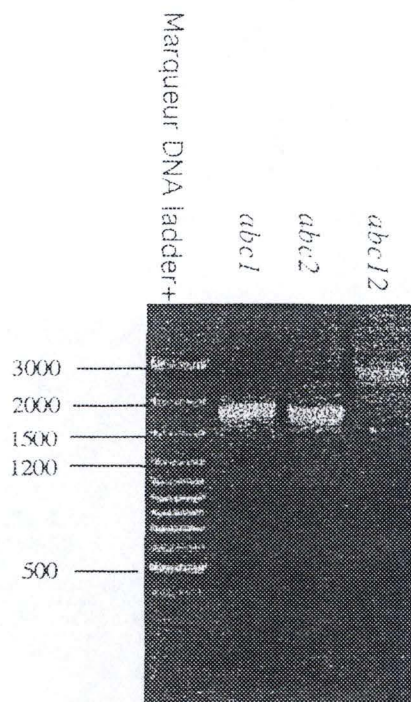


Fig.11 : Amplification des gènes *abc1* (1766 pb), *abc2* (1728 pb), *abc12* (2597 pb) à partir du plasmide pGem5-17.

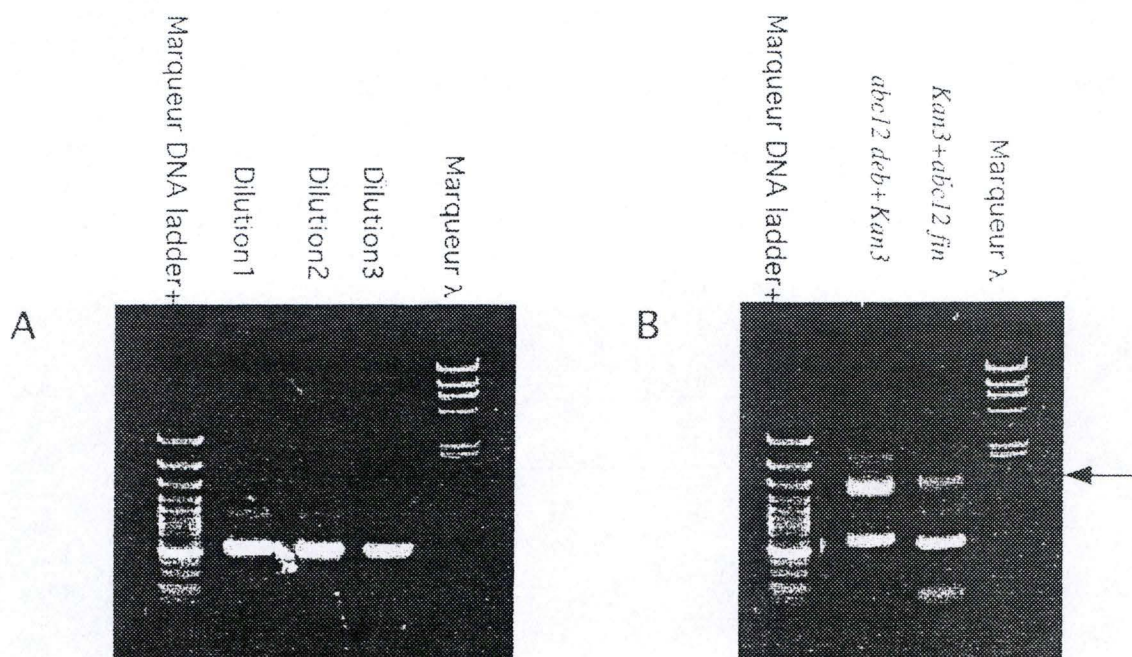


Fig. 12: A: Tentatives d'amplifications des trois fragments hybridés (*Kan3*, *abc12deb*, *abc12 fin*) en une seule étape par PCR: trois dilutions différentes ont été testées. Le fragment attendu de 2100 pb n'a pas été obtenu.

B/ Amplification de deux fragments hybridés (*abc12 deb+ Kan3*, *Kan3+ abc12 fin*). La flèche indique le fragment de taille attendue.

B3.1 Amplification séparée des trois fragments (Kan3 et les régions 5' et 3' des gènes abc1 et abc2)

Les régions 5' et 3' des gènes abc1, abc2 et abc12 (c'est-à-dire les deux gènes abc1 et abc2 ensemble) ont été amplifiées séparément (Fig. 7A et tableau 1 matériel et méthode), à partir du plasmide pGem5-17, construit au laboratoire, et contenant un insert de 15 kb dont 1537 pb correspondent aux gènes abc1 et abc2 (Fig. 8).

En parallèle, nous avons amplifié par PCR la cassette Kan3 (852 pb) provenant du plasmide pUC18K2 (fig 9). Une restriction diagnostique EcoRV du fragment amplifié, a confirmé qu'il correspondait bien à la cassette Kan attendue (719 et 133 pb) (Fig. 10).

La polymérase PWO a été utilisée car elle est plus fiable (« proofreading ») et elle n'ajoute pas d'adénine à l'extrémité des fragments qui pourraient perturber l'étape ultérieure d'hybridation des trois fragments.

B3.2 Construction en une seule étape de la copie délétée du gène cible

La dynazyme a été utilisée dans les amplifications PCR qui suivent. Comme celle-ci ajoute des adénines protrudentes aux extrémités des fragments amplifiés, elle nous permettra de sous-cloner la construction obtenue dans le pGEM-T (possédant des thymines saillantes). Les sites BamHI présents au niveau des amorces spécifiques des deux régions 5' et 3' (voir Fig. 6) nous permettront par la suite de sous-cloner le concatémère au site BamHI du pKSOriT.

Afin de définir les conditions optimales de PCR pour réaliser l'hybridation des trois fragments, une amplification des gènes abc1, abc2 et abc12 à partir du plasmide pGem5-17 a été réalisée en parallèle. En effet, l'amplification des gènes abc1, abc2 et abc12 utilise les mêmes amorces que celles utilisées pour l'amplification du concatémère. De plus, les tailles obtenues sont similaires à celle attendue pour le concatémère (Fig. 7, cfr matériel et méth.). Une température d'hybridation de 60°C et un temps d'élongation de 2 min. 30 sec. permettent une amplification efficace et spécifique des trois gènes (Fig. 11).

Dans la suite du travail, nous nous sommes focalisés sur l'amplification du concatémère.

Sur ces bases, les trois fragments (régions 5' et 3' d'abc12 et Kan3) ont été mis en présence pour être amplifiés en concatémère.

Des quantités comprises entre de 5 ng et 50 ng pour le gène Kan 3 et entre 2 ng et 20 ng pour les fragments 5' et 3' d'abc12 ont été utilisées afin d'avoir un excès 2:1 du fragment Kan3. Le résultat de l'amplification de trois dilutions différentes est présenté à la Fig. 12 A : après amplification, aucune bande de taille attendue (2100 pb) n'a été obtenue.

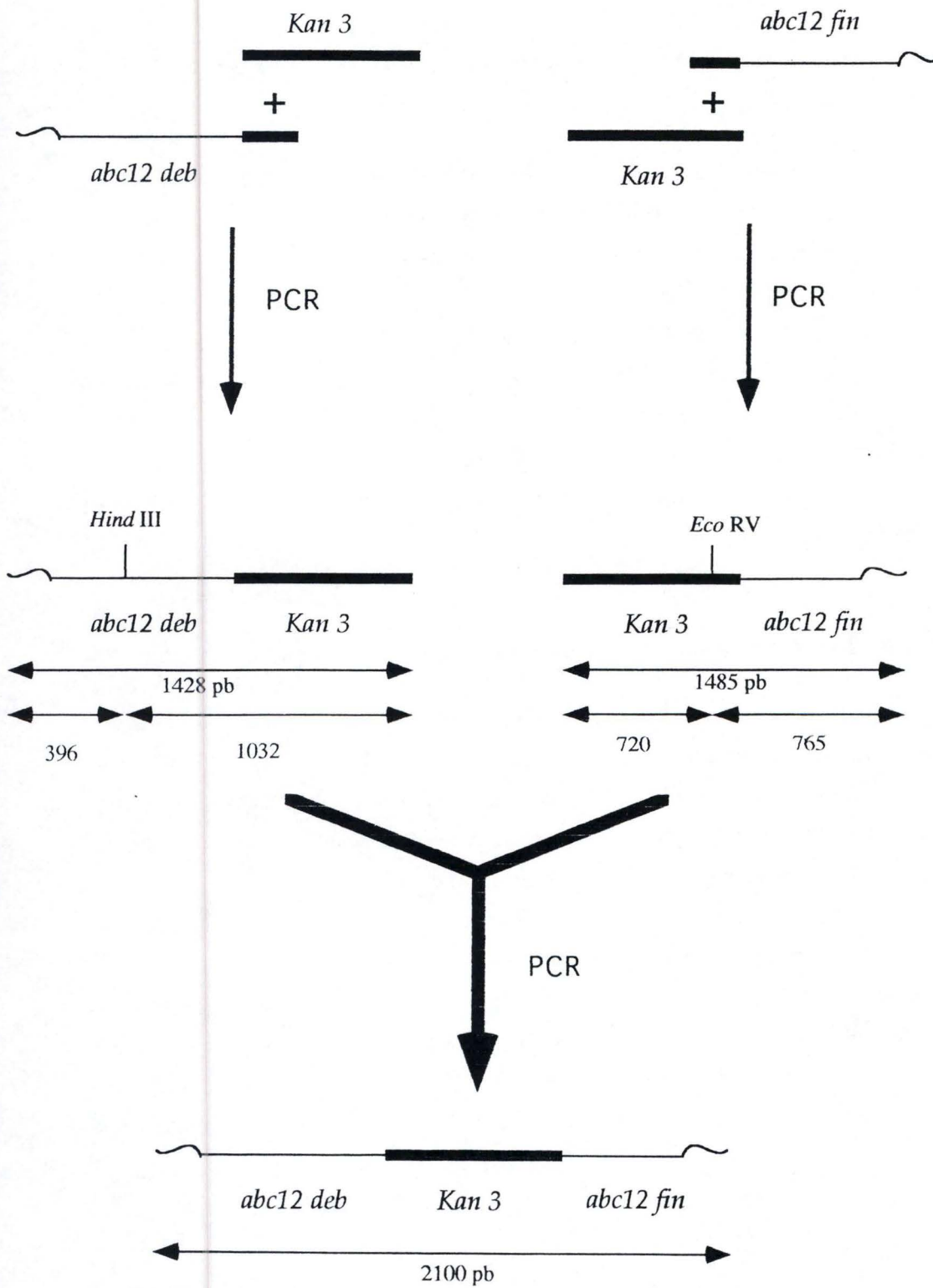


Fig.13 : Construction en deux étapes de la copie délétée du gène cible :

- Amplification séparée de *abc12 deb* + *Kan 3* et de *Kan 3* + *abc12 fin*.
- Hybridation des fragments et amplification.

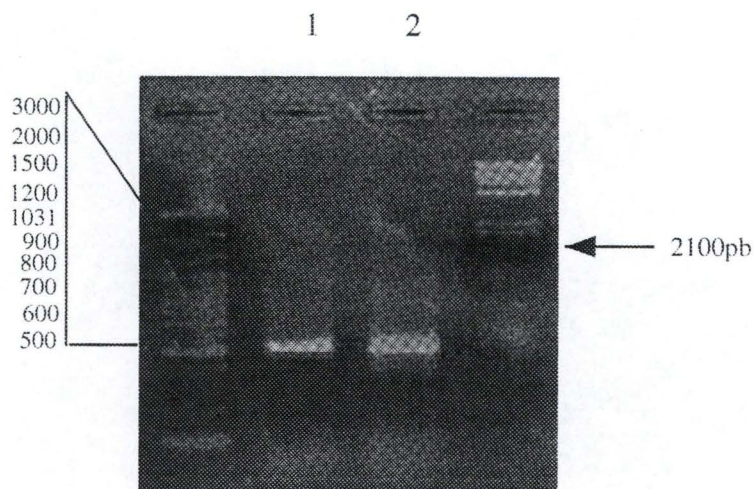


Fig. 14: Tentatives d'hybridation et d'amplification par PCR des fragments *abc12 deb+ Kan* et *Kan+abc12 fin*. La bande attendue de 2100 pb n'est pas présente. Les tailles observées sont d'environ 500 pb.

1: 200 ng de *abc12deb+Kan3* et 150 ng de *Kan3+abc12 fin*.

2: 20 ng de *abc12 deb+Kan3* et 15 ng de *Kan3+abc12 fin*.

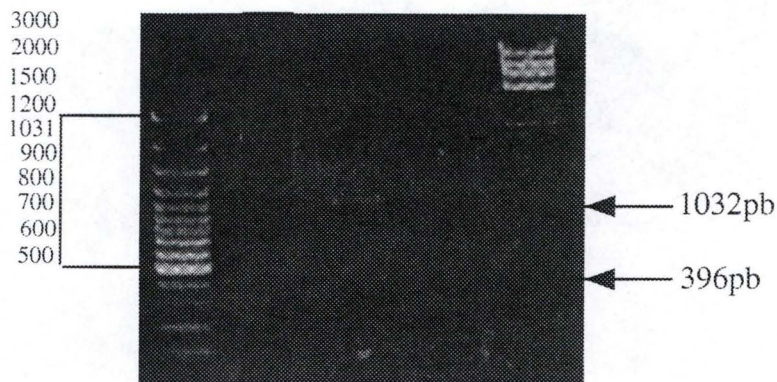
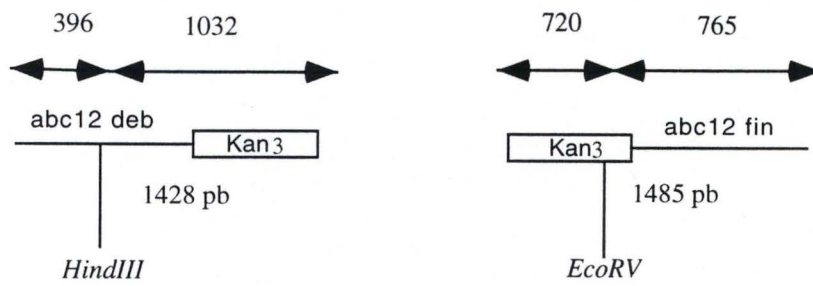


Fig. 15 : Restrictions diagnostiques de *abc12+Kan 3(HindIII)* (1032, 396 pb) et de *Kan 3+abc12 fin (EcoRV)* (720, 766 pb)(non visibles sur la photo).

Néanmoins, l'absence d'amplification ne peut être expliquée par des conditions de PCR inappropriées, ni par un déficit dans la quantité d'ADN.

B3.3 Construction en deux étapes de la copie délétée du gène cible

L'amplification des trois fragments en une seule fois étant critique, nous avons tenté de la réaliser en deux étapes (Fig. 13). Dans un premier temps, Kan3 avec abc12 deb et d'autre part Kan 3 avec abc12 fin ont été amplifiés par PCR. Les deux amplicons ont ensuite été réunis pour être amplifiés en concatémère.

La première étape a été effectuée dans les mêmes conditions PCR que précédemment (temp. d'hybridation de 60°C et un temps d'élongation de 2 min. 30 sec.) avec une quantité de 10 ng pour le gène Kan 3, et de 20 ng pour les séquences abc12 deb et abc12 fin. La photo du gel d'agarose à la figure 12 B montre que les deux bandes attendues sont présentes mais d'autres bandes aspécifiques sont également visibles. Les bandes de tailles attendues ont été récupérées du gel.

Lors de la seconde étape une réaction PCR a été réalisée afin d'amplifier en concatémère les deux fragments (abc12 deb+Kan3 et Kan3+abc12 fin) mis en présence. La région complémentaire entre les deux fragments correspond au gène Kan3 (852 pb). Dans ce cas, aucune bande de taille attendue n'a été obtenue (Fig. 14).

Les fragments utilisés (Kan3+abc1 deb et Kan3+abc2 fin) ont alors été vérifiés successivement par restriction diagnostique et par PCR. Le profil de restriction pour abc12 deb+Kan3 (restreint HindIII) est correct; par contre le profil de restriction (EcoRV) de Kan3+abc12 fin n'est pas correct bien que peu visible sur le gel (Fig. 15).

Par PCR, à l'aide d'amorces internes (voir tableaux ci-dessous), nous avons montré que le fragment abc12 deb+Kan3 contient le gène Kan 3 et la région amont d'abc12; pour le fragment Kan3+abc12 fin aucune amplification spécifique n'a été mise en évidence (fig 16).

Fragment *abc12 deb+Kan3*

amorces utilisées	région amplifiée	résultat de l'amplification
ABC1 deb1	<i>abc12 deb</i>	+
ABC1 deb2		
Kan amont	<i>Kan</i>	+
Kan aval		



- 1 ABC1 deb1
- 2 ABC 1 deb 2
- 3 Kan amont
- 4 Kan aval
- 5 ABC1 fin 1
- 6 ABC 1 fin 2

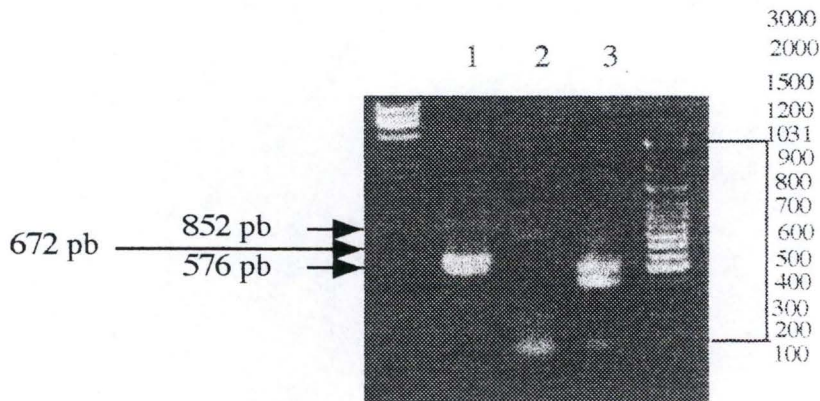


Fig.16 : Vérification des fragments *abc12 deb+Kan 3* et *Kan3+abc12 fin* par PCR.

- La piste 1 correspond à l'amplification de la bande *abc12 deb* (576 pb) à partir du fragment *abc12 deb+Kan 3*.
- La piste 2 correspond à l'amplification du gène *Kan 3* à partir du fragment *abc12 deb+Kan3*. La bande attendue (852 pb) est présente mais il y a également eu amplification de bandes aspécifiques.
- La piste 3 montre la tentative d'amplification de la portion *abc12 fin* (672 pb) à partir du fragment *Kan 3+abc12 fin*, sans succès

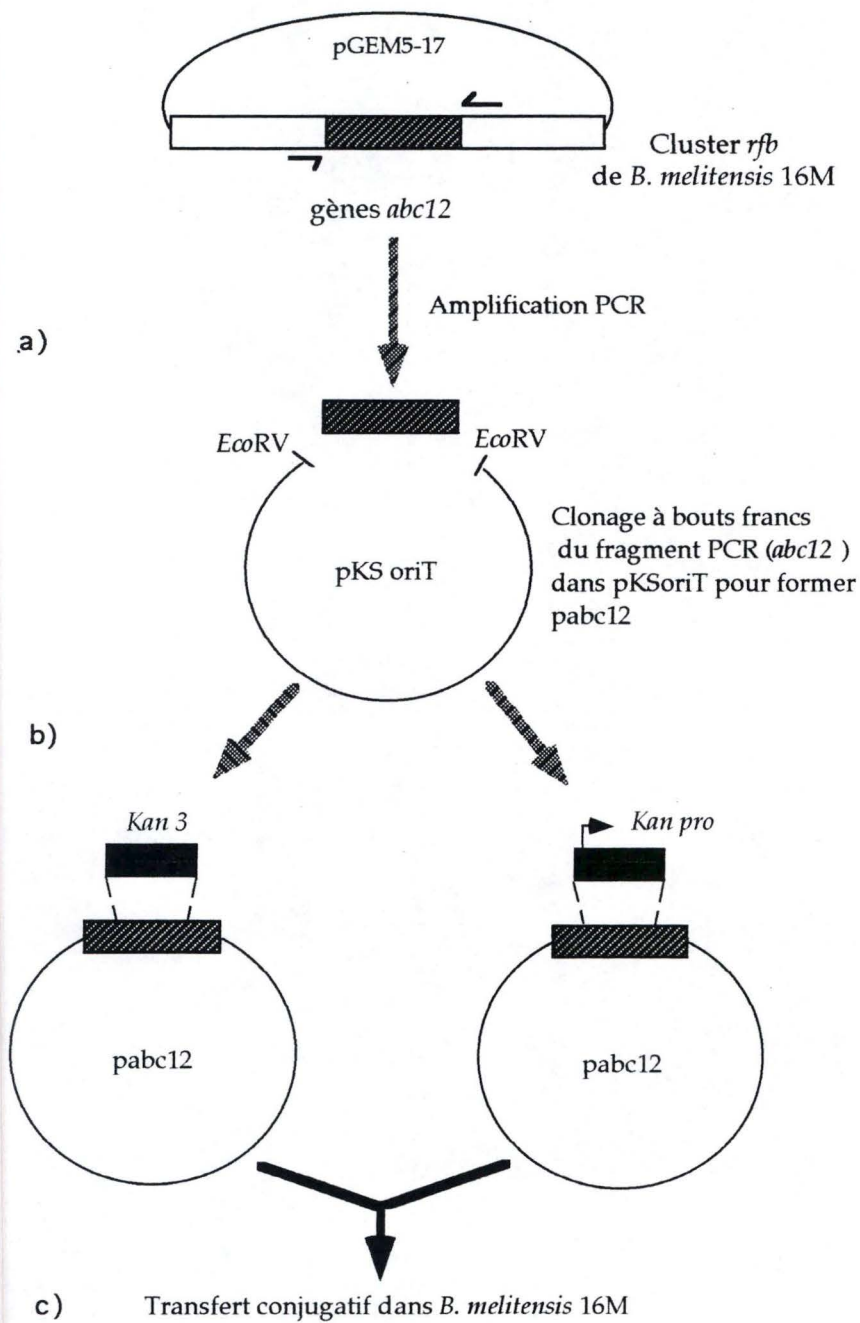


Fig. 17 : Stratégie de délétion des gènes *abc12* par restrictions-ligations.

- Construction du plasmide *pabc12* par clonage.
- Délétion de fragments d'*abc12* et ligation de la cassette *kan 3* ou du gène *kan pro*.
- Transfert conjugatif dans *B. melitensis* 16M et sélection des mutants rough.

Fragment Kan+abc12 fin

amorces utilisées	région amplifiée	résultat de l'amplification
ABC2 fin1	abc12 fin	-
ABC2 fin2		
Kan amont	Kan	-
Kan aval		

Il semblerait que l'amplification par PCR du gène Kan 3 avec la région située en aval d'abc12 soit une étape critique. La modification des paramètres de la réaction PCR (temp. d'hybridation de 64°C et temps d'élongation de 3 min) n'a pas permis d'augmenter la spécificité de la réaction. Il est dès lors impossible d'amplifier un concatémère à partir de ces fragments.

Les amplifications PCR ont été arrêtées à ce stade car la construction a été obtenue par restrictions-ligations.

B3.4 Résumé

La technique PCR ne nous a pas permis d'obtenir la construction attendue : le gène Kan3 flanqué des séquences 5' et 3' d'abc12. Nous avons testé plusieurs stratégies :

- * plusieurs tentatives d'hybridation des trois fragments mis en présence en utilisant différentes quantités d'ADN ont été réalisées.
- * une approche en deux étapes pour la réalisation du concatémère amont d'abc12-Kan-aval d'abc12 a été entreprise.
- * une augmentation de la température d'hybridation pour augmenter la spécificité de la fixation des amorces a été tentée.

B4. Création de la copie du gène cible par restriction-ligation

Le principe de cette approche est de cloner le gène d'intérêt dans le plasmide pKSOriT et, dans la seconde étape, de remplacer la majeure partie de l'orf par le gène de résistance à la kanamycine. Cette construction peut alors être introduite dans *Brucella* pour le « gene replacement » (Fig. 17).

Fragment *abc12* amplifié par PCR

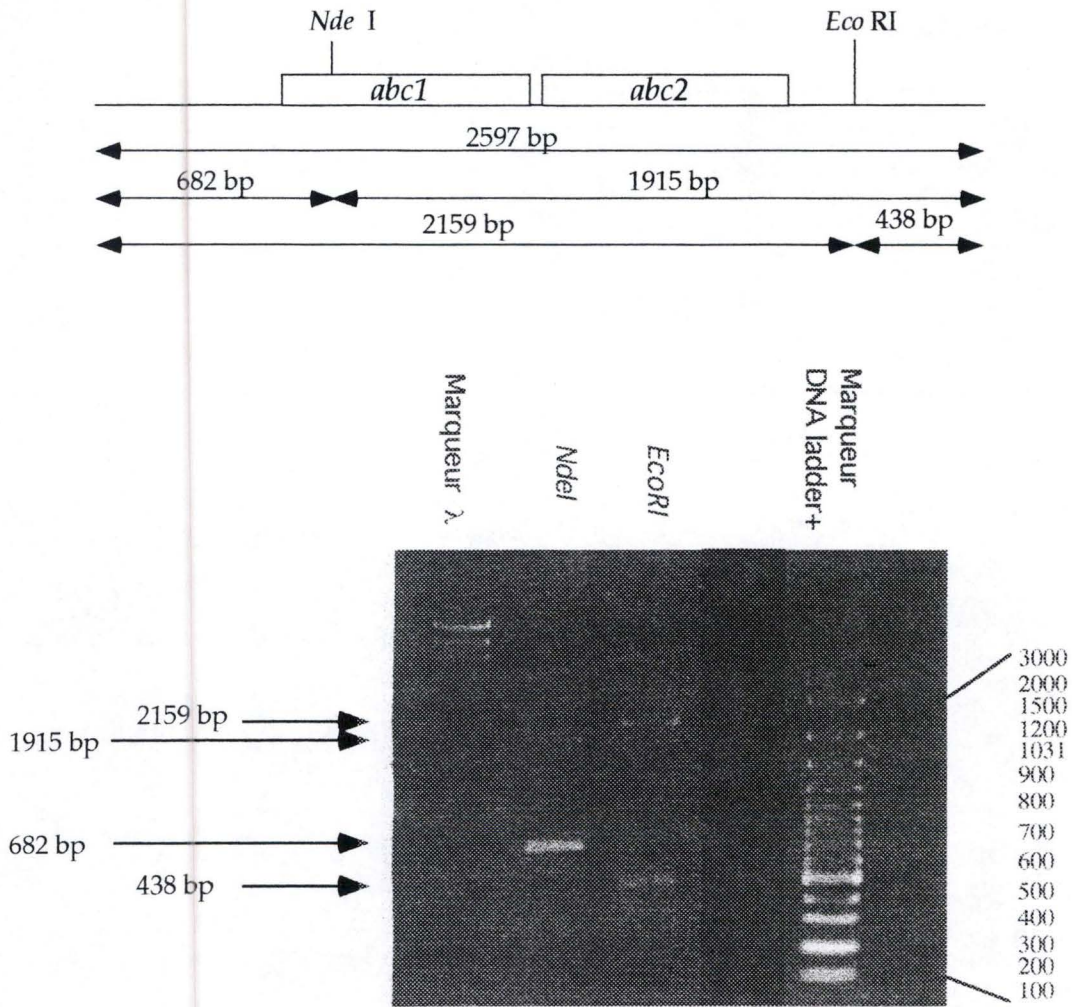


Fig. 18 : Restrictions diagnostiques *Nde* I et *Eco* RI de l'amplification PCR d'*abc12*.

Tailles obtenues pour *Nde* I : 682, 1915 pb.

Eco RI : 438, 2159 pb.

restriction de la matrice (pabc12)	« fill in »	étape de purification	insert	résultat
NdeI-NruI	+	+	Kan Kan pro	- -
EcoRV-NruI	-	+	Kan Kan pro	- -
EcoRV-NruI	-	-	Kan Kan pro	+ +

Tableau 1 : Tableau résumant les différentes tentatives effectuées pour obtenir la copie du gène cible déléetée par restriction-ligation.

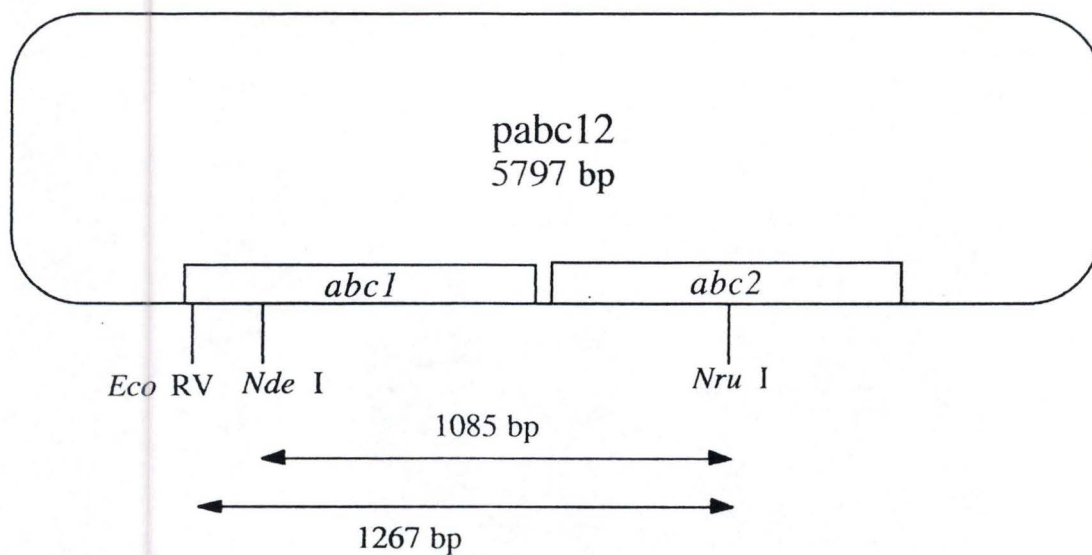


Fig. 21 : Carte de restriction du plasmide pabc12 reprenant les sites de restrictions des endonucléases utilisées pour exciser la majeure partie des gènes abc12.

B4.1 Construction du plasmide pabc12

Un fragment de 2597 pb contenant les gènes *abc1* et *abc2* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pGem5-17. Deux restrictions diagnostiques du fragment *abc12* avec les enzymes *NdeI* et *EcoRI* ont été réalisées. Les tailles attendues ont été obtenues, respectivement : 682 et 1915 pb; 438 et 2159 pb (Fig. 18). Le fragment amplifié a été purifié et introduit dans le plasmide pKSOriT restreint *EcoRV*. *EcoRV* est une enzyme de restriction qui crée des bouts dits « francs ». Pour réaliser la ligation, des quantités en ADN comprises entre 200 et 500 ng pour le fragment PCR et entre 20 et 50 ng pour le plasmide linéarisé ont été utilisées (rapport insert/matrice > ou = à 10).

Les mélanges de ligation ont été transformés dans la souche d'*E. coli* DH5 a. Les clones ont été sélectionnés sur milieux LB+Xgal, IPTG, Amp. Dans ces conditions, les clones blancs contiennent en théorie un plasmide portant l'insert. 20 colonies blanches ont été mises en culture, l'ADN plasmidique a été extrait par miniprep et restreint par *HindIII*. Après électrophorèse sur gel d'agarose, le résultat de la restriction *HindIII* montre qu'un seul clone (n°2) correspond au plasmide contenant l'insert (Fig. 20). Cette restriction nous permet également de connaître l'orientation de l'insert par rapport à *lacZ*. Nous pouvons ainsi constater que l'insert est orienté en sens inverse par rapport au sens de transcription de *lacZ* (Fig. 19). Des restrictions diagnostiques du clone 2 avec l'enzyme *BamHI* et les enzymes *NdeI-NruI* confirment la présence de l'insert *abc12* dans le pKSOriT.

En conclusion, le fragment portant les deux gènes *abc1* et *abc2* a été introduit dans le plasmide pKSOriT (le clone 2 est nommé pabc12).

B4.2 Délétion des ORFs *abc1* et *abc2* par introduction d'un gène de résistance à la kanamycine

Les différents essais effectués sont résumés dans le tableau 2.

B4.2.1 Excision des gènes *abc1* et *abc2* par restriction *NdeI-NruI*

La majeure partie des deux ORFs *abc1-abc2* a été excisée par double restriction *NdeI-NruI* du plasmide pabc12 (Fig. 21 et 22). L'extrémité générée par *NruI* est franche et l'extrémité protrudante *NdeI* a été rendue franche en réalisant une étape de « filling » à l'aide de la T4 DNA polymérase. Suite à la restriction *NruI*, le gène situé en aval de *Kan3* (fin d'*abc2*) est placé en phase avec le codon d'initiation situé en 3' de *Kan3* (Fig.23).

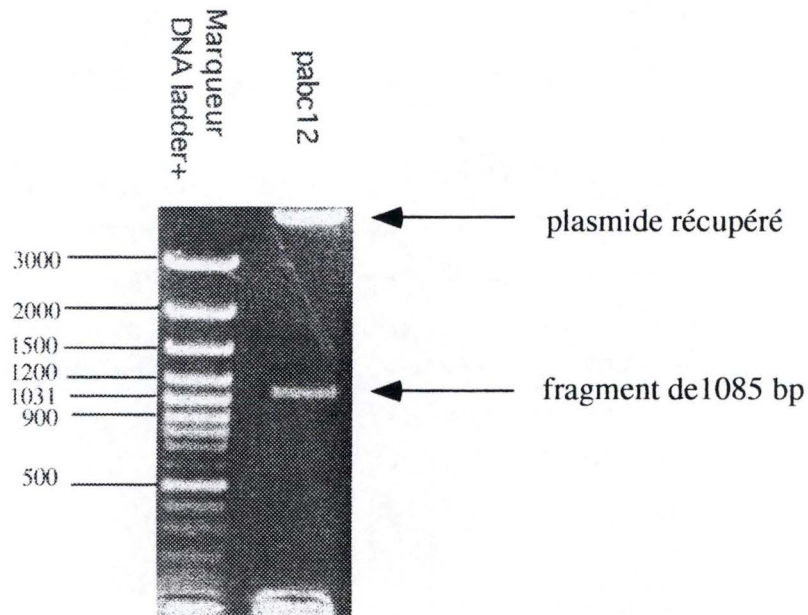


Fig.22 : restriction *Nde* I-*Nru* I du plasmide pabc12 (cfr. Fig. 21).
Le fragment correspondant au plasmide linéarisé (4712 bp) sera récupéré et purifié.

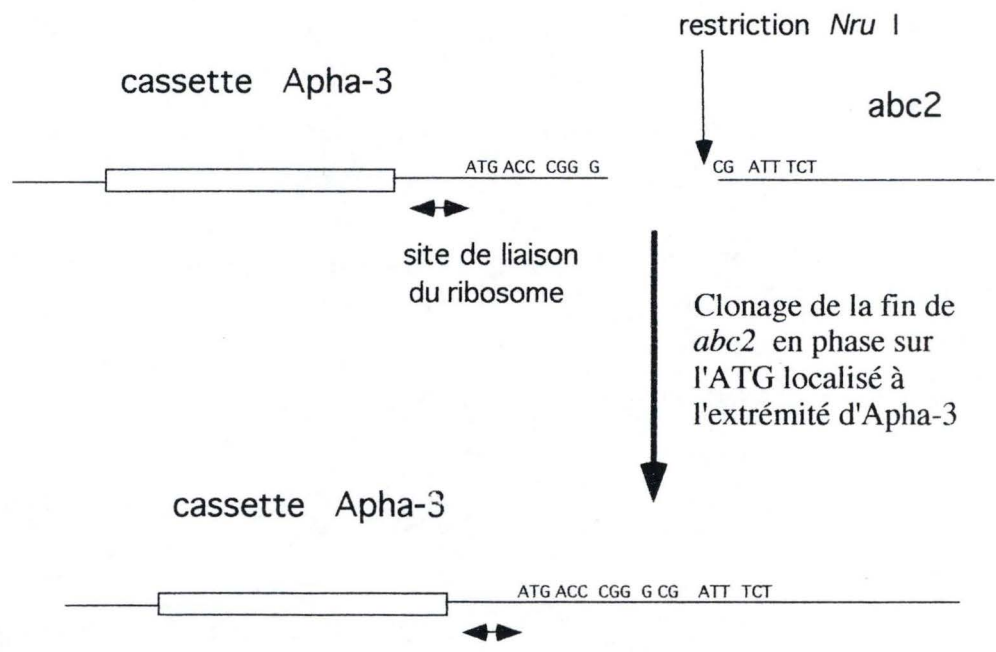


Fig. 23 : La restriction *Nru* I permet de cloner la fin du gène *abc2* situé en aval de *Kan 3* (*Apha-3*) en phase avec le codon d'initiation situé en 3' de *Kan 3*.

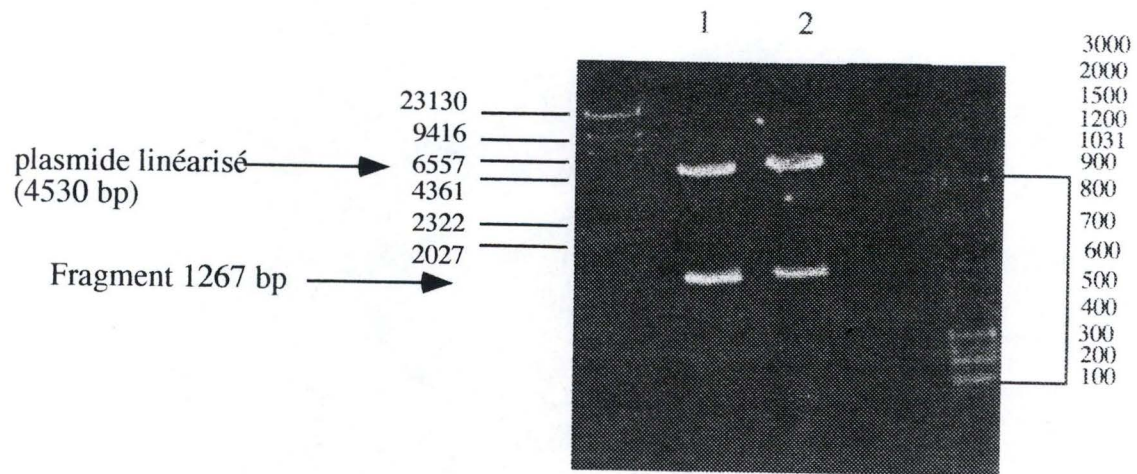


Fig. 24 : Restriction *EcoRV-NruI* du plasmide pabc12 (pistes 1 et 2)(cfr. Fig. 22).
Le plasmide linéarisé (4530 bp) a été récupéré et purifié.

Ceci devrait éviter un effet de mutation polaire, ce qui pourrait fausser l'analyse du phénotype du mutant attendu.

Le plasmide pabc12 restreint NdeI-NruI et fillé (taille : 4712 pb), a été purifié sur gel d'agarose.

Quatre ligations ont été effectuées, deux avec le gène Kan3 et les deux autres avec le gène Kan possédant un promoteur propre (Kan pro) (rapport matrice/insert d'environ 1/10).

Les mélanges de ligations ont été transformés dans des cellules DH5a et étalés sur milieux sélectifs (insert Kan3 : LB+Amp; insert Kan pro : LB+Amp et Kan). Seule la ligation avec Kan3 a conduit à l'isolement de clones. L'ADN de ces clones a été restreint par HindIII. Néanmoins, aucun clone ne contenait le gène Kan3. L'étape de « filling » pourrait également être limitante pour la ligation.

B4.2.2 Excision des gènes *abc1* et *abc2* par restriction *EcoRV-NruI*

Pour éviter cette étape de « filling », la restriction NdeI a été remplacée par une restriction EcoRV. Le plasmide pabc12 a donc été restreint par EcoRV et NruI. Les résultats de ces restrictions (1267, 4530 pb) sont visibles à la Fig. 24.

Le plasmide restreint (4530 pb) a ensuite été récupéré sur gel.

Plusieurs ligations ont alors été réalisées entre le plasmide et le gène Kan3 d'une part et Kan pro d'autre part, sans succès. Ces ligations faisaient intervenir des quantités en ADN compris entre 100 et 400 ng pour le plasmide; entre 400 et 800 ng pour le gène Kan3, et entre 300 et 900 ng pour Kan pro (ratio matrice-insert de 1:10 au minimum).

Dans ces conditions, nos tentatives de clonage du gène Kan dans le plasmide pabc12 restreint EcoRV-NruI sont restées sans succès.

Des essais de ligation avec le plasmide seul ont été réalisés et ont montré que le plasmide ne se ligait pas sur lui-même.

Nous avons dès lors soupçonné les étapes de purification du fragment à partir du gel d'être à la base de ce problème. Nous pensons en effet que l'exposition aux UV ou le passage sur la colonne de purification, endommagerait les extrémités du plasmide restreint.

Un nouvel essai a alors été effectué. Une double restriction EcoRV-NruI du plasmide pabc12 a été réalisée (1,5 mg). L'étape de purification a été évitée et le mélange de restriction a été extrait en phénol-chloroforme, puis précipité à l'éthanol.

Quatre ligations (trois avec le gène Kan pro et une avec Kan3) ont été réalisées dans lesquelles le rapport plasmide-insert est de 1:12.

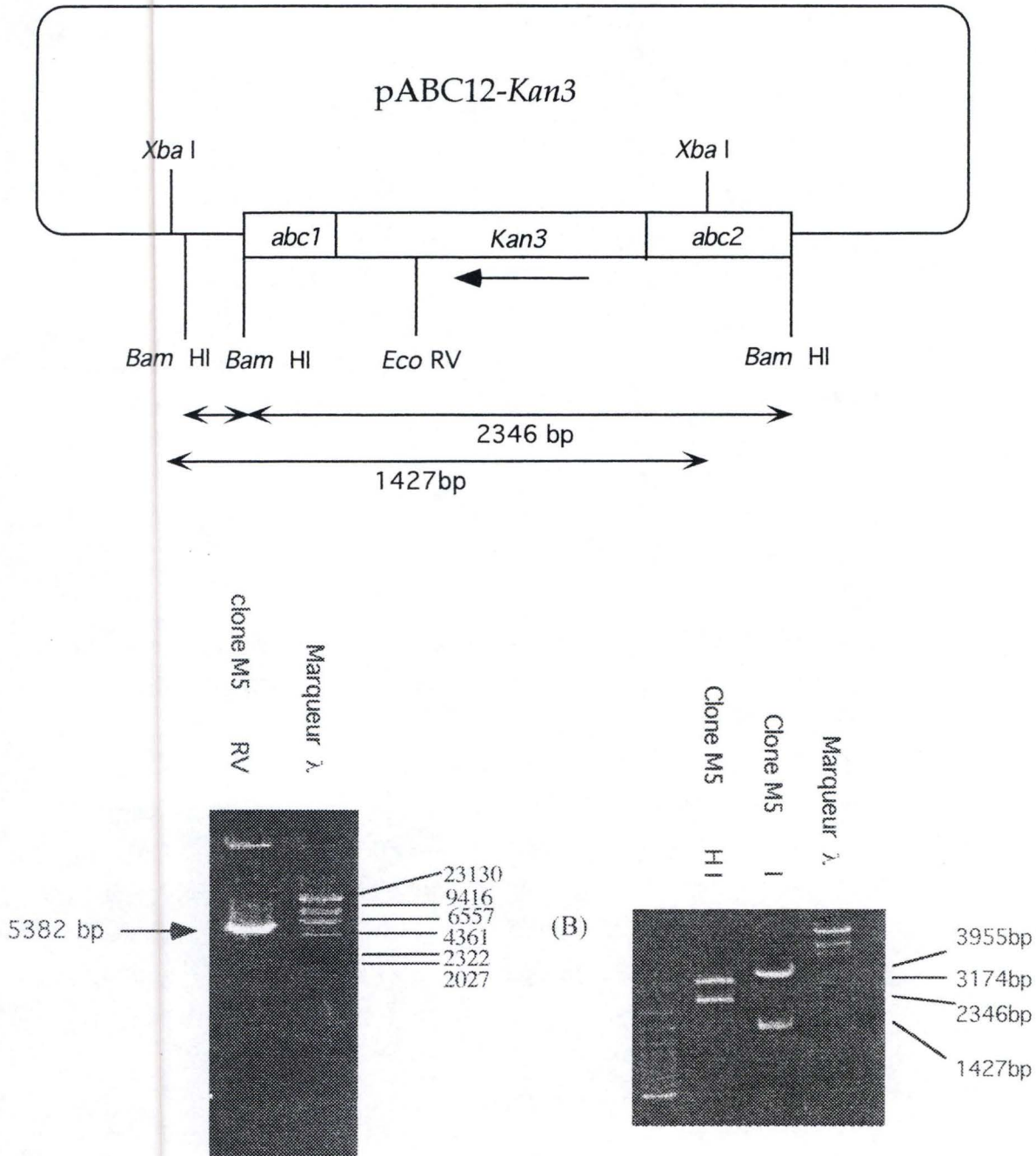


Fig.25 : restrictions diagnostiques du clone M5 ayant reçu le gène *Kan 3*.
Tailles obtenues (A) : *Eco* RV : 5382 pb.

(B) : *Bam* HI : 26, 2346, 3174 pb.

Xba I : 1427, 3955 pb.

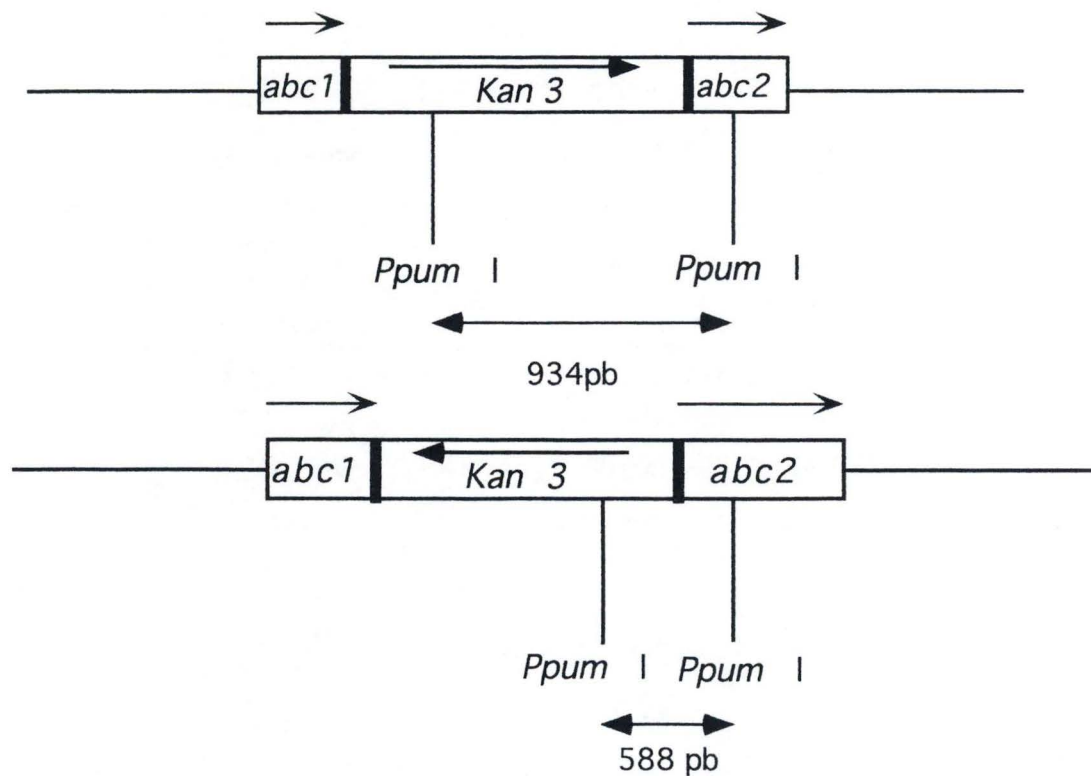


Fig. 26 : Orientation de *Kan 3* par rapport au sens de transcription d'*abc12*.

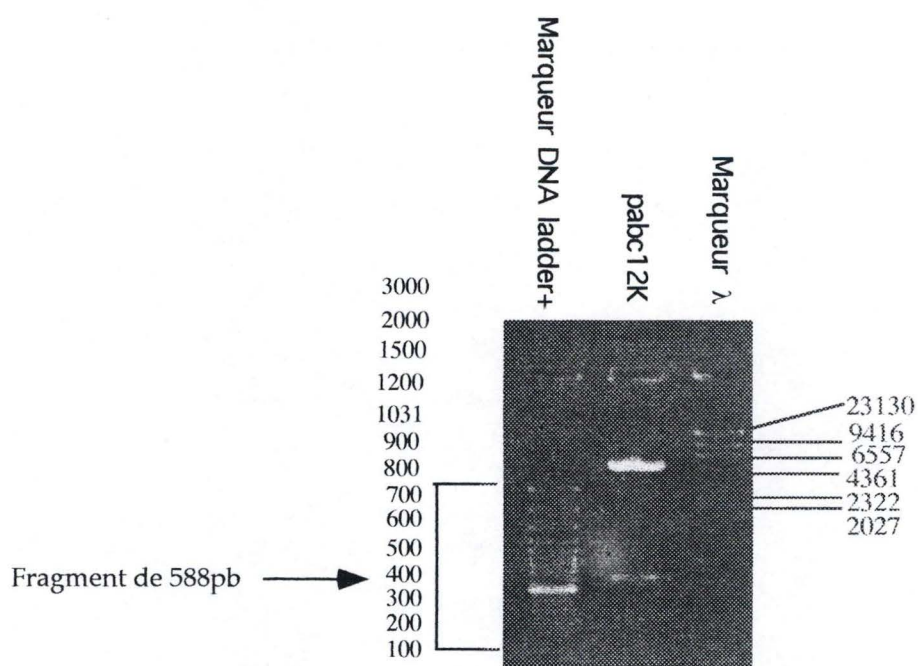
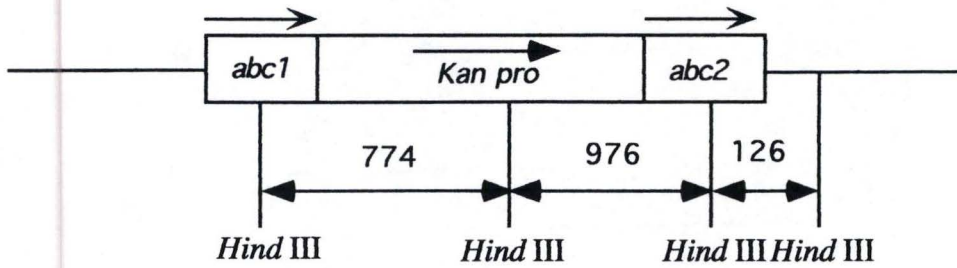


Fig.27 : Restriction *PpumI* du plasmide pabc12K (588, 4794 pb) afin de connaître l'orientation de *Kan* par rapport aux gènes *abc12*.

- *Kan pro* orienté dans le sens de transcription des gènes *abc12*



- *Kan pro* orienté en sens inverse par rapport au sens de transcription de *abc12*

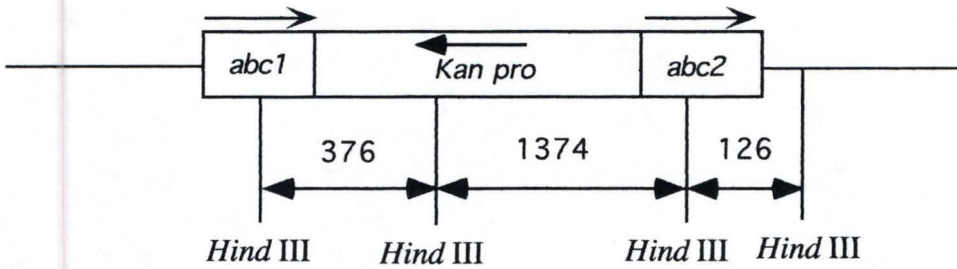


Fig. 28 : Restriction *Hind* III permettant de connaître l'orientation de *Kan pro* par rapport aux gènes *abc1* et *abc2*.

Les mélanges de ligations ont été transformés dans des cellules DH5a qui ont été étalées sur milieu sélectifs LB+Amp+Kan pour les trois ligations avec le gène Kan pro et LB+Amp pour Kan3.

L'ADN des clones obtenus a été extrait et restreint par HindIII. Cette restriction permet de mettre en évidence la présence du gène Kan3, et l'orientation de Kan pro.

Trois constructions ont été obtenues :

-La première correspond à l'introduction du gène Kan3 dans la matrice pabc12 restreint EcoRV-NruI(pabc12K). Pour confirmer cela, trois restrictions supplémentaires ont été réalisées à l'aide des enzymes EcoRV, XbaI et BamHI (Fig. 25).

Afin de connaître l'orientation de Kan, l'enzyme de restriction PpuMI a été utilisée (Fig. 26). Kan3 est orienté en sens inverse par rapport au sens de transcription d'abc12 (Fig. 27). Cette construction a été abandonnée car, lors de la recombinaison dans Brucella, le gène Kan3 sera intégré en sens opposé par rapport au promoteur du cluster rfb et ne sera pas exprimé; nous ne pourrons donc pas sélectionner les double recombinants.

-Deux autres constructions ont été obtenues, correspondant au gène Kan pro orienté dans les deux sens par rapport au sens de transcription de abc12 (Fig.28). Des restrictions supplémentaires avec SmaI, XhoI, ClaI, et XbaI, ont permis de vérifier la présence du gène Kan pro dans les deux orientations (Fig. 29).

Ces deux dernières constructions appelées pDabc12 et pDabc12Inv (Kan pro orienté en sens inverse par rapport aux gènes abc12) ont été utilisées pour la conjugaison. Nous pourrons ainsi comparer l'expression et l'effet du gène Kan pro dans les deux orientations.

B4.2.3 Vérification des constructions par séquençage

Un séquençage a été réalisé à l'aide des amorces forward et reverse s'hybridant sur la matrice plasmidique de pDabc12 et pDabc12Inv aux extrémités 5' du fragment abc1 deb et 3' du fragment abc2 fin montre la présence du gène Kan pro et de l'absence de stop de traduction dans les gènes situés en amont et en aval du gène de Kan; stop qui aurait pu être introduit lors des amplifications PCR. Le séquençage complet du gène Kan pro n'a pas été effectué puisque la résistance des clones à la kanamycine fournit la preuve que le gène est fonctionnel.

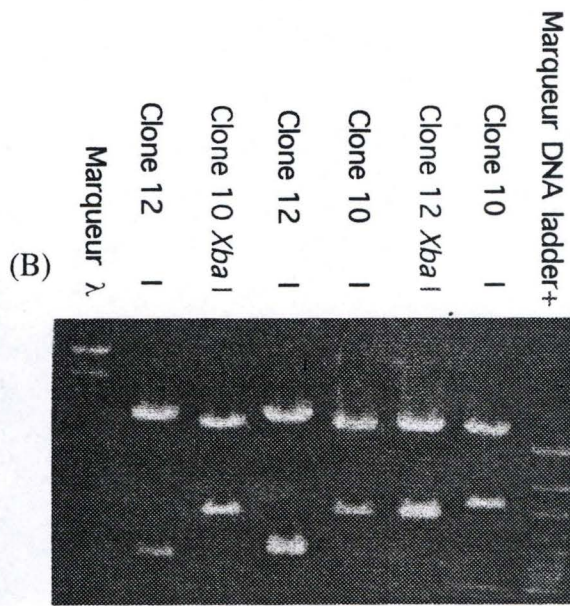
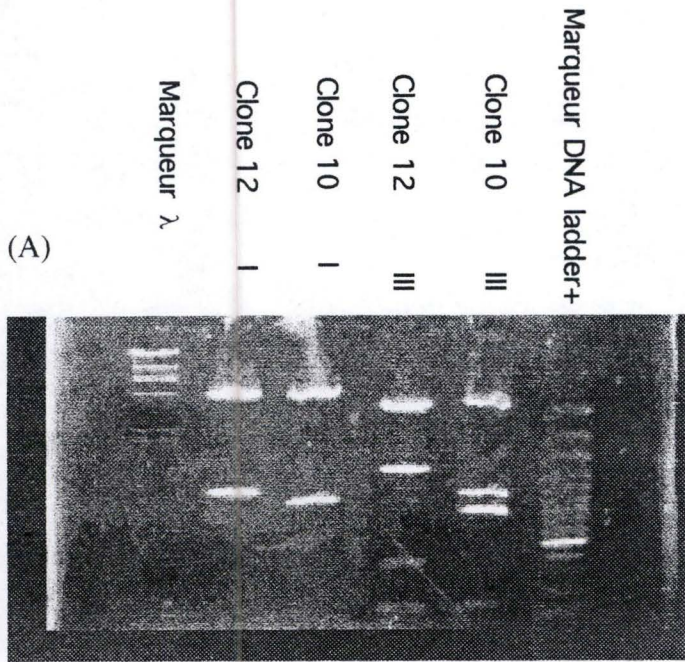
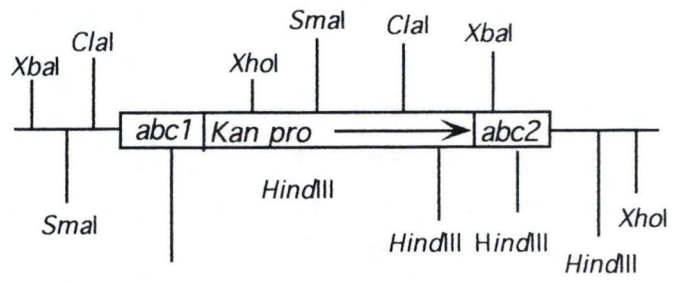
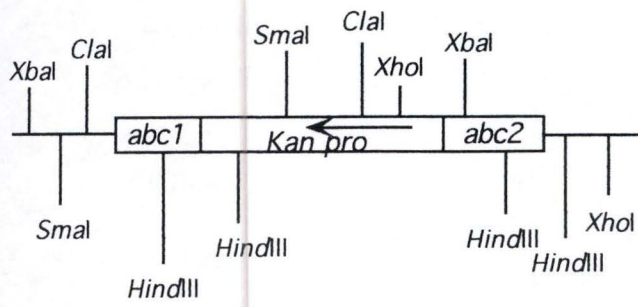


Fig.29 : Restrictions diagnostiques du clone 10 ayant reçu la cassette *Kan pro* orientée dans le sens de transcription des gènes *abc12* et du clone 12 qui a reçu le même insert orienté en sens inverse.

Les tailles obtenues sont (A) : -pour le clone 10 : -946, 4520 pb (*SmaI*).

-130, 774, 976, 3596 pb (*HindIII*).

-pour le clone 12 : -1042, 4426 (*SmaI*).

-130, 376, 1374, 3596 pb (*HindIII*).

(B) : -pour le clone 10 : -1648, 3816 pb (*XhoI*).

-1550, 3914 pb (*ClaI*).

-1515, 3955 pb (*XbaI*).

-pour le clone 12 : -996, 4468 pb (*XhoI*).

-1082, 4382 pb (*ClaI*).

-1515, 3955 pb (*XbaI*).

B.5 Obtention de mutants ABC12 de *Brucella melitensis* par « gene replacement »

Les plasmides pDabc12 et pDabc12Inv ont été transférés par conjugaison d'*E. coli* S17-1 à *B. melitensis* 16M résistant à l'acide nalidixique (Nalr). Les clones de *Brucella* transconjugants ont été sélectionnés sur milieu LB+ Nal25+Kan25. Les *E. coli* S17-1 donneuses étant sensibles à l'acide nalidixique sont ainsi éliminées. Les plasmides pDabc12 et pDabc12I étant suicides chez *Brucella*, le marqueur de résistance ne s'y maintiendra que suite à un événement de recombinaison entre la copie plasmidique des régions flanquant Kan pro et leur homologue chromosomique.

Une seule recombinaison en 5' ou 3' conduit à l'intégration du plasmide; l'intégrant a un phénotype Kanr et Ampr et porte encore une copie non mutée d'abc12. Il ne nous intéresse donc pas. Par contre, une double recombinaison (en 5' et 3') conduit au remplacement des gènes abc12 sauvages par leur copie délétée portant Kan pro. Ces mutants ont un phénotype Kanr et Amps et nous intéressent. Afin de faire la distinction entre les clones délétants (Kanr et Amps) et les intégrants (Kanr et Ampr), les clones de *Brucella* transconjugants ont été repiqués sur milieux LB+Nal25+Kan25 et LB+Nal25+Kan25+Amp50. En effet, 88 clones transconjugants ont été repiqués (44 obtenus avec le premier plasmide et 44 obtenus avec le second). Parmi ceux-ci, 6 clones avec le gène Kan pro orienté dans le sens de transcription de l'opéron (nommés Dabc12) et 2 avec le gène Kan pro orienté dans le sens opposé (nommés Dabc12Inv) sont sensibles à l'ampiciline. Ils seraient donc le résultat d'un double crossing-over survenu entre les régions flanquant le gène Kan pro et les régions homologues au niveau de l'ADN chromosomique de la bactérie.

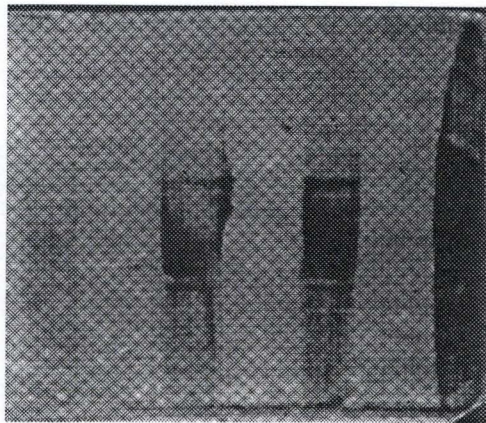
Le phénotype de ces doubles recombinants a par la suite été analysé.

B.6 Analyse du phénotype des doubles recombinants

Afin de déterminer le phénotype des doubles recombinants, nous avons effectué une coloration des colonies au crystal violet, et un western blot à l'aide d'anticorps (Ac) monoclonaux spécifiques de la chaîne O du LPS de *Brucella*.

B.6.1 Coloration des colonies au crystal violet

Cette coloration permet de distinguer rapidement à l'oeil nu, une bactérie « smooth » d'une « rough ». Les colonies « smooth » ne retiennent pas le pigment et présentent un anneau blanc après coloration. Les bactéries « rough », elles, conservent le pigment et se colorent en violet.



B3b2 M2 M1 16M

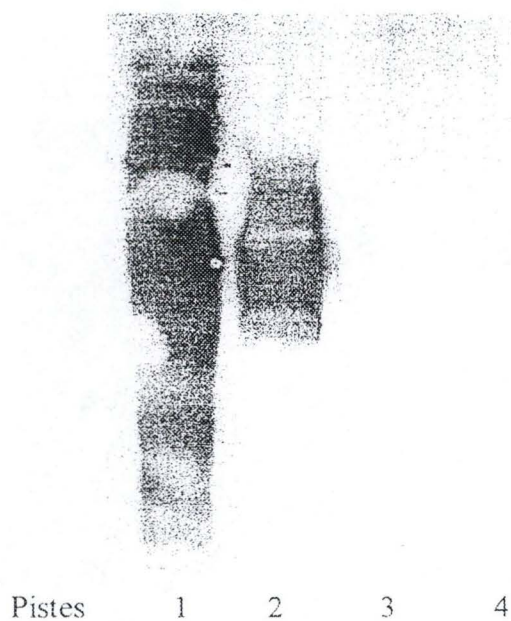
Fig. 30 : Western blot utilisant un mélange d'Ac dirigés contre la chaîne O du LPS de Brucella.

La souche *B. melitensis* 16M sauvage présente un profil en échelle floue (bien que peu discernable).

Nos deux mutants présentent également ce profil.

Le mutant "rough" B3b2 ne présente pas ce profil.

(a) Mélange d'anticorps dirigés contre la chaîne O (12G12, G2E11).



(b) Mélange d'anticorps dirigés contre le noyau du LPS (3F3D5, D869).

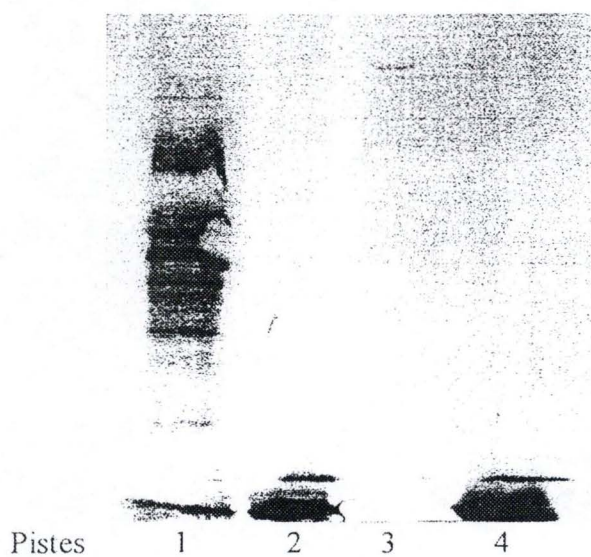


Fig. 31 : Exemples de profils théoriques en Western blot de la souche *B. melitensis* 16M sauvage, du mutant B3b2 et du mutant B115 avec un mélange d'Ac dirigés contre la chaîne O (a) et un autre contre le core (b). Piste 1 : *B. melitensis* 16M (smooth); piste 2 : *B. melitensis* B115 (rough); piste 3 : mutant rough de *B. melitensis* H38; piste 4 : *B. melitensis* 16M mutant B3b2

Les clones double recombinants, soumis à cette coloration présentent tous une coloration violet caractéristique des bactéries « rough ». Les mutants Dabc12 ne semblent donc pas exposer de chaîne O à leur surface.

B.6.2 Analyse par Western blotting

Le phénotype des mutants obtenus étant « rough », nous avons réalisé un Western blot sur un mutant Dabc12 (M1, gène Kan pro orienté dans le sens de rfb) et sur un mutant Dabc12Inv (M2, gène Kan pro dans l'orientation inverse de rfb).

Des extraits totaux de bactéries M1 et M2 ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur nitrocellulose puis incubés en présence d'Ac monoclonaux anti-chaîne O.

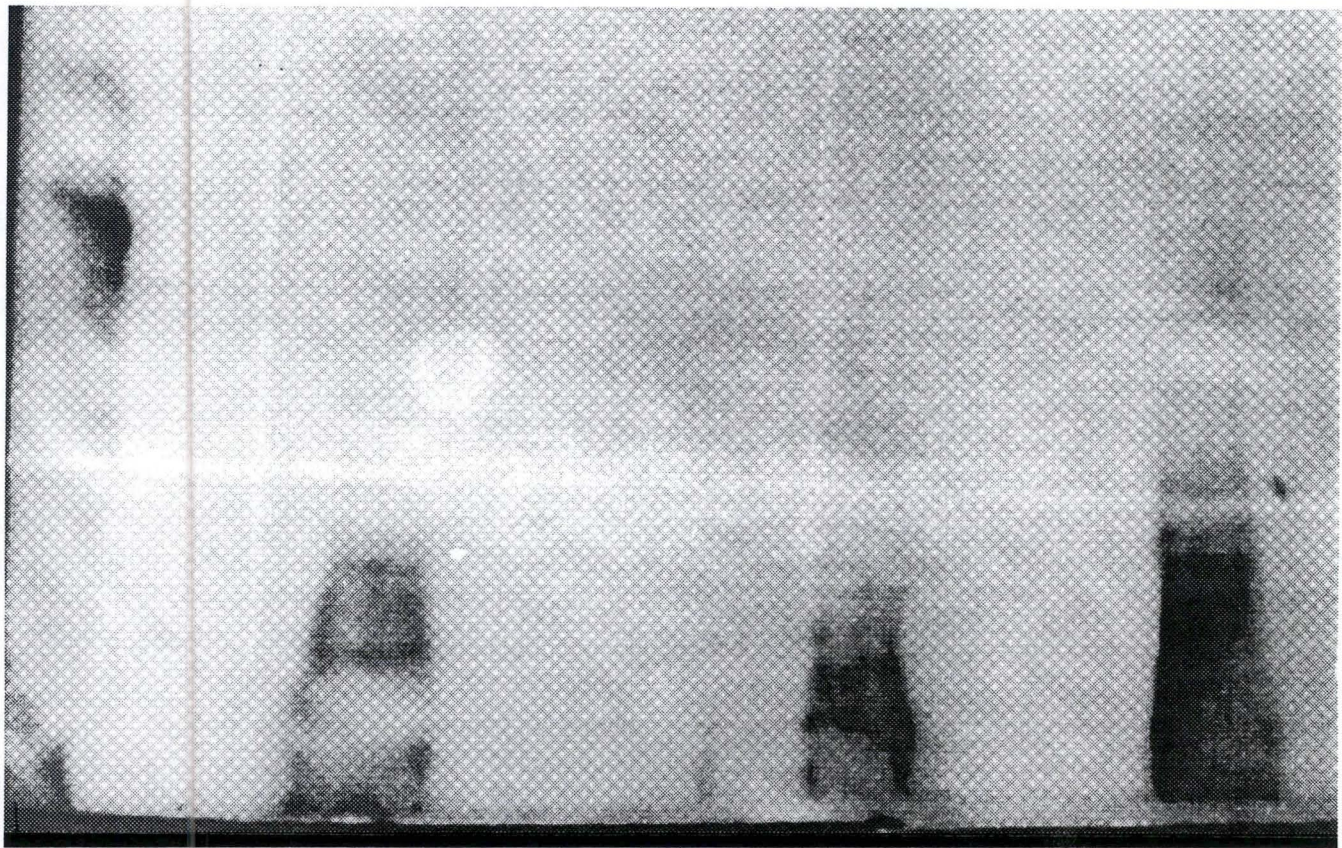
Un mélange d'anticorps monoclonaux (mAc) dirigés contre la chaîne O du LPS a été utilisé. Ce mélange contient un Ac dirigé contre l'épitope M de la chaîne O de *Brucella* (2E11), un Ac dirigé contre l'épitope A (4F9) et un Ac reconnaissant à la fois l'épitope M et l'épitope A (12G12).

La souche *B. melitensis* 16M Nalr sauvage (utilisée comme contrôle « smooth ») présente, comme attendu, un profil typique d'échelle floue correspondant aux chaînes O de taille croissante. Par contre, aucune chaîne O n'est détectée pour le mutant B3b2 utilisé comme contrôle « rough » (Fig. 30). Les profils en western blot des mutants M1 et M2 sont identiques : un profil en « échelle floue » démontrant la présence de chaîne O dans ces mutants.

Des extraits totaux des différents clones ont également été analysés en western blotting en utilisant un mAc dirigé contre le core de *B. melitensis* (G12A8). Dans un extrait de *B. melitensis* 16M sauvage (smooth), le mAc anti-core reconnaît une série de bandes en échelles correspondant à des chaînes O de taille croissante greffées au core (Fig. 31)

Dans un extrait des mutants « rough » B3b2 et B115, le mAc G12A8 reconnaît une bande de faible taille qui correspond au core dépourvu de chaîne O (Fig.31). Sur le Western blot que nous avons réalisé, le mAc reconnaît des bandes en "échelle floue" (mais peu visible) chez la souche 16M sauvage et une bande diffuse de faible taille chez les mutants M1, M2 et B3b2 (Fig. 32). Ce Western blot devrait être répété afin d'obtenir un document plus net mais il est clair que les profils de M1 et M2 ressemblent à celui de B3b2. Ce résultat, qui nécessite cependant confirmation, suggérerait que la chaîne O de M1 et M2 n'est pas liée au core.

Le résultat des Western blotting indique donc que la chaîne O est synthétisée chez les mutants M1 et M2 mais qu'elle n'est pas attachée au core. Le phénotype "rough" observé lors de la coloration au crystal violet indique de plus que la chaîne O est absente de la surface de ces mutants. La chaîne O est donc présente mais n'est localisée ni en surface ni sur le core. Elle est



sauvage 16M

mutant M1

mutant M2

mutant B3b2

Fig. 32 : test des deux mutants M1 et M2 en Western blot avec un mAc dirigé contre le core

très certainement majoritairement liée à l'Und-P ancré en membrane interne. Elle serait localisée du côté cytoplasmique ou périsplasmique de cette membrane interne.

Nous posons l'hypothèse qu'elle est localisée du côté cytoplasmique. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse :

-La chaîne O de Brucella est un homopolymère. Sa polymérisation se réalise par conséquent très certainement dans le cytoplasme.

-La séquence des gènes abc12 suggère qu'ils encodent un ABC transporteur et donc il est logique que dans les mutants Dabc12 la chaîne O ne franchisse pas la membrane interne.

-La présence d'une chaîne O dans le périplasme mais non liée au core impliquerait une mutation dans l'Ag O ligase. Or, nos gènes abc12 ne présentent pas de similarité avec le gène de la ligase.

Si on accepte l'hypothèse que la chaîne O des mutants Dabc12 est cytoplasmique, nos résultats confirment que l'attachement de l'AgO sur le complexe Lipide A-core se réalise au niveau du périplasme.

*Conclusions
et
perspectives*

Le LPS est le constituant majeur de la membrane externe des bactéries gram négatives. Il constitue un facteur de virulence de la bactérie et est une des cibles majeures de la réponse immunitaire de l'hôte.

Le LPS est constitué de trois parties : le lipide A, le core (ou noyau) et la chaîne O (ou Antigène O). Les gènes intervenant dans la synthèse et la polymérisation de la chaîne O, sont localisés au niveau du cluster *rfb*. Récemment, ce cluster a été cloné et séquencé chez *Brucella melitensis* 16M. Au cours de ce mémoire, nous nous sommes proposé d'étudier la fonction de deux gènes de ce cluster *rfb*. Les séquences protéiques déduites de ces gènes ont été comparées à celles disponibles dans les bases de données. Les protéines codées par ces gènes présentent une similarité significative avec les deux composants d'un ABC transporteur (protéine transmembranaire et protéine liant l'ATP). C'est pourquoi nous avons décidé de nommer ces deux gènes *abc1* et *abc2*, et les protéines déduites ABC1 et ABC2.

Nous avons ensuite comparé les profils d'hydrophobie de la protéine ABC1 avec la composante transmembranaire d'ABC transporteurs intervenant dans le transport de la chaîne O de plusieurs genres bactériens. Cette comparaison a mis en évidence la présence de six régions hydrophobes correspondant à des segments transmembranaires. La présence de ces six segments est caractéristique des protéines transmembranaires d'un ABC transporteur.

Nous avons également réalisé des alignements de séquences protéiques pairés et multiples entre ABC2 et l'« ATP binding domain » (ou sous-unités liant l'ATP) d'ABC transporteurs d'autres genres bactériens impliqués dans le transport de l'Ag O ou d'autres substrats. Nous avons ainsi montré la présence chez ABC2 de deux motifs conservés chez tous les membres de la superfamille des ABC transporteurs : les motifs A et B de Walker.

Une région conservée entre les quatre protéines intervenant dans le transport de la chaîne O correspondant au "linker peptide" des ABC transporteurs dépendant des "periplasmic binding proteins" a été mise en évidence. Cette région pourrait donc avoir chez ABC2 une fonction similaire au "linker peptide": assurer le couplage du transport du substrat aux changements conformationnels induits par l'hydrolyse de l'ATP.

Afin de vérifier le rôle de cet ABC transporteur potentiel chez *B. melitensis* 16M, nous avons réalisé des mutants de ces deux gènes par « gene replacement ». La construction d'une copie plasmidique des gènes *abc12* dont l'Orf a été remplacée par un marqueur de résistance à la kanamycine a été obtenue par restriction et ligation.

Nous avons obtenu une construction avec le gène *Kan* doté d'un promoteur (*Kan pro*) orienté dans le sens de transcription des gènes *abc1* et *abc2* et une seconde dont le gène *Kan pro* est orienté en sens inverse.

Les plasmides obtenus, p Δ abc12 et p Δ abc12Inv, ont été transformés dans *E. coli* S17-1 et transférés par conjugaison chez *B. melitensis* 16M. Des clones transconjugants de *B. melitensis* présentant le phénotype de résistance aux antibiotiques caractéristique de clones délétants (Kanr et Amps) ont été isolés: six mutants ont été isolés à partir du plasmide p Δ abc12 et deux mutants à partir de p Δ abc12Inv.

Ces candidats délétants devront, dans la suite du travail, être analysés par Southern blot en utilisant comme sondes les gènes *kan pro* et *abc12* pour démontrer le remplacement des gènes *abc12* par le gène *Kan pro*. Ce Southern blot permettra également de vérifier l'orientation du gène *Kan pro* par rapport au cluster *rfb*. Ces candidats délétants ont été nommés Δ abc12 et Δ abc12Inv.

Le phénotype des mutants Δ abc12 et Δ abc12Inv a été déterminé par deux techniques complémentaires: la coloration des colonies au crystal violet et le Western blotting avec des anticorps monoclonaux spécifiques du LPS de *Brucella*.

La coloration au crystal violet a montré que les colonies des mutants Δ abc12 et Δ abc12Inv ont un phénotype « rough ». Ce phénotype traduit l'absence de chaîne O à la surface bactérienne. Par ailleurs, l'analyse par Western blot de lysats totaux a montré la présence de chaîne O chez les mutants Δ abc12 et Δ abc12Inv. Le résultat préliminaire du Western blot avec l'anticorps anti-core suggère que la chaîne O des mutants Δ abc12 et Δ abc12Inv n'est pas attachée au core étant donné que leur profil est similaire à celui du mutant rough B3b2. Sur base de ces résultats et sachant que l'étape de greffage au core est périplasmique, le phénotype « rough » serait dû à une mutation dans le système de transport de la chaîne O et non pas dans une étape de synthèse précédente.

Un ELISA sur bactéries entières et sur lysats à l'aide une batterie d'Ac monoclonaux dirigés contre le LPS de *Brucella* sera réalisé pour confirmer le phénotype observé: absence de chaîne O en surface bactérienne et présence de chaîne O dans le lysat.

Nous avons posé l'hypothèse que la chaîne O soit cytoplasmique dans les mutants Δ abc12 et Δ abc12Inv. Une expérience de perméabilisation de la membrane externe rendant le périplasme accessible aux anticorps monoclonaux anti-chaîne O devrait permettre de tester la présence de la chaîne O dans le périplasme.

Afin de vérifier que le phénotype des mutants obtenus est le résultat de la délétion des deux gènes *abc1* et *abc2*, la complémentation de ceux-ci par la copie sauvage des deux gènes sera réalisée. Pour cela, les gènes *abc12* seront clonés sur un plasmide capable de se répliquer chez *Brucella* (type pBBR1MCS) et placés sous le contrôle d'un promoteur actif chez *Brucella* (par exemple pLac d'*E.coli* ou un promoteur endogène). Ce plasmide sera introduit chez *Brucella* par conjugaison ou électroporation. Le phénotype des mutants complémentés sera alors analysé.

Etant donné que nous n'avons pas obtenu de construction contenant la cassette Apha-3 dans la même orientation que *rfb*, nous avons utilisé la cassette *Kan pro* pour déléter les gènes *abc12*. Il sera donc nécessaire de vérifier que le remplacement des gènes *abc* par *Kan pro* n'a pas d'effet polaire sur l'expression des gènes *rfb* situés en aval d'*abc2*.

Deux Orf sont localisées en aval d'*abc2*: la première de fonction inconnue et la suivante encodant une formyl transférase. Une analyse par Northern blot ou RT-PCR permettra de vérifier que la transcription de ces gènes n'est pas altérée chez les mutants Δabc . Un effet de la mutation Δabc sur la traduction de ces deux Orf ne peut être écarté. La protéine encodée par la première Orf étant de fonction inconnue, nous ne disposons pas d'outil pour vérifier son expression. Concernant la formyltransférase, il est probable que l'absence de groupement formyl sur les monomères de la chaîne O modifie des épitopes de cette chaîne. Le profil de réactivité des mutants Δabc avec des anticorps monoclonaux reconnaissant différents épitopes sur la chaîne O indiquera si cette chaîne est différente chez les mutants Δabc . De plus, la restauration du phénotype sauvage chez les mutants Δabc complémentés par les gènes *abc* confirmera l'absence d'effet polaire détectable.

Les mutants Δabc et $\Delta abcInv$ présentent le même phénotype dans les tests réalisés alors que dans les uns le gène *Kan* est transcrit dans le sens de *rfb* et dans les autres, le gène *Kan* est transcrit dans le sens inverse. Il semble donc que l'initiation de la transcription de *Kan* au sein du cluster *rfb* suivie de la polymérisation d'ARNm dans le sens inverse de la transcription de *rfb* ne perturbe pas de façon détectable l'expression de ce cluster.

Afin de montrer que chacun des deux gènes *abc* est indispensable au transport de la chaîne O, il serait intéressant de muter séparément les deux gènes.

La présence de l'ABC transporteur au sein du cluster *rfb* de *Brucella melitensis* qui possède un LPS homopolymérique, nous permet de classer *B. melitensis* dans le groupe bactérien utilisant un mode de polymérisation de la chaîne O indépendant de Rfc: polymérisation par croissance à l'extrémité non réductrice de la chaîne O (Fig. 1).

Nous pourrions également compléter la souche *Brucella melitensis* B115 qui est un mutant naturel obtenu par cultures successives et utilisé par l'industrie pour la production d'allergène. Ce mutant présente un phénotype « rough » malgré la présence de chaîne O dans le cytoplasme. Un test de complémentation en *trans* de ce mutant par les gènes *abc12* de *B. melitensis* 16M déterminerait si le phénotype de B115 est dû à la mutation des gènes codant pour l'ABC transporteur. La mutation affectant les gènes de la souche B115 (mutation ponctuelle introduisant une stop de traduction, insertion ou délétion) sera caractérisée par amplification PCR et séquençage des gènes *abc12* de cette souche.

Il serait également intéressant d'étudier la relation structure-fonction des protéines ABC1 et ABC2. Nous pourrions étudier de façon plus approfondie le fonctionnement d'ABC2, par modélisation du site de liaison à l'ATP, par mutation dirigée au niveau des motifs de Walker...

Par mutation dirigée au niveau de la région correspondant au « linker peptide » des ABC transporteurs dépendant des « periplasmic binding proteins », nous pourrions également déterminer si la fonction de cette région est similaire à celle attribuée au « linker peptide ».

*Matériel et
méthodes*

A. Souches bactériennes:

A. 1. *E. coli* XL1-blue.

Quelques particularités intéressantes du génotype de cette souche :

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

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

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

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

A. 2. *E. coli* DH5 α

Cette souche présente une mutation recA1 et endA1. Ceci permet d'augmenter la stabilité d'un insert et améliore la qualité de l'ADN plasmidique pour la réalisation de miniprep.

A. 3. *E. coli* S17-1 λ pir

La souche d'*E. coli* S17- λ pir est résistante à la streptomycine (Sm^R) et à la spectinomycine (Sp^R). Cette souche d'*E. coli* possède notamment les caractéristiques d'intérêt suivantes,

λ pir: la bactérie produit la protéine π qui permet la réplication de tout plasmide possédant l'origine de réplication ori R6K.

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

Cette souche est utilisée pour la conjugaison avec *Brucella*.

A. 4. *Brucella* sp.

Malgré une cross-réactivité élevée entre les souches de *Brucella* sp., des antigènes distincts sont reconnus chez les souches *B. abortus* et *B. melitensis*.

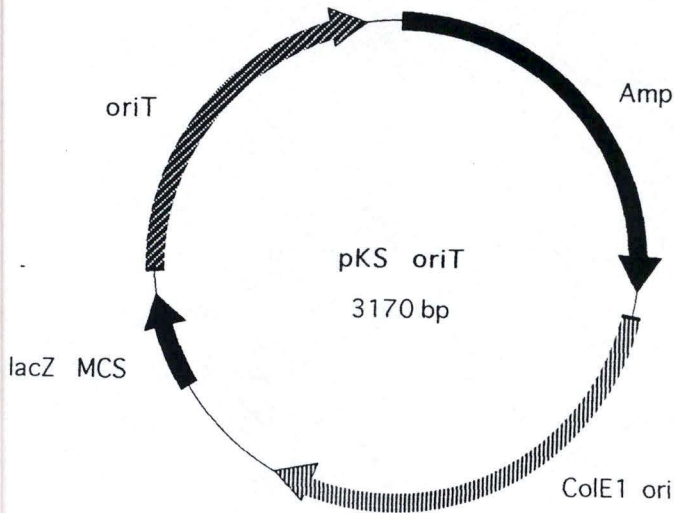


Fig. 1 : Plasmide pKSoriT (Stratagène). bla, gène de résistance à l'ampiciline; colE1ori, origine de répliation chez *E. coli*; OriT, origine de transfert; MCS, site de clonages multiples.

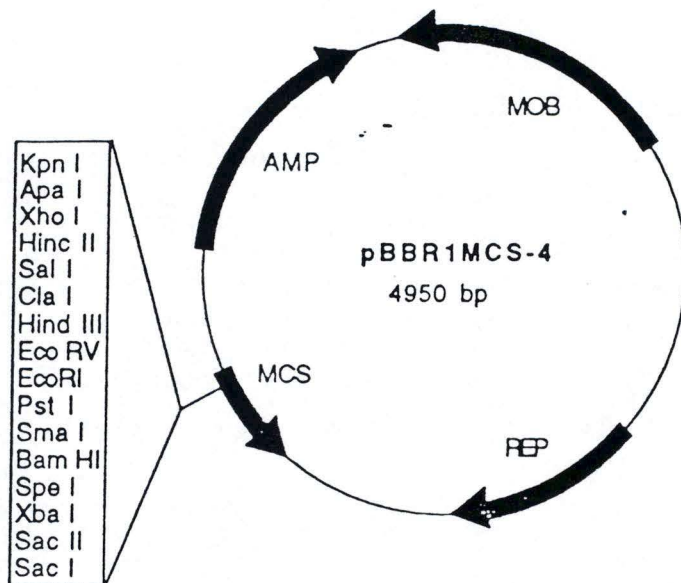


Fig. 2 : Plasmide pBBRI MCS4. Amp, résistance à l'ampiciline; MOB, gène intervenant dans le transfert du plasmide; REP, gène requis pour la répliation du plasmide; MCS, site de clonages multiples.

L'antigène de surface A est prédominant chez la souche *B. abortus* tandis que l'antigène M est prédominant chez la souche *B. melitensis*. Ces antigènes sont portés par de la chaîne O du LPS

Les *B. melitensis* 16M. utilisées pour la transformation sont représentatives de *B. melitensis* :

- *B. melitensis* biovar 1 souche 16M NaI^R est une souche de phénotype « Smooth », l'agglutination se produit avec un anti-serum M. La souche est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (NaI^R).

B. Plasmides utilisés

B. 1. Le pKS oriT

Le pKS oriT est issu du pBluescript (Stratagène) dans lequel l'origine de réplication phagienne f1 est remplacée par une origine de transfert conjugatif oriT (Fig. 1). Il possède également un gène de résistance à l'ampiciline (*bla*), une origine de réplication chez *coli* (ColE1 ori) et un site multiple de clonage inclus dans le gène *lacZ*.

B. 2. pBBR1 mcs4

Ce plasmide de 4950 pb comprend un gène de résistance à l'ampiciline (Amp), le gène REP requis pour la réplication du plasmide, un site multiple de clonage (MCS) inclus dans le gène *lacZ* et la région MOB correspondant au gène requis pour le transfert du plasmide (Fig. 2).

B. 3. pGEM5-17

Ce plasmide contient le cluster *rfb* de *Brucella melitensis* 16M (15Kb) dont 1537 pb correspondent aux deux gènes *abc1* et *abc2*. Il a été construit au laboratoire au départ de pGEM5Z (Promega) (Fig. 3A). et contient une origine de réplication phagienne (f1), une origine de réplication en *E. coli*, le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) et un MCS inclus dans le gène *lacZ*.

B. 4. B.4.pGEM-T

Ce plasmide (Proméga) est utilisé notamment pour cloner des fragments PCR amplifiés à l'aide de la dynazyme car il possède deux thymines protrudentes au niveau du gène *lacZ* (Fig. 3B).

B. 5. pUC4K

Ce plasmide est commercialisé par la firme Pharmacia (Fig. 4). Il a été utilisé pour amplifier par PCR le gène de résistance à la kanamycine (*kan*) appelé dans ce travail *Kan pro* car contenant son propre promoteur.

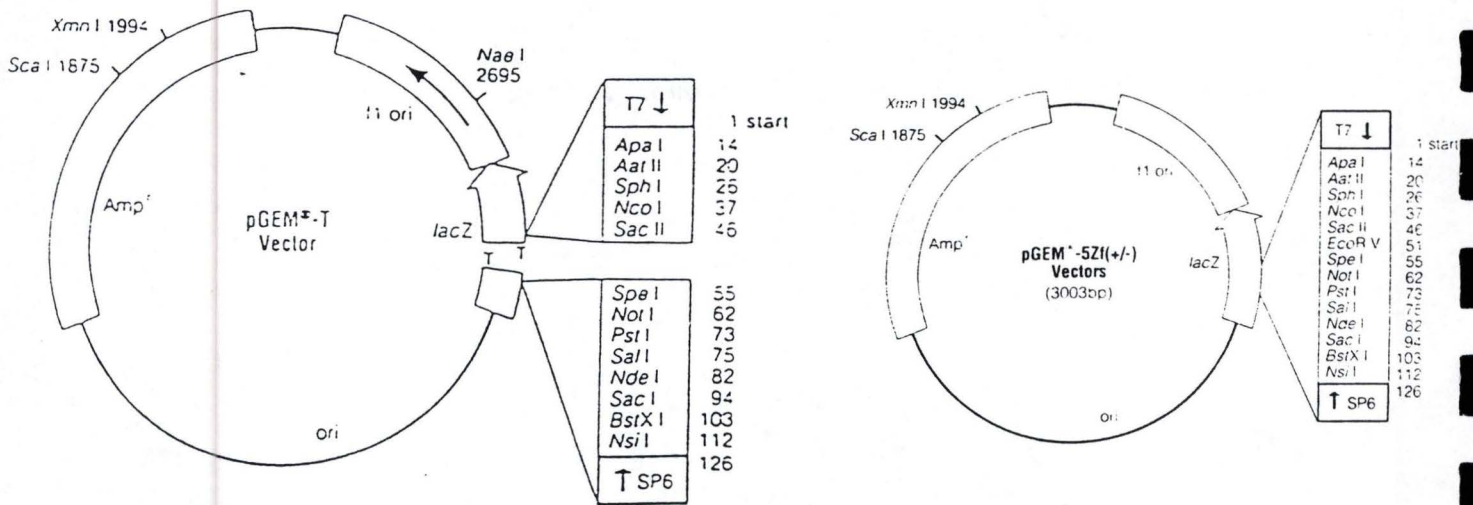


Fig. 3 : A) Plasmide pGEM5Zf (3003 pb). L'insert correspondant au cluster *rfb* a été introduit dans le site multiple de clonage. B) Plasmide pGEM-T : ce plasmide est utilisé pour le clonage de fragments PCR amplifiés à l'aide de la dynazyme. Il possède en effet des thymines proéminentes au niveau du gène *lacZ*. *f1 ori*, origine de répllication phagienne; *Amp^R*, gène de résistance à l'ampicilline.

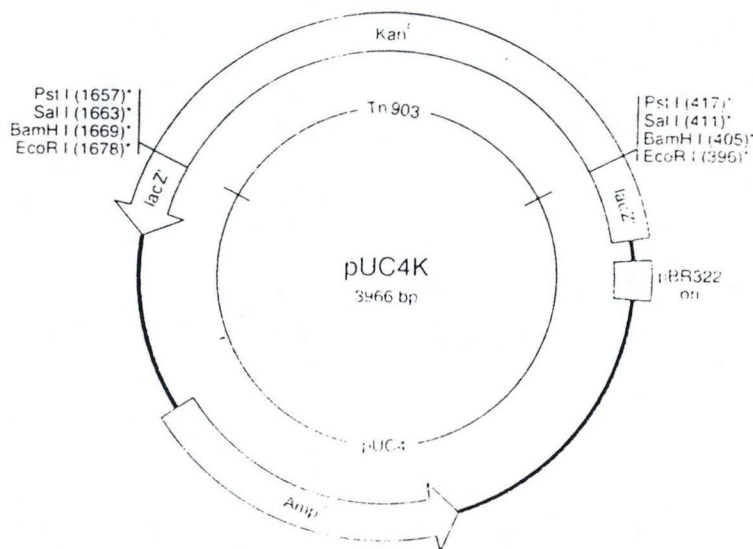


Fig. 4 : Plasmide pUC4K (3966 pb). Le gène de résistance à la kanamycine est localisé dans le gène *lacZ*.

B. 6. pUC18K2

Plasmide construit par Ménard *et al.* (1993) afin de faire de la mutagenèse non polaire chez *Shigella flexneri*. (Fig. 5).

C. Milieux de culture

C. 1. milieu Luria Bertani (LB)

-Hydrolysate de caséine (tryptone)	1 g/100 ml.
-NaCl	1 g/100 ml.
-Yeast extract	0,5 g/100 ml.

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C sous une pression de un bar).

C. 2. milieu solide (LB agar)

Le milieu solide possède la même composition que le milieu liquide avec en plus 2% d'agar. Le milieu est autoclavé à 120°C et laissé refroidir pour atteindre une température de 60°C. C'est à ce moment seulement que les différents additifs thermolabiles comme les antibiotiques peuvent être ajoutés. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de pétri.

C. 3. Milieu TSAYE.

-Tryptic soy agar	40 g/l.
-Yeast extract	1 g/100 ml.

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

C. 4. Milieu 2-Y-T.

- Hydrolysate de caséine (tryptone)	1 g/100 ml.
- NaCl	0,5 g/100 ml.
- Yeast extract	1 g/100 ml.

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

C. 5. Les antibiotiques

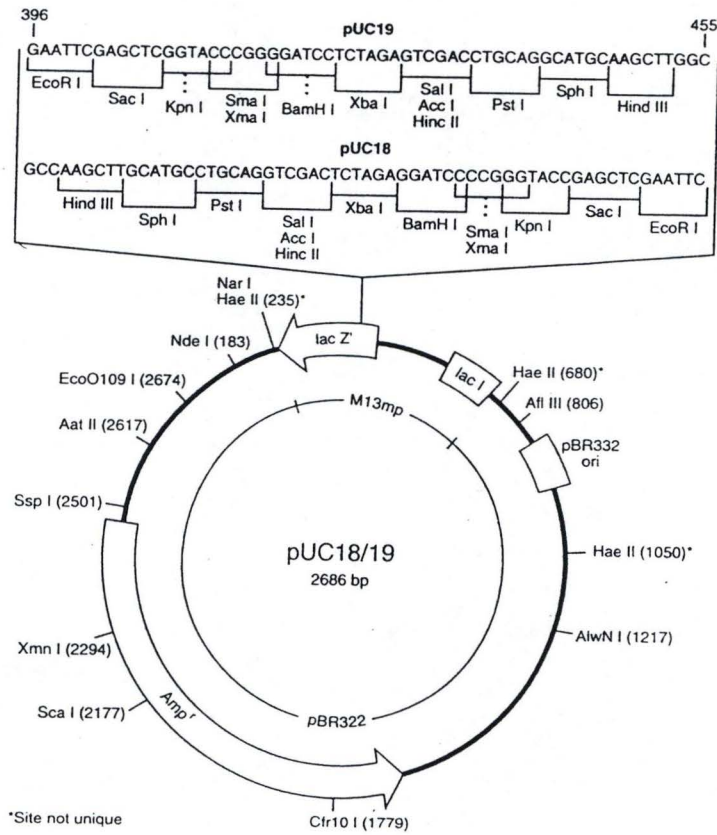


Fig. 5 : Plasmide pUC18 (Pharmacia). La cassette Kan3 a été introduite dans le site multiple de clonage par restriction SmaI.

Nom	abréviation	concentration de la solution stock (mg/ml)	concentration standard utilisée (µg/ml)
Kanamycine	Kan	25	25
Ampiciline	Amp	50	50
acide nalidixique	Nal	25	25
streptomycine	Sm	10	5

D. Transformation bactérienne

D. 1. Principe

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (ici un plasmide) dans une bactérie. Cette dernière doit être rendue compétente. Pour ce faire, la bactérie (dans notre cas *E. coli*) est placée dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, l'eau rentre et la cellule gonfle. L'ADN plasmidique ajouté à la préparation, s'associe au calcium pour former un complexe résistant aux désoxiribonucléases qui adhère à la bactérie. Ensuite, les bactéries sont soumises à un choc thermique, ce qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Les bactéries sont alors placées sur milieu non sélectif pour leur permettre de reformer une paroi normale; cela permet également à la bactérie d'exprimer les gènes portés par le plasmide introduit, dont ceux de résistance aux antibiotiques. Les transformants ainsi obtenus, sont inoculés sur milieu sélectif solide et mis à pousser la nuit.

D. 2. protocole

D. 2.1.préparation d'*E. coli* compétentes

- culture d'*E. coli* sur milieu solide avec les antibiotiques appropriés à 37°C
- inoculer 10 ml de milieu liquide (LB) avec les antibiotiques adéquats , laisser pousser à 37°C toute la nuit ou jusqu'à atteindre une absorbance de 1-1,2 à 550 nm
- inoculer 100 ml de milieu liquide (LB) + les antibiotiques requis avec la pré-culture 1 heure à 37°C pour atteindre une absorbance de 0,3 à 550 nm.
- 10 minutes sur glace.

- centrifuger 5' à 4000 rpm à 4°C et éliminer le surnageant.
- ajouter 1/2 volume de CaCl₂ 50 mM.
- centrifuger 5' à 4000 rpm à 4°C et éliminer le surnageant.
- resuspendre les cellules dans la moitié du volume initial avec du CaCl₂ 50 mM.
- 20' sur glace.
- centrifuger et enlever le surnageant.
- resuspendre le culot dans un dixième du volume de départ avec une solution de CaCl₂ 50 mM-15% glycerol.
- aliquoter par 400 µl et placer les eppendorfs à -80°C.

D. 2.2. Transformation proprement dite

- mélanger 100 µl de cellules compétentes avec 5 µl du mix de ligation ou 10 à 100 ng de plasmide.
- 30' sur glace
- 2' de choc thermique à 42°C
- ajouter 0,5-1 ml de milieu LB.
- placer les cellules à 37°C pendant 30 à 60 minutes.
- étaier sur boîte de pétri avec milieu sélectif.
- incuber toute la nuit à 37°C.

D. 2.3. Témoins de transformation

En parallèle avec la transformation, il faut réaliser plusieurs témoins suivant le même protocole :

- * un témoin de viabilité des bactéries compétentes : les cellules sont étalées sur milieu LB sans ajout d'antibiotiques.
- * un témoin de compétence : des cellules transformées avec le plasmide non restreint sont étalées sur un milieu contenant l'antibiotique contre lequel le plasmide porte un gène de résistance.
- * un témoin de sensibilité à l'antibiotique : des cellules compétentes non-transformées sont étalées sur milieu sélectif sur lequel elles ne doivent pas pousser.

E. Extraction de l'ADN plasmidique

Deux méthodes sont mises à notre disposition suivant la quantité d'ADN désirée :

- La minipréparation : elle fournit une quantité appréciable d'ADN (de l'ordre du ng) nous permettant de juger de la qualité d'une transformation bactérienne. Afin de vérifier celle-ci,

nous réalisons une restriction diagnostique à l'aide d'enzymes de restriction appropriées (voir plus loin).

-La midipréparation : elle nous permet d'obtenir une plus grande quantité d'ADN, de l'ordre de quelques dizaines de mg. La qualité de purification de l'ADN obtenu par cette méthode est supérieur à celle que l'on peut avoir avec la mini prep.

E. 1. Minipréparation d'ADN plasmidique (miniprep)

E. 1.1. Principe.

Une miniprep comprend 5 étapes:

- La lyse alcaline des bactéries.
- La précipitation des protéines et des débris cellulaires.
- La précipitation de l'ADN plasmidique.
- Le lavage de l'ADN plasmidique.
- Enfin la resuspension de l'ADN.

E. 1.2. Solutions, tampons & matériel.

- Tampon P1 (stocké à 4°C):

- | | |
|-----------------|------------|
| - RNase A | 100 mg/ml. |
| -Tris-HCl, pH 8 | 50 mM. |
| -EDTA | 10 mM. |

-Tampon P2 (stocké à température ambiante):

- | | |
|--------|-------|
| - NaOH | 200mM |
| -SDS | 1%. |

-Tampon P3 (stocké à 4°C):

- | | |
|---|--------|
| - Kac, pH 5,2 | 2,8 M. |
| - Solution d'éthanol 70%(stocké à -20°C). | |

E. 1.3. Protocole.

- Inoculer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- prélever 1,5ml de la culture dans un eppendorf à mettre centrifuger et éliminer le milieu de culture.

- Tris-H₃PO₄, pH 6,3 100mM.

- Ethanol 15%.

-Tampon de lavage N3 :

- KCl 1150mM.

- Tris-H₃PO₄, pH 6,3 100mM.

- Ethanol 15%.

-Tampon d'élution N5 :

- KCl 1000mM.

- Tris-H₃PO₄, pH 8,5 100mM.

- Ethanol 15%.

E. 2.3. Protocole.

- Préculture : inoculer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie bactérienne.
- Ensemencer 100 ml du même milieu liquide avec 50 à 100ml de la préculture.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1.
- Ajouter 4 ml de tampon de lyse P2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml du tampon de neutralisation P3 et agiter doucement, laisser 5 à 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 40 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34), à 4°C et récupérer le surnageant.
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée et laisser pénétrer.
- Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5.
- Aliquoter par 500 µl en eppendorf.
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol prééquilibré à température ambiante. Homogénéiser.
- Laisser 10 minutes sur table et ensuite centrifuger 15 minutes à température ambiante à 12500 rpm. Eliminer le surnageant.

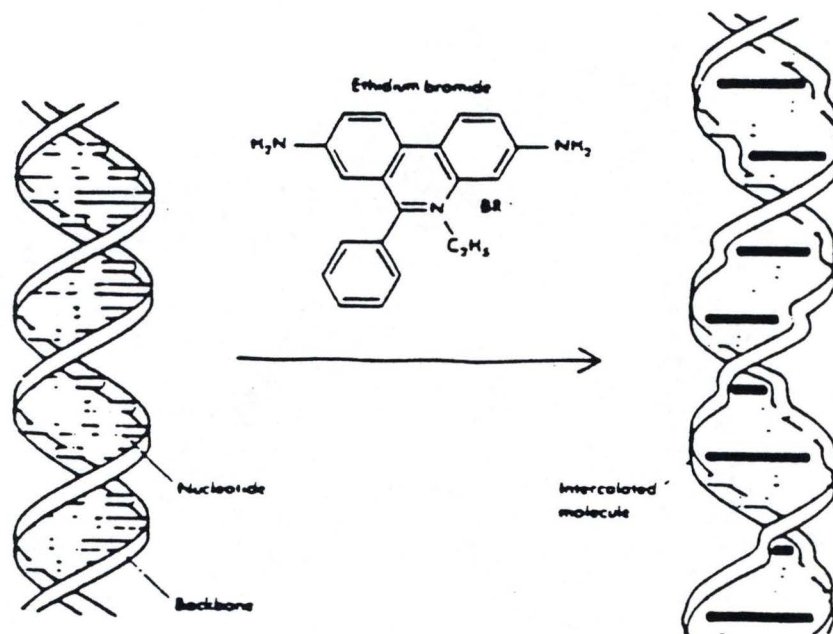


Fig. 6 : structure du bromure d'éthidium et schéma de son insertion dans l'ADN bicaténaire.

- Laver l'ADN avec 500 ml d'éthanol 70%.
- Laisser sécher le culot quelques minutes.
- Resuspendre dans 50 à 100 ml d'H₂O distillée stérile.

F. Restriction de l'ADN

La restriction de l'ADN est effectuée par des enzymes, dites de restriction, qui coupent l'ADN bicaténaire en des sites qui leur sont spécifiques. Ces enzymes peuvent cliver le double brin d'ADN en "biseau", laissant ainsi des bouts "protrudents" appelés bouts collants; ou des extrémités non protrudentes, appelées bouts francs.

F. 1. Protocole

- Dans un eppendorf stérile, ajouter :
 - x ml d'ADN à restreindre
 - le tampon de restriction spécifique de l'enzyme utilisée 10x concentré : 1/10 du volume final
 - l'enzyme de restriction : au maximum 1/10 du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzymes par mg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN)
 - eau bidistillée pour amener au volume final
- Incuber deux heures à la température optimale pour l'enzyme.

Le tampon de restriction utilisé avec chaque enzyme est celui défini par la firme Boehringer Mannheim.

G. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison d'un marqueur de taille contenant des fragments de tailles connues. L'ADN est visualisé par ajout de bromure d'éthidium au tampon de migration. Cette molécule s'intercalant dans la double hélice d'ADN (Fig.6) apparaît fluorescente sous rayonnement UV, permettant ainsi la visualisation de l'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

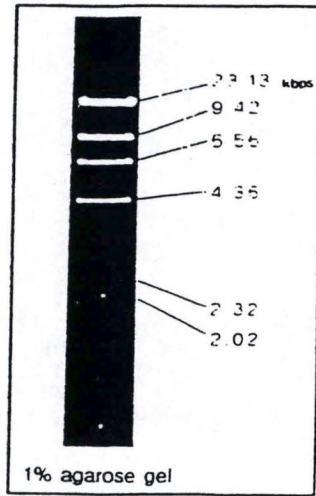


Fig. 7 :Marqueur de poids moléculaire : phage lambda (λ) restreint par *HindIII* (EUROGENTEC).

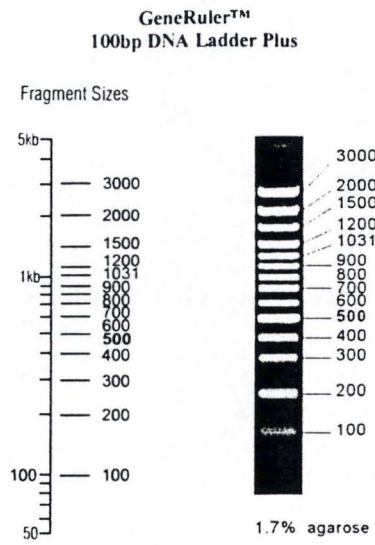


Fig. 8 :Marqueur de poids moléculaire 100bp DNA ladder+ (DNA ladder+).

G. 1. Solutions, tampons & matériels

-solution de bromure d'éthidium : 2 mg/ml.

- Solution d'alourdisseur :

- Sucrose 50%.
- EDTA 100 mM.
- SDS 1%.
- Bleu de bromophénol 0.1%.

-Tampon TAE (50x concentré) :

- Tris-HCl, pH 8 40 mM.
- EDTA 2 mM.

-Agarose.

-Marqueurs de taille utilisés :

-ADN du phage I restreint par HindIII (Eurogentec) voir Fig.7.

- « 100 bp DNA Ladder Plus » (MBI Fermentas) : trois plasmides différents ont été restreints produisant 14 fragments dont celui de 500 pb présentant l'intensité la plus forte (Fig.8).

- Le marqueur « deux », correspondant au plasmide pUC19 restreint BmyI. Les tailles sont

Tailles	Quantité
1161 pb	116 ng
718 pb	72 ng
497 pb	50 ng
225 pb	22,5 ng
85 pb	8,5 ng

G. 2. Protocole

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.

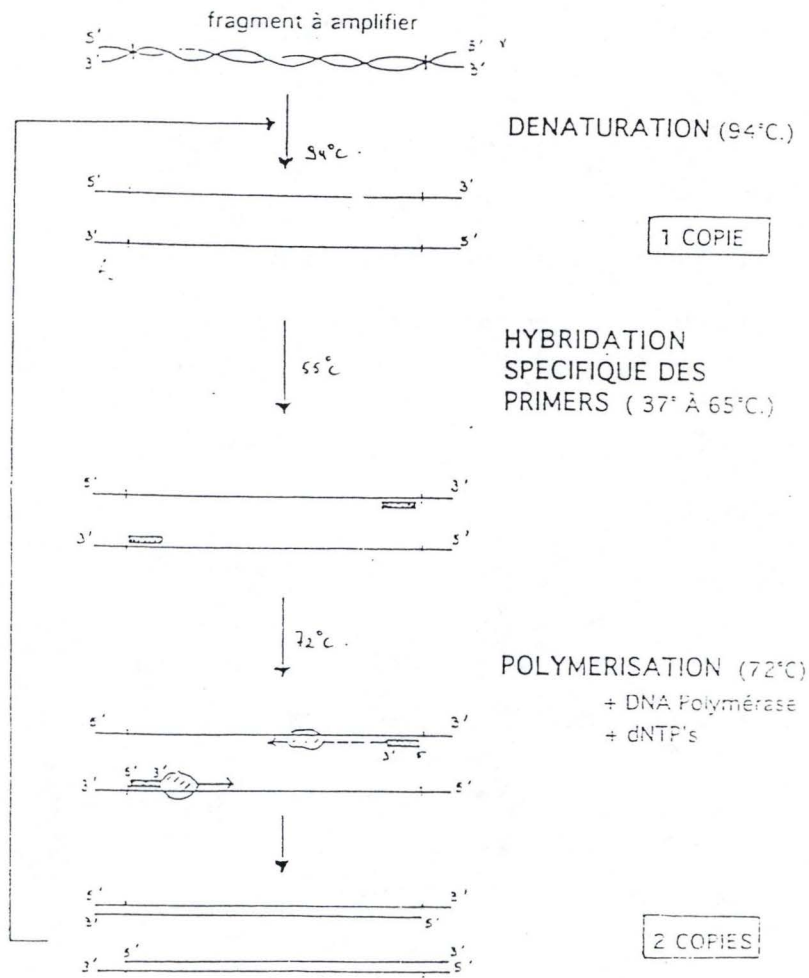
- Laisser refroidir la solution jusque 50°C (environ) et couler dans le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de TAE, auquel on a ajouté quelques μ l d'une solution de bromure d'éthidium (2 mg/ml).
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur.
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré. En sachant que plus le voltage est élevé, plus la migration est rapide et la séparation des fragments d'ADN moins visible.
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

H. Extraction d'ADN sur gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer de l'ADN d'un gel d'agarose. L'ADN est excisé du gel et récupéré après passage sur une colonne formée de billes de silice. Le kit utilisé est le « qiaquick gel extraction kit » de la firme Qiagen.

H. 1. Protocole

- Exciser la bande d'ADN voulue du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel stérile.
- Peser la portion de gel récupéré et ajouter 3 volumes de tampon QG pour 1 volume de gel.
- Incuber l'échantillon 10' à 50°C et vortexer toutes les 2-3 min. durant l'incubation afin d'aider à la dissolution de gel.
- Ajouter 1 volume d'isopropanol à l'échantillon et mélanger.
- Placer la colonne de silice dans un tube collecteur de 2 ml.
- Charger le sommet de la colonne avec l'échantillon et centrifuger 1 min. à 14000 RPM.
- Vider le surnageant du tube collecteur.
- Additionner 0,75 ml de tampon PE sur la colonne et centrifuger 1 min. à 14000 RPM.
- Vider le tube collecteur de son contenu et centrifuger une nouvelle fois à 14000 RPM pendant 1 min.
- Placer la colonne dans un éppendorf stérile de 1,5 ml.
- Ajouter 30 ml de tampon d'élution ou d'eau au centre de la colonne et laisser 1 min sur table; ensuite centrifuger 1 min à 14000 RPM.



nombre de copies = 2^n

Fig. 9 : Description des différentes étapes d'une PCR classique. n = nombre de cycles. Le nombre de copies résultantes est proportionnel à n .

I. Réaction de ligation

L'enzyme ADN T4 ligase permet de lier de manière covalente deux fragments d'ADN dont les extrémités sont compatibles. Elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une autre extrémité proche. L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg. Cette réaction permet de lier par exemple un insert à une matrice plasmidique.

I. 1. Protocole

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à lier.
- Ajouter 1 µl d'ADN ligase T4 (8 U/µl, Boehringer).
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation 10x concentré (Boehringer).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber O.N. à 14-16°C. Dans le cas d'une ligation « blunt » la température est de 22°C.

J. Amplification d'ADN par « polymerase chain reaction » (PCR)

La PCR permet d'amplifier un grand nombre de fois une séquence définie d'ADN à l'aide d'oligonucléotides ou primers. Ces oligonucléotides présentent une séquence complémentaire aux deux régions flanquant la portion d'ADN à amplifier.

Un cycle PCR comprend trois étapes : dénaturation de l'ADN cible, hybridation des primers, et élongation. Cette dernière étape est effectuée par une polymérase thermostable qui catalyse la synthèse d'un nouveau brin, complémentaire du brin copié, à partir de l'extrémité 3' des amorces. A la fin de chaque cycle, la quantité d'ADN synthétisé augmente d'un facteur 2. Au fil des cycles, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible. Cette technique permet donc d'obtenir des quantités appréciables (ou détectables) d'ADN à partir de très faibles quantités d'ADN-matrice (Fig. 9).

La température d'hybridation utilisée doit être inférieure à la température de fusion ou « melting » (T_m) des amorces, afin de garantir une hybridation efficace des oligos. Ce T_m se calcule empiriquement de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ pour les amorces de petite taille (vingtaine de bases). Il faut ensuite retirer 1 à 1,5°C du T_m par « mismatch » (différence d'un nucléotide entre la séquence de l'amorce et celle de l'ADN-cible) pour obtenir la température d'hybridation.

nom	séquence	région amplifiée	température d'annealing	% en GC
ABC1 deb1	5'-CGA-GGA-TCC-TAC-TTC-GCC-TAC-ACG-AGA-ATA-3'	région située en amont de ABC1: ABC1 deb	60°C	50
ABC1 deb2	5'-CAT-TTA-TTC-CTC-CTA-GTT-AGT-CAC-CCG-GGT-GCC-ACC-AGA-AGT-GGC-GTA-3'		60°C	52
ABC1 fin1	5'-TAG-TAC-CTG-GAG-GGA-ATA-ATG-ACC-CGG-GGG-CCT-ACG-GCT-ACC-AAT-TAC-A-3'	région située en aval de ABC1: ABC1 fin	62°C	53
ABC1 fin2	GCT-GGA-TCC-GAA-CTT-GCA-TGC-CGG-CAG-AA-3'		62°C	58
ABC2 deb1	5'-CGA-GGA-TCC-GGT-ACT-TAT-CAT-GTT-TCC-TGA-A-3'	région située en amont de ABC2: ABC2 deb	60°C	45
ABC2 deb2	5'-CAT-TTA-TTC-CTC-CTA-GTT-AGT-CAC-CCG-GGG-GCA-TGG-ATG-TCT-TCA-ATG-TT-3'		60°C	46
ABC2 fin1	5'-TAG-TAC-CTG-GAG-GGA-ATA-ATG-ACC-CGG-GTC-AAA-GCC-GGC-ACA-ATT-GCA-T-3'	région située en aval de ABC2: ABC2 fin	62°C	51
ABC2 fin2	5'-GCT-GGA-TCC-GCG-AGA-ATA-CGT-TCC-GGT-AA-3'		60°C	55
Kan amont	5'-CCC-GGG-TGA-CTA-ACT-AGG-AG-3'	gène <i>Kan</i>	64°C	60
Kan aval	5'-CCC-GGG-TCA-TTA-TTC-CCT-CC-3'		64°C	60

Tableau 1 : Amorces utilisées au cours de ce mémoire.

J. 1. Protocole

Dans un premier temps, le « mix PCR » (100 ml) est réalisé :

- 1 ml de la polymérase thermostable.
- 10 ml de tampon spécifique de l'enzyme (1/10 de la solution finale).
- 1 ml de dNTP 10 mM.
- 1 ml primer 1 100 pmole/ ml.
- 1 ml primer 2 100 pmole/ ml.
- plus ou moins 1 ng d'AD.N cible.
- Porter à volume avec de l'eau bidistillée stérile.

Lors de ce mémoire, les conditions PCR étaient :

- 1 min. à 95°C (étape de dénaturation).
 - 1 min. à une température x (étape d'hybridation).
 - x min. à 72°C (étape d'élongation).
- Le cycle est répété 36x.

Les différents temps d'élongation et les différentes temp. d'hybridation utilisés sont indiqués au moment opportun dans le chapitre Résultats et Discussion. Les primers utilisés et les régions amplifiées sont indiqués dans le tableau 1.

Dans un deuxième temps, le programme PCR à utiliser est sélectionné en fonction du T_m des primers, la longueur de l'ADN cible, ...

Une fois la PCR terminée, 1/10 de la réaction est déposé sur gel d'agarose pour vérifier l'amplification.

Pour terminer, la solution PCR est purifiée à l'aide d'un kit pour PCR (le « high pure PCR product purification kit»). Ceci permet l'élimination des primers, des dNTP, des protéines ...

La solution est passée sur une colonne formée de billes de silice sur lesquelles l'ADN de plus de 100 pb reste fixé. Les protéines, les oligonucléotides, les dNTP sont éliminés par simple lavage. L'ADN est ensuite élué à l'aide d'un tampon pauvre en sels ou avec de l'eau.

J. 2. Solutions, tampons & matériels

- Tampon de liaison de l'ADN (binding buffer) (pH 6,6), pour 30ml :

- Guanine-thiocyanate 3 M
- Tris-HCl 10 mM
- Ethanol 5%.

- Tampon de lavage, 10ml :

- NaCl 20 mM
- Tris-HCl pH 7,5 2 mM

- Tampon d'éluion, 30ml :

- Tris-HCl 10 mM
- EDTA, pH 8,5. 1mM
- Ethanol.

J. 3. Protocole de purification

Pour 100 ml de solution PCR :

- Ajouter 500 µl de binding buffer et bien mélanger.
- Placer la colonne dans un tube collecteur approprié et pipetter l'échantillon sur le sommet de la colonne.
- Centrifuger 30' à 14000 RPM.
- Vider le surnageant du tube collecteur.
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage sur la colonne et centrifuger 30' à 14000 RPM.
- Vider le surnageant du tube collecteur et rajouter 200 µl de tampon de lavage et centrifuger comme précédemment.
- Vider le surnageant du tube collecteur et placer la colonne dans un éppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 50-100 µl de tampon d'élution ou d'eau et centrifuger 30' à 14000 RPM.

K. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries gram-négatives est un transfert latéral de matériel génétique où la bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait par contact entre bactéries grâce à la formation de pili. La souche donneuse, en l'occurrence *E.coli* S17, possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

Le transfert conjugatif est initié au site d'origine de transfert porté par le plasmide conjugatif.

Dans le cas présenté ici, le but est de faire du « gene replacement ». Pour cela, il faut introduire dans *Brucella melitensis* 16M un plasmide non répliatif contenant un gène de *B.melitensis* disrupté par le gène de la résistance à la kanamycine. Les bactéries où le gène sauvage est remplacé par le gène disrupté, grâce à un événement de double recombinaison, seront sélectionnées.

Une fois dans la bactérie, la seule chance qu'elle ait de conserver la résistance à la kanamycine, c'est un événement de recombinaison (car le plasmide ne se réplique pas). Par rapport aux cointégrants, les doubles recombinants perdent la résistance à l'ampicilline portée sur le plasmide.

L'acide nalidixique est utilisé après la conjugaison pour sélectionner les *Brucella* sp. et éliminer les *E. coli* donneuses qui y sont sensibles. La sélection des doubles recombinants se fait sur base de la résistance à la kanamycine et la sensibilité à l'ampicilline.

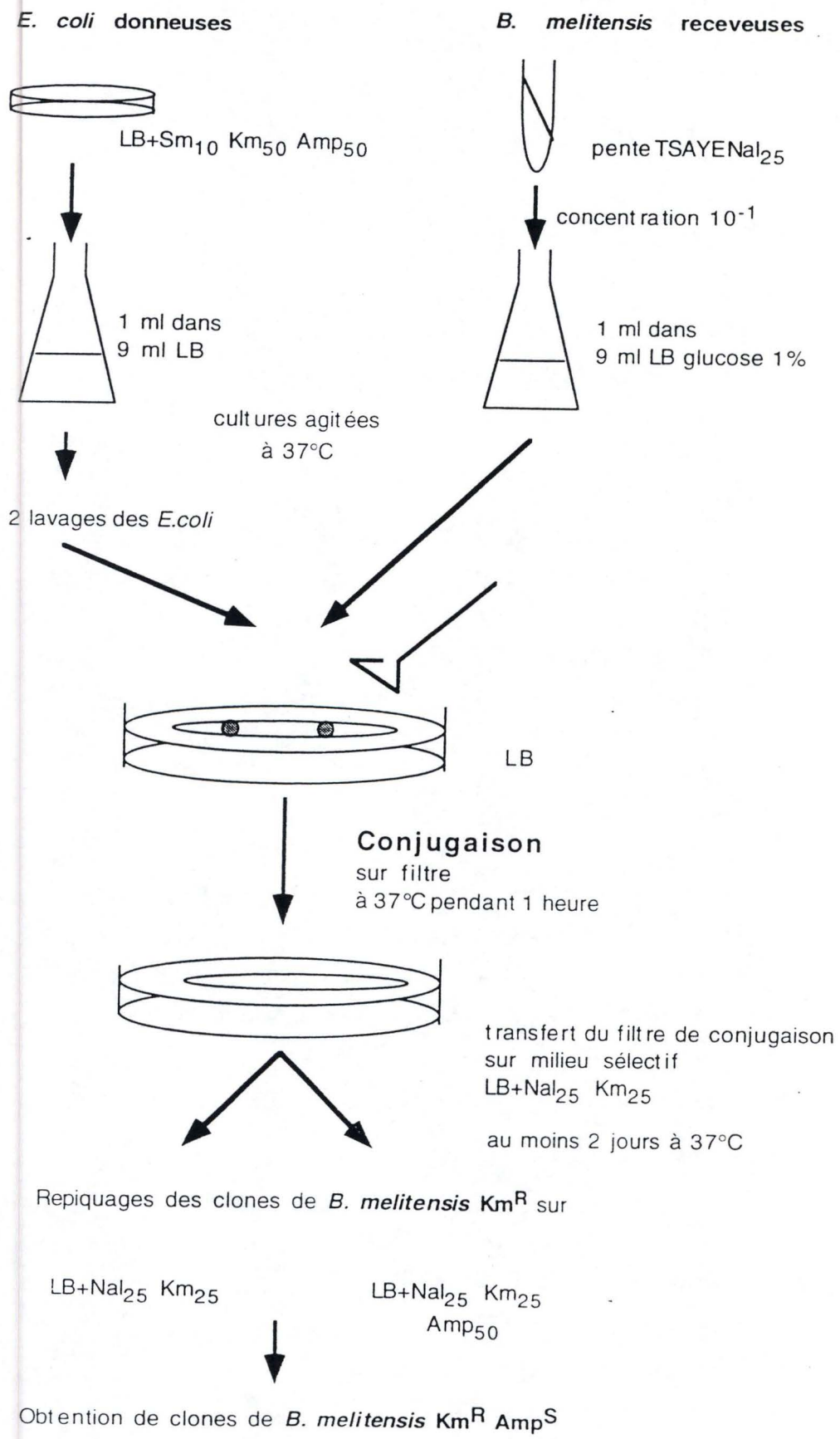


Fig. 10 : Conjugaison.

K. 1. Bactéries et plasmides employés

Les plasmides transférés sont le PKS OriT-ABC2KanABC1 et le PKS OriT-ABC2naKABC1. Ces plasmides portent la résistance à la kanamycine et à l'ampiciline.

Les bactéries utilisées sont

- *E. coli* S17 λ pir : SmR, SpR.
- *Brucella melitensis* 16M NaIR.

K. 2. Les témoins de conjugaison

Il faut s'assurer de l'absence de mutants résistant spontanément aux antibiotiques utilisés. Cela afin d'éviter la présence de faux positifs.

- L'acide nalidixique doit sélectionner les *Brucella* uniquement.
- La streptomycine doit éliminer les *Brucella* et ne conserver que les *E.coli* S17.
- La combinaison de l'acide nalidixique et de la kanamycine doit empêcher toute bactérie de pousser.

K. 3. Protocole

Un schéma de la méthode se trouve à la figure 10.

K. 3.1. Préparation des cultures liquides.

Sont nécessaires pour la conjugaison : une culture liquide en phase exponentielle pour les bactéries donneuses (*E.Coli* S17 λ pir (RP4⁺)) et une culture liquide en phase stationnaire pour les bactéries receveuses (*B.melitensis* 16M).

Préparation de la culture de *B. melitensis* 16M à partir d'une pente TSAYE Nal :

- Resuspendre et homogénéiser les colonies dans 10 ml de NaCl 0,9%.
- Réaliser une dilution 1:10 dans du NaCl 0,9%.
- Réaliser une seconde dilution 1:10 dans du LB glucose 0,1%.
- Mettre la culture à 37°C sous agitation pendant 1 à 2 jours.

Préparation de la culture d'*E.coli* S17 λ pir (RP4⁺) :

- A partir d'une préculture d'une nuit, ensemer une culture de *E.coli* S17 dans du LB le matin même de la conjugaison. Celle-ci se réalise dans l'après-midi.

Avant de réaliser la conjugaison, il faut laver les bactéries pour éliminer toute traces d'antibiotiques:

- Centrifuger les cultures pendant 25 minutes à 3000 tours/min.
- Eliminer le milieu et resuspendre les bactéries dans 1 ml de LB (1/10 du volume initial).

K. 3.2. La conjugaison s.s.

- Placer un filtre stérile 0,22 µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de petri contenant du LB.
- Déposer 100 ml de culture de *B. melitensis* et 100 ml d'*E.coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les bactéries sur toute la surface du filtre.
- incuber 1 heure à 37°C.

Ici, l'expérimentateur à le choix :

- Soit transférer le filtre tel quel sur une boîte contenant un milieu sélectif LB Nal Kan.
- Soit resuspendre les bactéries et étaler sur un milieu sélectif LB Nal Kan
- Incuber quelques jours à 37°C. Les colonies de *B. melitensis* apparaissent après environ 3 jours. Repiquer les colonies de *B. melitensis* sur les milieux sélectifs , LB Nal Km et LB Nal Km Amp afin de différencier les cointégrants des doubles recombinants.

L. Coloration au cristal violet

Cette coloration, décrite initialement par White & Wilson (1951), est utilisée pour discriminer visuellement les *Brucella* rough des smooth. La coloration s'effectue sur une boîte de Pétri contenant des colonies isolées. Les colonies rough conservent le pigment et apparaissent violettes. Par contre, les colonies smooth n'absorbent pas le pigment et apparaissent sertie d'un anneau blanc.

-Préparation de la solution stock :

- Dissoudre 2g de pigment cristal violet dans 20ml d'éthanol absolu.
- Dissoudre 0,8g d'oxalate d'ammonium dans 80ml d'eau distillée.
- Mélanger les deux solutions pour obtenir la solution stock 40x (elle se conserve pendant environs 3 mois.

- Coloration :

- La solution stock est diluée 1:40 juste avant usage.
- Recouvrir la boîte de Pétri avec la solution diluée (20ml suffisent).
- Laisser entre 15 et 20 secondes puis éliminer la solution.
- Observer rapidement les colonies à l'oeil nu ou au binoculaire.

M. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

M. 1. Principe.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation de protéines en fonction de leur taille. La polymérisation des chaînes de polyacrylamide (Fig. 11) fournit un réseau tridimensionnel que les protéines vont devoir traverser.

Le SDS est un détergent qui possède une longue chaîne hydrophobe et une tête polaire anionique (Fig. 12). A haute température, il participe à la dénaturation des protéines en se fixant stoechiométriquement à leur chaînes. Il garantit ainsi une charge égale par unité de masse de la protéine. On ajoute aussi du β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires et dénature les protéines.

Une fois dénaturées et fixées au SDS, le mélange de protéines est mis sur gel polyacrylamide et soumis à un courant électrique. Les protéines vont migrer en fonction de leur rapport charge/masse. La vitesse de migration sera inversement proportionnelle à la taille des protéines.

Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses, elles migreront donc plus rapidement.

Le gel est divisé en « stacking gel » (littéralement : gel de tassement) et « running gel » (gel de séparation).

Il y a d'abord une différence de contenu en acrylamide (4x plus pour le gel de séparation). Il y a aussi une différence de pH : le tampon de séparation a un pH basique et le stacking gel un pH acide. Le rôle du stacking gel est de concentrer les protéines afin qu'elles pénètrent toutes en même temps dans le gel de séparation.

La composition du gel de séparation varie en fonction du pourcentage de polyacrylamide utilisé. Ce pourcentage donne une mesure du degré de réticulation du gel, il est adapté suivant la taille des protéines à séparer.

Enfin, une fois séparées, les protéines peuvent être mises en évidence par coloration (au bleu de coomassie ou coloration au nitrate d'argent) ou par reconnaissance avec un anticorps spécifique par Western blot.

M. 2. Solutions, tampons & matériel.

- Tampon de stacking :

- Tris-HCl, pH 6,8 0,5M.
- SDS 4%.
- Tampon de running :
 - Tris-HCl, pH 8,8 1,5M.
 - SDS 4%.
- Tampon d'électrophorèse :
 - Tris-HCl, pH 8,3 25mM.
 - Glycine 192mM.
 - SDS 0,1%.
- Tampon d'échantillon, 5x concentré :
 - Tris-HCl, pH 6,8 0,25M.
 - SDS 10%.
 - 2-b-mercaptoéthanol 10%.
 - Glycérol 50%.
 - Bleu de bromophénol 0,25%.
- APS (persulfate d'ammonium) 10 mg/ml.
- Temed (N,N,N',N',tétraméthyléthylènediamine)
- Système d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Biorad).

M. 3. Protocole.

- Réaliser le montage du moule avec les plaques d'électrophorèse et les « spacers ».
- Préparer le gel de séparation.
- Couler le gel et ajouter un film d'éthanol pour égaliser la limite du gel.
- Laisser polymériser.
- Pendant la polymérisation, préparer le stacking gel (composition dans le tableau 4).
- Couler le stacking gel.
- Mettre le peigne en place et laisser polymériser.
- Préparer les échantillons dans le tampon d'échantillon. Les faire bouillir pendant \pm 3 minutes pour dénaturer les protéines.
- Charger les échantillons.
- La migration s'effectue à 200 volts pendant 1 heure.

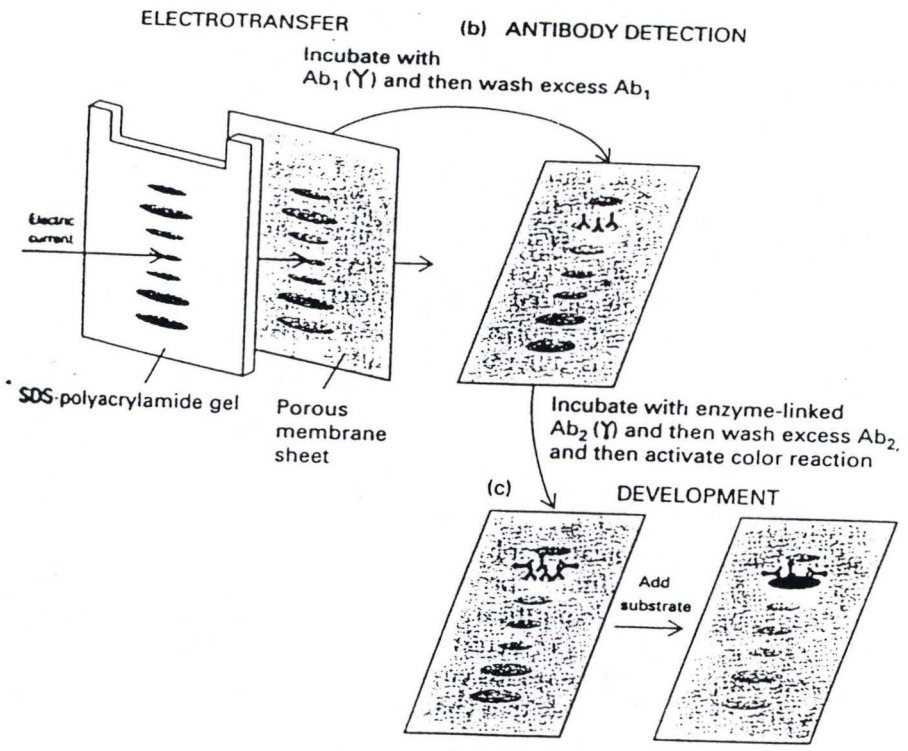


Fig. 13 : western blot.

N. Western blot.

N. 1. Principe.

Le western blot est une technique utilisée en conjointement avec l'électrophorèse en SDS-PAGE. Cette méthode allie le pouvoir de résolution du SDS-PAGE à la spécificité des anticorps. Enfin, l'utilisation d'une révélation par colorimétrie lui donne un grand pouvoir de détection.

Cette manipulation est divisée en trois parties (Fig. 13) :

- Séparation des protéines par SDS-PAGE.
- Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.
- Détection immunologique.

N. 2. Electrophorèse SDS-PAGE.

Cette étape est décrite en détail au point précédent.

N. 3. Electrotransfert sur nitrocellulose.

Le gel est tout d'abord placé dans un système de transfert où une différence de potentiel est appliquée entre le gel et la membrane. Les protéines chargées négativement sont donc transférées sur la membrane. Toute augmentation de température est nuisible au transfert des protéines.

C'est le cas quand le courant électrique est élevé. Pour éviter cela, le transfert se fait sur glace, dans un tampon de « blotting » ayant une faible force ionique.

L'efficacité du transfert dépend de la composition du tampon (pH et force ionique) mais aussi du degré de polymérisation du gel. Le tampon blotting contient aussi du méthanol, il augmente la capacité de fixation de la nitrocellulose et stabilise le gel.

N. 4. Détection & révélation immunologique.

La détection du western blot peut se faire de deux manières,

- Soit une détection directe avec un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt couplé à une enzyme de révélation (peroxydase ou phosphatase alcaline).
- Soit une détection indirecte avec un premier anticorps spécifique et un deuxième anticorps dirigé contre le premier. Le deuxième anticorps peut être couplé soit directement à la peroxydase, soit à la biotine. Dans ce dernier cas, la streptavidine liée à la peroxydase se fixe à la biotine.

La dernière méthode a l'avantage d'une plus grande sensibilité car il y a une amplification du signal. C'est celle qui sera décrite dans le protocole.

La révélation se fait par colorimétrie avec la peroxydase.

Le substrat utilisé est chloro-naphtol. C'est un composé qui sous la forme oxydée, forme un précipité coloré.

N. 5. Solutions, tampons & matériel.

- Tampon de blotting :

- Tris-HCl 25mM.
- Glycine 192mM.
- Méthanol 20%.

- TBS 10x concentré :

- Tris-HCl 200mM.
- NaCl 5M.

Ajuster à pH 7,5.

- Tampon de saturation de la membrane :

- TBS + 3% de BSA.

- Tampon de dilution des anticorps :

- TBS + BSA 1% + Tween20 0,05%.

- Tampon de lavage :

- TBS + Tween20 0,05%.

- Cuve d'électroblotting (Biorad).

- Membrane de nitrocellulose : Millipore HA 0.45 μ m (Millipore).

- Whatman chromatography paper (Whatman).

- Albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma).

- Anticorps anti couplé à la biotine : GAM biotynilated, IgG total.

- Peroxydase couplée à la streptavidine.

- Solution de révélation :

- H₂O₂ 30 μ l.
- TBS 1x 50 ml.
- 4-chloro-1-naphtol 30 mg.
(réactif HRP, Biorad).
- Méthanol 100% 10ml.

-anticorps utilisés:

-A15 5 G2 E11 (2E11)	reconnaissant l'épitope M
-B66 O4 F9 (4F9)	reconnaissant l'épitope A
-A7G 12 G 12 F12 (12G12)	reconnaissant les épitopes A et M
-A68 24 G 12 A8	reconnaissant le core

N. 6. Protocole.

N. 6.1. Electrotransfert.

- placer la membrane de nitrocellulose humidifiée dans le tampon blotting sur le gel.
- Les placer entre deux watman humidifiés.
- Les protéines sont chargées négativement et vont donc migrer vers le pôle positif (l'anode). On place donc la membrane du côté de l'anode pour assurer le transfert.
- Migration d'une heure à 100 volts dans un bac à glace.
- Changer la glace régulièrement pour limiter l'augmentation de température.

N. 6.2. Immunodétection des protéines d'intérêt.

- Saturer la membrane pendant 1 heure à 37°C avec le tampon de saturation.
- Incubation O.N. des premiers anticorps spécifique de la protéine cible. Les anticorps sont dilués dans le tampon de dilution.
- Laver 3x 10 minutes avec la solution de lavage.
- Incubation d'une heure avec les GAM couplés à la biotine (dilués 1:1000).
- Laver 3x 10 minutes avec la solution de lavage.
- Incuber une heure avec le conjugué streptavidine-peroxydase (dilué 1:2000).
- Laver 2x 10 minutes avec le tampon de lavage.
- Laver 2x 10 minutes avec du TBS, afin d'éliminer toute trace de Tween20. Celui-ci précipitant avec le chloro-naphtol.
- Préparer la solution de révélation.
- Laisser la réaction se poursuivre à l'obscurité.
- Rincer la membrane à l'eau de ville pour stopper la réaction.

Physiologie et Physiopathologie de Mr Goffinet. Ces dernières étapes ne seront donc pas décrites ici.

La réaction de séquençage s'agence comme une réaction PCR. Elle se pratique sur de l'ADN-matrice double ou simple brin ou bien sur des produits de PCR purifiés (voir point 13).

O. 3.1. Préparation du mélange de réaction.

Réaliser le mélange de réaction suivant :

- Terminator Ready Reaction Mix 8,0 μ l.
- Primer 3,2 pmoles.
- ADN-matrice :
 - Double brins (± 200 ng/ μ l) 1,5 - 2,5 μ l.
 - Simple brin (± 100 ng/ μ l) 0,5 - 1,0 μ l.
 - Produit PCR (± 20 ng/ μ l) 3 - 6 μ l.
- Compléter avec de l'eau bidistillée stérile pour un volume final de 20 μ l.

Suivant que l'appareil possède un couvercle chauffant ou pas, recouvrir le mélange de réaction avec ± 40 μ l d'huile minérale.

O. 3.2. Réaction PCR.

Utiliser le programme suivant :

- 25 cycles de trois étapes.
 - 30 secondes de dénaturation à 96°C.
 - 15 secondes d'hybridation à 55°C.
 - 4 minutes de polymérisation à 60°C.

O. 3.3. Purification des produits d'extension.

A la fin de la réaction, il faut purifier les produits d'extension afin d'éliminer l'excès de didésoxyribonucléotides marqués non-incorporés. Cette purification se fait par précipitation à l'éthanol.

- Aux 20 μ l du mélange de réaction, ajouter 2 μ l d'acétate de sodium 3M, pH 4,6 et 50 μ l d'éthanol 95%.
- Mélanger au vortex et incubé 10 minutes sur glace.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 à 60 minutes.
- Éliminer prudemment l'éthanol.
- Laver à l'éthanol 70%.
- (- Il n'est pas nécessaire et centrifuger, éliminer prudemment l'éthanol et sécher le culot).
- Conserver le culot sec à -20°C.



Bibliographie

Bibliographie

Al-Hendy, A. (1992). lipopolysaccharide of yersinia enterocolitica: molecular genetics and role in virulence. .

Alexander, D. C., and Valvano, M. A. (1994). Role of the rfe gene in the biosynthesis of the Escherichia coli O7-specific lipopolysaccharide and other O-specific polysaccharides containing N-acetylglucosamine. *J.Bacteriol.* 176 (22), 7079-7084.

Anderson, M. S. C., Bulawa, C. E., and Raetz, C. R. H. (1985). the biosynthesis of gram-endotoxin: formation of lipid A precursors from UDP-GlcNAc in extracts of E. coli. *j. biol. chem.* 260, 15536-15541.

Bastin, D. A., and Reeves, P. R. (1995). Sequence and analysis of the O antigen gene (rfb) cluster of Escherichia coli O111. *Gene* 164, 17-23.

Batchelor, R. A., Alifano, P., Biffali, E., Hull, S. I., and Hull, R. A. (1992). Nucleotide sequence of the genes regulating o-polysaccharide antigen chain length (rol) from Escherichia coli and Salmonella typhimurium: protein homology and fonctionnal complementation. *J.Bacteriol.* 174 (16), 5228-5236.

Boos, W., and Lucht, J. M. (1996). periplasmic binding protein dependent ABC transporters. In *E. coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington: asm press), pp. 1175-1210.

Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A. J., Meikle, P. J., Perry, M. B., and Peters, T. (1989). Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect.Immun.* 57, 2829-2836.

Cherwonogrodzky, J. W., Dubray, G., Moreno, E., and Mayer, H. (1990). Antigens of *Brucella*. In *Animal Brucellosis*, K. Nielsen and B. Duncan, eds. (Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc), pp. 19-64.

Chu, S., and Trust, T. J. (1993). An *Aeromonas salmonicida* gene which influences A-protein expression in *Escherichia coli* encodes a protein containing an ATP-binding cassette and maps beside the surface array protein gene. *Journal of Bacteriology* 175, 3105-3114.

Clarke, B. R., and Whitfield, C. (1992). Molecular cloning of the rfb region of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1:K20/ the rfb gene cluster is responsible for synthesis of the D-galactan I O polysaccharide. *J.Bacteriol.* 174 (14), 4614-4621.

Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G., and Limet, J. N. (1993). Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J.Gen.Microbiol.* 139, 1551-1556.

Collins, V. L., and Hackett, J. (1991). molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the rfc gene, which encode an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J. of bacteriology*, 2521-2529.

Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging Infect. Dis.* 3, 213-221.

Corbel, M. J. (1997). Recent advances in brucellosis. *J.Med.Microbiol.* 46, 101-103.

Covitz, K.-M. Y., Panagiotidis, C. H., Hor, L.-i., Reyes, M., Treptow, N. A., and Shuman, H. A. (1994). mutations that alter the transmembrane signalling pathway in an ATP binding cassette (ABC) transporter. *EMBO journal* 13, 1752-1759.

Dassa, E., and Hofnung, M. (1985). sequence of gene malG in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO journal* 4, 287-293.

Dinarello, C. A. (1991). interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *blood* 77, 1627-1652.

Escola, J.-M., Moreno, E., Chavrier, P., and Gorvel, J.-P. (1994). The O-chain of *Brucella abortus* lipopolysaccharide induces SDS-resistant MHC class II molecules in mouse B cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 203, 1230-1236.

Fath, M. J., and Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews* 57, 995-1017.

Freer, E., Moreno, E., Moriyon, I., Pizzaro-Cerda, J., Weintraub, A., and Gorvel, J.-P. (1996). *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *Journal of Bacteriology* 178, 5867-5876.

Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A. A., and Moreno, E. (1995). Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res.Microbiol.* 146, 569-578.

Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., and Letesson, J.-J. (1998). *brucella* O side chain biosynthesis. .

Hancock, R. E. W., Karunaratne, D. N., and Bernegger-Egli, C. (1994). Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules. In *Bacterial cell wall*, J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck, eds.: Elsevier Science B.V.), pp. 263-279.

Harmon, B. G., Adams, L. G., and Frey, M. (1988). Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am.J.Vet.Res.* 49 (7), 1092-1097.

Higgins, C. F. (1992). ABC transporters : from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Bio.* 8, 67-113.

Higgins, C. F., Hyde, S. C., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Gill, D. R., and Gallagher, M. P. (1990). Binding protein-dependent transport systems. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22, 571-589.

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallager, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., and Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365.

Jayaratne, P., Bronner, D., MacLachlan, P. R., Dodgson, C., Kido, N., and Whitfield, C. (1994). Cloning and analysis of duplicated *rfbM* and *rfbK* genes involved in the formation of GDP-Mannose in *Escherichia coli* O9:K30 and participation of *rfb* genes in the synthesis of group I K30 capsular polysaccharide. *J.Bacteriol.* 176 (11), 3126-3139.

Jiang, X. M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S. J., Romana, L. K., and Reeves, P. R. (1991). structure and sequence of the rfb (o antigene) gene cluster of salmonella serovar typhimurium (strain LT2). *mol. microbiol.* 5, 695-713.

Kadner, R. J. (1996). cytoplasmic membrane. In *E. coli and Salmonella; cellular and molecular biology*, F. C. Neidhart, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington: ASM press), pp. 58-88.

Keenleyside, W. J., and Whitfield, C. (1996). A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 28581-28592.

Klena, J. D., and Schnaitman, C. A. (1993). Function of the rfb gene cluster and the rfe gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Mol. Microbiol.* 9 (2), 393-402.

Mäkelä, P. H., and Stocker, B. A. D. (1984). genetics of lipopolysaccharide. *handbook of endotoxin 1*, 59-137.

McGrath, B. C., and Osborn, M. J. (1991). evidence for energy-dependent transposition of core lipopolysaccharide across the inner membrane of salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 3134-3137.

McGrath, B. C., and Osborn, M. J. (1991). Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 173, 649-654.

Meikle, P. J., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W., and Bundle, D. R. (1989). Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect. Immun.* 57, 2820-2828.

Morona, R., Mavris, M., Fallarino, A., and Manning, P. A. (1994). Characterisation of the rfc region of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 176 (3), 733-747.

Morrison, D. C., and Ryan, J. L. (1987). endotoxins and disease mechanisms. *annu. Rev. Med.* 38, 417-432.

Mourez, M., Hofnung, M., and Dassa, E. (1997). subunit interaction in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO journal* 16, 3066-3077.

Nielsen, K., and Duncan, J. R. (1990). animal brucellosis. .

Nikaido, H. (1996). outer membrane. In *E. coli and Salmonella; cellular and molecular biology*, F. C. Neidhart, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington: ASM press), pp. 29-48.

Olivier, D. B. (1996). periplasm. In *E. coli and Salmonella; cellular and molecular biology*, F. C. Neidhart, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington: ASM press), pp. 88-104.

Price, R. E., Tempelton, J. W., and Adams, L. G. (1990). Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 26, 353-365.

Proctor, R. A., Denlinger, L. C., and Bertics, P. J. (1995). Lipopolysaccharide and bacterial virulence. In *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, J. A. Roth, ed. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 173-194.

Raetz, C. R. H. (1993). bacterial endotoxin: extraordinary lipids that active eucariotic signal transduction. *journal of bacteriology*, 5745-5753.

Raetz, C. R. H. (1996). Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt, ed. (Washington, D.C.: ASM Press), pp. 1035-1063.

Reeves, P. (1994). Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. In *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck, eds. (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 281-317.

Reeves, P. (1994). Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. In *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck, eds.: Elsevier Science B.V.), pp. 281-315.

Reeves, P. (1993). Evolution of Salmonella O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *TIG 9 (1)*, 17-22.

Rick, P. D., Hubbard, G. L., and Barr, K. (1994). Role of the *rfe* gene in the synthesis of the O8 antigen in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* *176 (10)*, 2877-2884.

Rocchetta, H. L., and Lam, J. S. (1997). identification and functional characterization of an ATP transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *pseudomonas aeruginosa*. *j. of bact.*, 4713-4724.

Schnaitman, C. A., and Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol.Rev.* *57 (3)*, 655-682.

Skurnik, M., and Toivanen, P. (1993). *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide : genetics and virulence. *trends in Microbiology 1*, 148-152.

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

Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N. H., Batley, M., Redmond, J. W., Lindquist, L., and Reeves, P. (1994). Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *Journal of Bacteriology 176*, 4144-4156.

Verma, N. K., Quigley, N. B., and Reeves, P. R. (1988). O-antigen variation in *Salmonella* spp.: *rfb* gene cluster of three strains. *J.Bacteriol.* *170 (1)*, 103-107.

Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends in Microbiology 3*, 178-185.

Wu, A. M., and Mackenzie, N. E. (1987). Structural and immunochemical characterization of the O-haptens of *Brucella abortus* lipopolysaccharides from strains 19 and 2308. *Mol.Cell.Bio.* *75*, 103-111.

Wu, H. C. (1996). biosynthesis of lipoproteins. In *E. coli and Salmonella; cellular and molecular biology*, F. C. Neidhart, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B.

Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington: ASM press), pp. 1005-1015.

Yao, Z., and Valvano, M. A. (1994). Genetic analysis of the O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region (*rfb*) of *Echerichia coli* K-12 W3110: identification of genes that confer group 6 specificity to *Shigella flexneri* serotype Y and 4a. *J.Bacteriol.* 176 (13), 4133-4143.