



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Disruption des gènes codant pour les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR chez *Brucella melitensis* 16M, et analyse du phénotype des mutants

Dozot, Marie

Award date:
2002

[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.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**DISRUPTION DES GENES CODANT POUR LES REGULATEURS
TRANSCRIPTIONNELS DE LA FAMILLE CRP/FNR CHEZ *BRUCELLA
MELITENSIS* 16M, ET ANALYSE DU PHENOTYPE DES MUTANTS**

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

Marie Dozot

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0) 81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Disruption des gènes codant pour les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR chez *Brucella melitensis* 16M, et analyse du phénotype des mutants

DOZOT Marie

Résumé

Les systèmes de régulation des mécanismes de virulence mis en jeu par les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont peu connus. Le séquençage récent du génome de *Brucella melitensis* 16M permet d'envisager de nouvelles approches pour l'étude de ces mécanismes et de leur régulation. Un programme de disruption systématique de tous les régulateurs transcriptionnels de *B. melitensis* 16M a été mis en place dans notre laboratoire (V. Haine, thèse en cours), dans le but de mettre en évidence leur rôle éventuel dans le contrôle de la pathogénie chez cette bactérie.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la famille de régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr qui regroupe six membres chez *Brucella*. Les six gènes encodant ces régulateurs ont été disruptés et le phénotype des mutants a été analysé. Bien que *Brucella* ait toujours été décrite comme aérobie stricte, les observations réalisées *in silico* - recherche d'homologie et contexte génomique des gènes *crp/fnr* - suggèrent qu'au moins quatre de nos régulateurs pourraient intervenir dans le contrôle d'un processus de dénitrification anaérobie. Par ailleurs, les données expérimentales obtenues *in vitro* concordent avec cette hypothèse. De plus, des expériences d'infection en modèle murin montrent que quatre mutants de la famille Crp/Fnr sont atténués, ce qui suggère que la dénitrification que réaliserait *Brucella* pourrait être impliquée dans sa virulence. En effet, ce processus permettrait à la bactérie d'une part, de s'adapter à un environnement anaérobie rencontré lors de son cycle infectieux, et d'autre part, de détoxifier le NO, composé bactéricide produit par les macrophages lors de l'infection.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur : X. De Bolle et J-J Letesson

Je tiens avant tout à remercier le Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci de m'avoir soutenue et encouragée durant ce mémoire.

Merci au Professeur Xavier De Bolle de m'avoir suivie tout au long de ce mémoire ; merci Xavier, pour tes conseils, ta motivation (« tchu ! ») et tes encouragements.

Merci à toi ô vénérée tutrice Valérie pour : ton optimisme permanent (quasi pathologique comme dirait Val, l'autre), tes encouragements (On est motivée ?... On est motivée !), ta disponibilité (Dis-moi...), ton courage (Et oui, pas si facile de supporter les grandes stressées !), ... et la liste est encore longue ! Merci, surtout, de m'avoir épaulée durant ces quelques mois.

Je remercie Sophie Bamps, Thierry Arnould, Pierre-Emmanuel Lobert et Dominique Demonté pour leur lecture critique de ce mémoire.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre durant ce mémoire : Amélie pour ta présence, tes conseils et ton aide, et tes petites remarques bien tranchantes ; Calou pour tes conseils et ton aide précieuse lors des infections en souris (oui, ...mes mains sont toujours aussi petites) ; Marie pour ta gentillesse (...et ton ordinateur !) ; Céline et Emmeline, je suis sûre que vous me porterez chance (PS : J'en profite pour vous souhaiter tous mes vœux de bonheur.) ; Garçon pour toutes tes petites farces et la bonne humeur dont tu emplis le labo chaque jour (PS : Félicitations à l'heureux papa que tu es maintenant ; je suis sûre que ta fille est la plus belle.) (re-PS : Fais attention, tu pourrais bien rencontrer une pissette d'eau au coin d'un couloir !) ; David pour ton humour décapant (Non, je ne ressemble pas à Josiane Balasko ! En revanche, tu as quelque chose du professeur Tournesol...) ; Etienne, pour tes « bonjour, Marie ! » quotidiens, et pour tes conseils avisés en informatique. Merci aussi à Chantal, Anne, Stéphanie, Sandrine (Oui, oui, je t'offrirai une boîte de gands.), Régis, Rose-

May, Nathalie D., Mauro, Christian D., Nathalie L., Christian E., Sophie B., Max,... et tous les autres.

Merci aux copains et copines : Sophie, pour être toujours là pour moi ; ton amitié m'est très précieuse. Après cette année difficile pour toi, je tiens à te souhaiter le bonheur que tu mérites pour la nouvelle vie qui s'annonce ; Gégé, pour ta bonne humeur, tes bides dignes des plus grands champions, ton hospitalité. Merci pour ces quatre années d'études passées en ta présence (PS : il faudrait vraiment qu'on se le fasse notre petit voyage en Afrique !) ; Val, pour tes petites réflexions bien de chez toi (bidet !), tes délires (Mord sur ton clou, tape sur la ligne et c'est la dernière chique droite !), et ton hospitalité ; Céline, pour ta bonne humeur à toi aussi, ta gentillesse et tes beaux bides, qui avouons-le, valent bien ceux de Gégé ! Merci aussi à Caroline N., Caroline B., Agustina, Allan, Aline, et tous les autres.

Merci à vous, mes chers parents, de m'avoir offert l'opportunité de faire ses études ; merci pour votre soutien dans les moments difficiles, comme dans les bons moments. Merci de tout cœur. Merci aussi à toi Caro, ma frangine et à toi Fredo, mon frangin d'avoir toujours été là ; à toi Elian, mon bauf ; et à toi Michel, mon parrain. Merci à mon gros Lu, pour son affection sans limites.

Enfin, merci, et pardon aux petites souris qui ont été sacrifiées pour ce mémoire ; merci à *Brucella* pour sa coopération (Ne t'avises pas de m'infecter !) ; et merci à mon grand ami le norvanol.

1	AVANT-PROPOS	1
2	INTRODUCTION	2
2.1	LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES CHEZ LES BACTÉRIES	2
2.1.1	<i>Organisation opéronique du génome bactérien</i>	2
2.1.2	<i>les régulateurs transcriptionnels</i>	3
2.2	LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE CHEZ <i>BRUCELLA</i>	6
2.2.1	<i>Le genre Brucella</i>	6
2.2.1.1	Généralités.....	6
2.2.1.2	La brucellose	7
2.2.1.3	Pathogénie	8
2.2.2	<i>Les régulateurs transcriptionnels identifiés chez Brucella</i>	8
2.2.2.1	<i>bvrR/bvrS</i>	9
2.2.2.2	<i>vjbR</i>	9
2.2.2.3	Autres exemples de régulateurs identifiés chez <i>Brucella</i>	10
2.3	LA FAMILLE DE RÉGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS CRP/FNR	12
2.3.1	<i>Généralités</i>	12
2.3.2	<i>Classification</i>	13
2.3.3	<i>Les protéines Crp et Fnr de E. coli</i>	15
2.3.3.1	Crp de <i>E. coli</i>	15
2.3.3.2	Fnr de <i>E. coli</i>	17
2.3.4	<i>La famille Crp/Fnr chez les protéobactéries proches de Brucella</i>	19
2.3.4.1	Les régulateurs Crp/Fnr et la fixation symbiotique de l'azote.....	20
2.3.4.2	La famille Crp/Fnr et la dénitrification	22
2.3.5	<i>Rôles de régulateurs Crp/Fnr dans la virulence</i>	24
3	BUT DU MÉMOIRE	26
4	RÉSULTATS	27
4.1	IDENTIFICATION DES GÈNES DE LA FAMILLE CRP/FNR CHEZ <i>BRUCELLA MELITENSIS</i> 16M	27
4.2	ANALYSE GÉNOMIQUE DES RÉGULATEURS CRP DE <i>B. MELITENSIS</i> 16M	27
4.2.1	<i>Recherche d'homologie, alignements de séquences</i>	27
4.2.1.1	Crp1 (bmei1294).....	29
4.2.1.2	Crp2 et Crp3 (bmei1752 et bmeii0854).....	30
4.2.1.3	Crp4 et Crp5 (bmeii0966 et bmeii0986).....	31
4.2.1.4	Crp 6 (bmeii0947).....	32
4.2.2	<i>Localisation chromosomique et voisinage des gènes crp</i>	33
4.3	CONSTRUCTION DES MUTANTS INTÉGRATIFS	35
4.3.1	<i>Construction des vecteurs</i>	35
4.3.1.1	Amplification par PCR d'un fragment interne des gènes d'intérêt	35
4.3.1.2	Clonage des fragments PCR dans le pSKoriTKan.....	37
4.3.2	<i>Construction des mutants crp chez Brucella melitensis 16M</i>	38
4.3.2.1	Transfert conjugatif des constructions dans <i>B. melitensis</i> 16M.....	38
4.3.2.2	Validation des mutants par Southern blot.....	39
4.4	CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES MUTANTS.....	41
4.4.1	<i>Test au cristal violet</i>	41
4.4.2	<i>Test de survie en modèle murin</i>	42
4.4.3	<i>Test de croissance sur milieu minimum</i>	43
4.4.4	<i>Test de réduction de nitrate en anaérobiose</i>	43
4.4.4.1	Test de réduction de nitrate en anaérobiose pour le souche sauvage	44
4.4.4.2	Test de réduction de nitrate en anaérobiose pour les mutants crp.....	44

5	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	46
5.1	RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS OBTENUS	46
5.2	DISCUSSION	47
5.2.1	Rôles de <i>Crp1</i> , <i>Crp4</i> , <i>Crp5</i> et <i>Crp6</i>	47
5.2.2	Rôle de <i>Crp2</i> et <i>Crp3</i>	49
5.3	PERSPECTIVES	49
6	MATÉRIEL ET MÉTHODES	51
6.1	SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES	51
6.1.1	Souches bactériennes	51
6.1.1.1	<i>Escherischia coli</i>	51
6.1.1.2	<i>Brucella sp</i>	51
6.1.2	Plasmides	52
6.1.2.1	Test blanc/bleu	52
6.1.2.2	pSKoriTKan	52
6.2	MILIEUX DE CULTURE	53
6.2.1	Milieu <i>Luria Bertani (LB)</i>	53
6.2.2	Milieu 2YT	53
6.2.3	Milieu minimum pour <i>Brucella</i>	53
6.2.4	Milieu enrichi en nitrate	54
6.2.5	Antibiotiques	54
6.3	MANIPULATION ET ANALYSE DE L'ADN	54
6.3.1	Techniques classiques de biologie moléculaire	54
6.3.1.1	Electrophorèse en gel d'agarose	54
6.3.1.2	Réaction de ligation	55
6.3.1.3	Transformation bactérienne	56
6.3.1.4	Minipréparation d'ADN plasmidique	56
6.3.1.5	Restriction d'ADN	57
6.3.2	Amplification par PCR	57
6.3.3	Extraction d'ADN génomique de <i>Brucella sp</i>	58
6.3.4	Séquençage de l'ADN	59
6.3.5	Analyse par southern blot	59
6.3.5.1	Restriction de l'ADN génomique	60
6.3.5.2	Electrophorèse en gel d'agarose	60
6.3.5.3	Transfert et immobilisation	60
6.3.5.4	Préhybridation	61
6.3.5.5	Marquage de la sonde et hybridation	61
6.3.5.6	Détection et révélation	62
6.4	CONJUGAISON BACTÉRIENNE	63
6.5	TESTS DE CROISSANCE SUR MILIEU MINIMUM	64
6.6	TEST AU CRISTAL VIOLET	64
6.7	TEST D'ACTIVITÉ DE RÉDUCTION DE NITRATE	64
6.8	INFECTION EN SOURIS	65
6.8.1	Mode opératoire	65
6.8.1.1	Préparation des doses infectantes	65
6.8.1.2	Infection des souris	65
6.8.1.3	Dilutions sériées et comptage des doses infectantes	65
6.8.1.4	Récupération des bactéries et évaluation de la survie en souris	65
6.8.2	Solutions	66
7	BIBLIOGRAPHIE	67

1 Avant-propos

Les bactéries sont des organismes dotés d'une faculté d'adaptation remarquable. En effet, celles-ci peuvent survivre et se multiplier dans des environnements très divers, voire hostiles. Ce succès résulte de la capacité qu'ont ces organismes de percevoir les changements de leur environnement, et de moduler l'expression de leurs gènes afin de s'adapter au mieux aux nouvelles conditions rencontrées. A cette fin, les bactéries ont développé des mécanismes complexes de régulation permettant l'expression coordonnée de leurs gènes (Vicente, Chater *et al.* 1999).

Les bactéries pathogènes ne font pas exception. Le bon déroulement de leur cycle infectieux nécessite une coordination spatio-temporelle de l'expression de leurs gènes de virulence. En effet, les facteurs de virulence sont de peu d'utilité en dehors de certaines étapes du cycle infectieux de la bactérie, et doivent donc être soumis à une régulation fine et précise (Cotter and Miller 1998).

La compréhension des mécanismes de virulence mis en oeuvre par les bactéries pathogènes passe par l'identification et la caractérisation des systèmes de régulation qui contrôlent l'expression des gènes de virulence. Par ailleurs, le séquençage des génomes d'un nombre croissant de bactéries permet d'envisager de nouvelles approches pour l'étude de ces mécanismes de régulation.

Dans notre laboratoire, les bactéries du genre *Brucella* sont utilisées comme modèle d'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence. Le séquençage complet du génome de *Brucella melitensis* 16M (Delvecchio, Kapatral *et al.* 2002) nous donne l'opportunité d'effectuer une analyse systématique, à l'échelle génomique, des régulateurs transcriptionnels potentiellement impliqués dans le contrôle des mécanismes de virulence de cette bactérie. Dans ce travail, nous traitons plus particulièrement de l'étude des régulateurs transcriptionnels de la famille Crp/Fnr. Dans le génome de *Brucella*, six régulateurs appartenant à cette famille ont été identifiés, et nous tenterons de déterminer leur implication dans la virulence de cette bactérie.

2 Introduction

2.1 La régulation de l'expression des gènes chez les bactéries

2.1.1 Organisation opéronique du génome bactérien

(d'après Lengeler, Drews *et al.* 1999), (Neidhardt, Ingraham *et al.* 1990)

Pour s'adapter rapidement et efficacement aux changements environnementaux, les bactéries ont développé des stratégies leur permettant de réguler de façon adéquate l'expression de leurs gènes. Le génome bactérien est organisé en opérons, unités transcriptionnelles qui peuvent encoder un seul gène (opéron monocistronique) ou plusieurs gènes intervenant dans une même fonction cellulaire (opéron polycistronique). Chaque opéron possède un (ou plusieurs) promoteur(s), site d'atterrissage de la machinerie transcriptionnelle ; un site d'initiation de la transcription (site+1); et un signal de terminaison de la transcription (fig.1). Des séquences de contrôle, auxquelles se lient les régulateurs transcriptionnels sont également présentes dans la région promotrice.

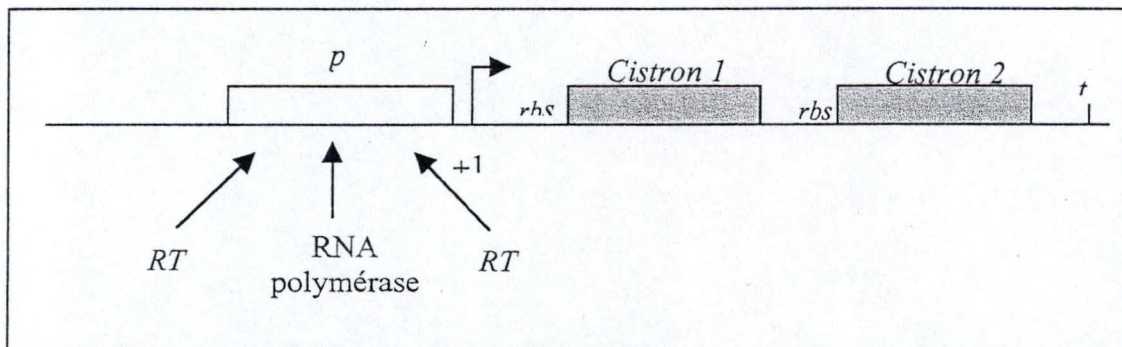


Fig.1. Organisation opéronique ; *p*, promoteur ; *RT*, régulateur transcriptionnel ; +1, site d'initiation de la transcription ; *rbs*, sites de liaison des ribosomes (sur l'ARNm) ; *cistrons 1* et *2*, gènes structuraux ; *t*, terminateur.

L'organisation opéronique permet une régulation coordonnée des gènes impliqués dans un même processus, par un régulateur transcriptionnel local (fig. 2a). Ainsi les gènes impliqués dans la dégradation du lactose sont groupés en un opéron (opéron *lac*) et sont sous la dépendance du répresseur *lacI*.

Les voies métaboliques complexes nécessitent un nombre de gènes trop important pour être groupés en un seul opéron. C'est par exemple le cas dans la voie de dégradation du glycérol et du glycérophosphate. L'ensemble des opérons encodant ce type de voie métabolique forme un régulon, qui est sous le contrôle d'un régulateur commun (fig. 2b).

Les bactéries possèdent en plus un niveau de régulation épistasique, celle du modulon. Ce dernier degré de régulation permet le contrôle simultané de groupes d'opérons liés par un objectif global commun, et répondant à un même stimulus (fig. 2c). Ainsi, les opérons et régulons intervenant dans le métabolisme des sources de carbone forment un modulon sous le contrôle du régulateur pléiotrope Crp.

En conclusion, en plus de leurs régulateurs individuels, les opérons et les régulons possèdent des régulateurs globaux permettant leur inclusion dans un modulon. De cette façon, la bactérie est capable de s'adapter efficacement, en préservant au mieux ses ressources cellulaires.

2.1.2 les régulateurs transcriptionnels

La régulation de l'expression des gènes s'opère via les promoteurs, éléments de réponse aux différents stimuli environnementaux. L'activité des promoteurs est médiée par une grande variété de régulateurs qui perçoivent l'environnement et l'état physiologique de la cellule, et ajustent la transcription de gènes spécifiques (Vicente, Chater *et al.* 1999). Les régulateurs peuvent être regroupés en deux grandes catégories : les facteurs sigma et les régulateurs transcriptionnels proprement dit.

L'ARN polymérase bactérienne (RNAP) est constituée de deux parties: l'enzyme core (sous-unités $\alpha_2\beta\beta'$) qui possède l'activité catalytique de polymérisation de l'ARN ; et les divers facteurs sigma. Ces facteurs, au nombre de sept chez *E. coli*, permettent la reconnaissance des promoteurs par la RNAP. Chaque facteur σ permet l'expression d'un groupe de gènes spécifiques. Le facteur σ^{70} (produit du gène *rpoD*) intervient, durant la phase de croissance exponentielle, dans la transcription des gènes «housekeeping» et des gènes de croissance. Les gènes spécifiques de la phase stationnaire sont quant à eux sous la dépendance du facteur σ^s . Enfin, les autres facteurs σ régulent l'expression des gènes de réponse au stress (Maeda, Fujita *et al.* 2000).

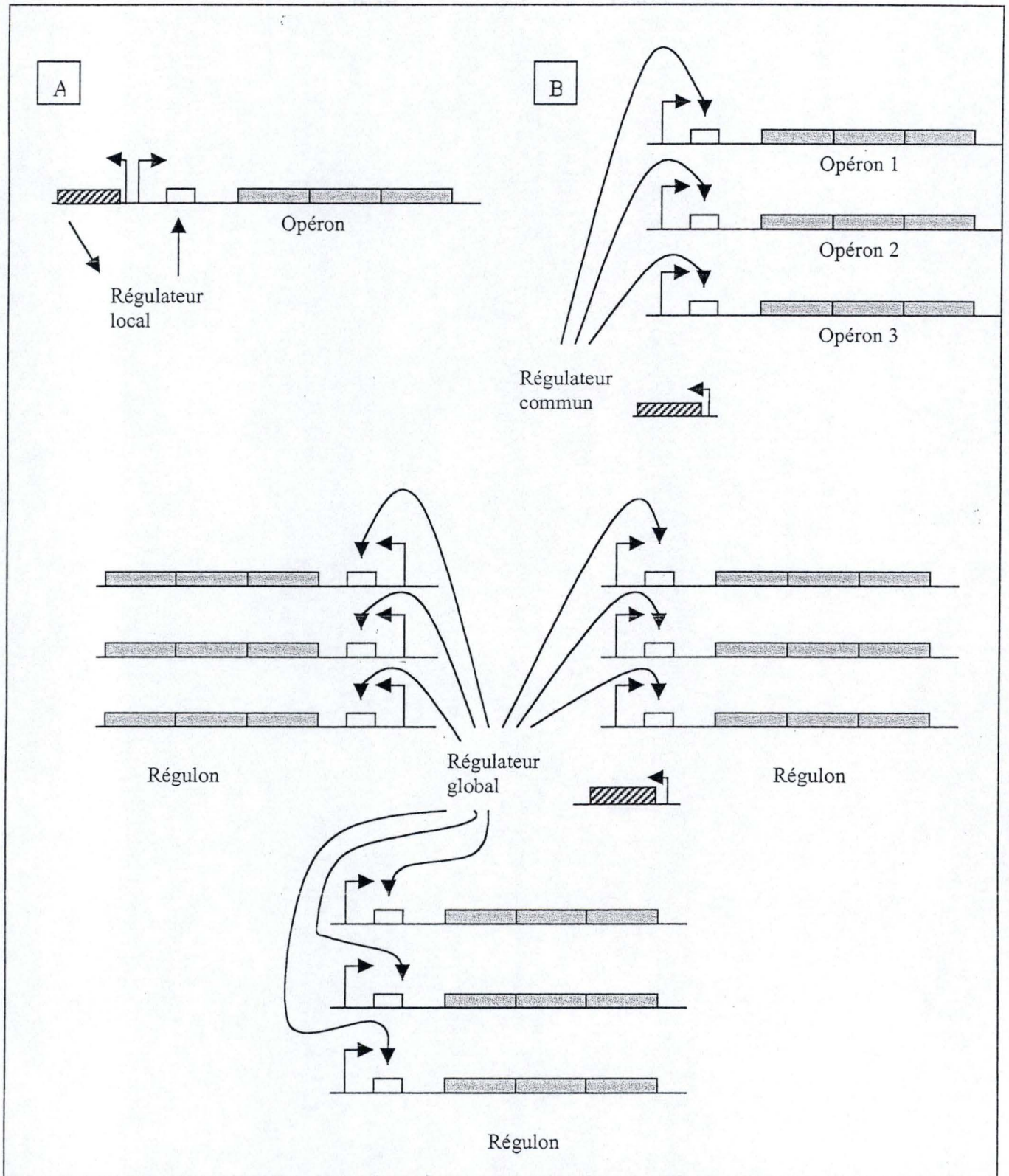


Fig.2. Modèles de régulation bactérien : A. régulation en opéron individuel par un régulateur local. B. régulation de plusieurs opérons (régulon) impliqués dans une même voie, par un régulateur commun. C. régulation de plusieurs groupes d'opérons (modulon) répondant à un même signal, par un régulateur global.

Les régulateurs transcriptionnels peuvent activer ou inhiber l'activité des promoteurs cibles (fig.1) (Lengeler, Drews *et al.* 1999). La plupart des régulateurs possèdent, en plus de leur domaine de liaison à l'ADN, un domaine senseur par lequel ils perçoivent les signaux environnementaux qui modulent leur activité. Cette modulation peut se faire de différents façons ; citons par exemple l'ajout ou le retrait d'un groupement chimique (groupement phosphate) ou encore la liaison à une molécule effectrice.

L'exemple bactérien de régulation protéique par transfert de phosphate le mieux caractérisé est le système à deux composants. Ce système comporte d'une part, une histidine protéine kinase ; et d'autre part un régulateur de réponse. Les signaux externes sont perçus par l'histidine protéine kinase qui transfère un groupement phosphate au régulateur de réponse. Cette phosphorylation active le domaine effecteur du régulateur qui se fixe dans la région promotrice des gènes cibles pour en réguler l'expression (Stock, Robinson *et al.* 2000).

L'activité des régulateurs peut également être modulée par des molécules effectrices. Ces petites molécules régulatrices sont produites en réponse à des signaux environnementaux. Elles se lient au site allostérique présent dans le domaine senseur du régulateur, induisant ainsi des changements conformationnels activateurs ou inhibiteurs. (Lengeler, Drews *et al.* 1999).

Les régulateurs peuvent être divisés en plusieurs familles, sur base de deux critères : les similarités partagées au niveau du domaine de liaison à l'ADN (Perez-Rueda and Collado-Vides 2000), et les similarités existant dans le domaine senseur s'il est présent. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la famille Crp/Fnr.

2.2 La régulation transcriptionnelle chez *Brucella*

La pathogénie d'une bactérie peut être considérée comme une progression temporelle d'événements définis. Une régulation coordonnée et efficace de ces gènes de virulence est donc essentielle au bon déroulement du cycle infectieux de la bactérie. L'identification des mécanismes qui permettent à *Brucella* de se comporter en parasite intracellulaire en est encore à ses balbutiements. Cependant plusieurs systèmes de régulation indispensables à la virulence de *Brucella* ont été caractérisés ; d'autres sont en cours d'étude.

Dans cette section, nous décrirons d'abord brièvement la bactérie du genre *Brucella*. Ensuite, nous ferons le point sur les systèmes de régulation déjà identifiés chez cette bactérie.

2.2.1 Le genre *Brucella*

2.2.1.1 Généralités

Les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles Gram-négatifs mesurant de 0.6 à 1.5 μm sur 0.5 à 0.8 μm . Ces bactéries sont décrites comme aérobies strictes, non mobiles et ne sporulent pas. Certaines souches (*B. abortus*) exigent une atmosphère enrichie en CO_2 (5 à 10 %).

L'étude des séquences d'ARN 16S des ribosomes permet le regroupement des *Brucella* dans la sous-classe alpha-2 des protéobactériacées (Moreno, Stackebrandt *et al.* 1990). A l'intérieur de cette sous-classe, *Brucella* est phylogénétiquement proche des genres *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium* et *Rickettsia* qui sont, pour la plupart, des symbiontes ou pathogènes para- ou intracellulaires de plantes et d'animaux. Classiquement, le genre *Brucella* est divisé en six espèces sur base de leur préférence pour des hôtes spécifiques et de tests biochimiques et immunologiques : *B. melitensis* (chèvre et mouton), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien) et *B. neotomae* (rat du désert) (O'Callaghan and MacMillan 2001)¹.

¹ Chaque espèce peut être subdivisée en biovar sur base de différences biochimiques et de tests immunologiques.

2.2 La régulation transcriptionnelle chez *Brucella*

La pathogénie d'une bactérie peut être considérée comme une progression spatio-temporelle d'événements définis. Une régulation coordonnée et efficace de l'expression des gènes de virulence est donc essentielle au bon déroulement du cycle infectieux de la bactérie. L'identification des mécanismes qui permettent à *Brucella* de se comporter en parasite intracellulaire en est encore à ses balbutiements. Cependant plusieurs systèmes de régulation indispensables à la virulence de *Brucella* ont été caractérisés ; d'autres sont en cours d'étude.

Dans cette section, nous décrirons d'abord brièvement la bactérie du genre *Brucella*. Ensuite, nous ferons le point sur les systèmes de régulation déjà identifiés chez cette bactérie.

2.2.1 Le genre *Brucella*

2.2.1.1 Généralités

Les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles Gram-négatifs mesurant de 0.6 à 1.5 μm sur 0.5 à 0.8 μm . Ces bactéries sont décrites comme aérobies strictes, non mobiles et ne sporulent pas. Certaines souches (*B. abortus*) exigent une atmosphère enrichie en CO_2 (5 à 10 %).

L'étude des séquences d'ARN 16S des ribosomes permet le regroupement des *Brucella* dans la sous-classe alpha-2 des protéobactériacées (Moreno, Stackebrandt *et al.* 1990). A l'intérieur de cette sous-classe, *Brucella* est phylogénétiquement proche des genres *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium* et *Rickettsia* qui sont, pour la plupart, des symbiontes ou pathogènes para- ou intracellulaires de plantes et d'animaux. Classiquement, le genre *Brucella* est divisé en six espèces sur base de leur préférence pour des hôtes spécifiques et de tests biochimiques et immunologiques : *B. melitensis* (chèvre et mouton), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien) et *B. neotomae* (rat du désert) (O'Callaghan and MacMillan 2001)¹.

¹ Chaque espèce peut être subdivisée en biovar sur base de différences biochimiques et de tests immunologiques.

Toutes les bactéries du genre *Brucella* comportent deux chromosomes circulaires d'une taille de 2.2 Mb et de 1.1 Mb respectivement² et un contenu en G+C moyen de \pm 58%. L'existence de plasmides natifs n'a jamais été mise en évidence chez *Brucella* (O'Callaghan and MacMillan 2001).

2.2.1.2 La brucellose

La brucellose est une zoonose causée par la bactérie du genre *Brucella* et particulièrement répandue dans le bassin méditerranéen, le Golfe Persique et l'Amérique Latine. Cette maladie, responsable de problèmes d'avortement et de stérilité des mâles chez les animaux domestiques et sauvages, est un réel problème économique dans les pays où elle est endémique (Boschiroli, Foulongne *et al.* 2001). Quatre espèces de *Brucella* sont pathogènes pour l'homme : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. canis*.

La brucellose humaine, mieux connue sous le nom de fièvre de Malte, est responsable d'une grande diversité de symptômes cliniques (fièvre intermittante, frisson, sueurs, faiblesse, maux de tête, anorexie, dépression ou occasionnellement splénomégalie) ; mais la maladie est asymptomatique dans environ un cas sur deux, ce qui rend sa détection difficile. Les localisations cliniques sont aussi nombreuses que diverses et la brucellose chronique amène à une série de complications ostéoarticulaire, gastrointestinale, hépatobiliaire, pulmonaire, urogénitale, neurologique et/ou cardiovasculaire (Young 1995).

La thérapie antibiotique est efficace contre la maladie ; le traitement recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé est la combinaison de deux antibiotiques : doxycycline (un dérivé de la tétracycline) et rifampicine ou streptomycine, le traitement s'étalant sur six semaines. Il n'existe pas à ce jour de vaccin contre la brucellose humaine, tous les vaccins utilisés pour les animaux restant virulents pour l'homme. Il existe trois vaccins vivants atténués couramment utilisés pour la vaccination animale : La souche Rev1 de *B. melitensis* (chèvre et mouton) ; les souche S19 et RB51 de *B. abortus* (bovin) (O'Callaghan and MacMillan 2001).

² Des différences existent au sein de l'espèce *B. suis* : le biovar 3 ne possède qu'un seul chromosome de 3.2 Mb ; les biovars 2 et 4 possèdent deux chromosomes circulaires de 1.85 et 1.35 Mb, respectivement.

2.2.1.3 Pathogénie

(d'après Pizzaro-Cerdà, Moreno *et al.* 1999)

Brucella pénètre dans son hôte par des abrasions de la peau ou par les muqueuses, et se propage ensuite à travers tout l'organisme. Après deux semaines, elle se retrouve dans la rate, et après trois à quatre semaines, elle se localise le plus fréquemment dans le système lymphatique et, chez les animaux, dans le tractus génital et les glandes mammaires. Cette propagation par le sang se fait très probablement sous forme intracellulaire, dans les neutrophiles et les macrophages. La bactériémie se prolonge souvent par une invasion de nombreux types de tissus (os, articulations, yeux).

Brucella est un pathogène intracellulaire facultatif ; chez son hôte, elle survit et se multiplie dans des cellules phagocytaires professionnelles et dans des cellules phagocytaires non professionnelles. De récentes études ont montré que *Brucella* utilise une stratégie unique qui consiste à modifier le processus de maturation du phagosome pour créer un nouvel environnement intracellulaire dans lequel elle se multiplie.

Après internalisation par les cellules phagocytaires non professionnelles, *Brucella* interagit avec les endosomes précoces, mais elle évite la fusion avec les endosomes tardifs. Elle tire ensuite profit de la machinerie autophagique de la cellule hôte et inhibe la maturation de l'autophagosome dans lequel elle se trouve, qui mûrira ensuite en une vésicule proche du réticulum endoplasmique qui constitue sa niche répliquative. Dans les cellules phagocytaires professionnelles, *Brucella* se localise dans un phagosome qui évite la fusion lysosomale, et se réplique dans un compartiment membranaire.

2.2.2 Les régulateurs transcriptionnels identifiés chez *Brucella*

Parmi les quelques régulateurs transcriptionnels déjà identifiés chez *Brucella*, certains sont indispensables pour la virulence de la bactérie. C'est le cas du système à deux composants *bvrR/bvrS* et du régulateur *vjbR*. Dans un premier temps, nous décrirons brièvement ce qui est connu de ces deux régulateurs ; ensuite nous citerons d'autres exemples de régulateurs ne jouant pas de rôle essentiel dans la virulence de *Brucella*.

2.2.2.1 *bvrR/bvrS*

(d'après Sola-Landa, Pizarro-Cerda *et al.* 1998)

BvrR/BvrS est un système de régulation à deux composants essentiel pour la virulence de *B. abortus* en modèles cellulaire et murin. Ces deux protéines sont homologues aux systèmes ChvI/ChvG de *A. tumefaciens* et ChvI/ExoS de *Rhizobium meliloti*, qui sont essentiels pour les interactions hôte-bactérie.

Les mutants dans le système *bvrR/bvrS* sont affectés dans leur capacité à pénétrer dans les cellules HeLa et montrent une sensibilité exacerbée vis-à-vis de peptides cationiques tels que la polymyxine A. En outre, ces mutants sont incapables de se répliquer que ce soit dans les cellules phagocytaires professionnelles ou les cellules phagocytaires non professionnelles. Après leur entrée dans la cellule, ils co-localisent rapidement avec un marqueur lysosomal, la cathepsine D, ce qui laisse penser qu'ils sont incapables de détourner la voie d'endocytose.

Le ou les signaux environnementaux perçus par le système *bvrR/bvrS* sont encore inconnus, mais le phénotype polymyxine-sensible du mutant suggère qu'il contrôle l'expression de composants de la paroi bactérienne. En effet, l'intégrité de cette paroi, qui résiste aux peptides cationiques bactéricides, est indispensable à la virulence de *Brucella*. Par ailleurs, des études récentes ont montré que le système BvrR/BvrS intervient dans le contrôle de la synthèse du lipide A et de l'omp25, deux constituants de la paroi bactérienne (Moreno and Moriyon 2002).

2.2.2.2 *vjbR*

B. melitensis possède un opéron de 12 kb qui encode un système de sécrétion de type IV homologue au système VirB de *Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan and MacMillan 2001). Ce pathogène de plante provoque des tumeurs chez son hôte en transférant l'ADN du plasmide Ti dans le noyau de la cellule végétale, via le système de transport contact-dépendant VirB. L'appareil de sécrétion VirB permet donc aux bactéries de transporter des macromolécules à travers leur enveloppe vers d'autres cellules, après un contact intercellulaire (Rodolfo 1999).

Les mutants des gènes de l'opéron *virB* de *Brucella* perdent leur capacité à se multiplier en macrophages et en cellules épithéliales. De plus, le système *virB* est essentiel

pour la virulence en souris (R-M.Delrue, thèse en cours). La protéine VjbR de *Brucella* est un régulateur transcriptionnel de la famille luxR qui active la transcription de l'opéron *virB*. Le mutant *vjbR* est lui aussi atténué dans sa virulence en modèles murin et cellulaire (R-M.Delrue, thèse en cours). Par ailleurs, les mutants *vjbR* et *virB* s'associent aux mêmes marqueurs au cours de leur trafic avorté en cellules HeLa (R-M.Delrue, thèse en cours).

Le gène *vjbR* a un taux d'expression basal, et les données préliminaires suggèrent que *vjbR* s'autorégule et que son expression est modulée par la densité de population bactérienne (quorum sensing) (R-M.Delrue, thèse en cours).

2.2.2.3 Autres exemples de régulateurs identifiés chez *Brucella*

Le système de régulation à deux composants *ntrB/ntrC* joue un rôle dans le métabolisme de l'azote et peut être impliqué dans la virulence de plusieurs espèces bactériennes. Chez *B. suis*, un mutant *ntrC* a été construit. *In vitro*, ce mutant montre une réduction de l'activité métabolique en présence de nombreux acides aminés. En modèle murin, sa virulence n'est pas significativement atténuée ; cependant, durant les quatre premiers jours d'infection, il se multiplie moins rapidement que la souche sauvage (Dorrell, Guigue-Talet *et al.* 1999).

Un autre système de régulation à deux composants, connu pour son implication dans la régulation de la capture du fer, notamment chez *Rhizobium leguminosarum*, a été identifié chez *B. suis*. Il s'agit du système *feuP/feuQ*. Le mutant *feuP* de *B. suis* n'est atténué ni en macrophage, ni en modèle murin. De plus, la croissance de ce mutant en conditions de limitation en fer n'est pas affectée. La fonction du système *feuPQ* chez *B. suis* reste à élucider (Dorrell, Spencer *et al.* 1998).

CtrA est un régulateur central présent chez de nombreuses alpha-protéobactéries. Chez *Caulobacter crescentus*, ce régulateur, essentiel pour la viabilité, contrôle directement ou indirectement l'expression d'un grand nombre de gènes du cycle cellulaire dont sa propre expression. Chez *B. abortus*, l'identification des gènes potentiellement régulés par CtrA suggère que cette protéine contrôle des processus cellulaires en partie similaires à ceux régulés par CtrA chez *C. crescentus* (Bellefontaine, Pierreux *et al.* 2002). L'hypothèse du

rôle central de CtrA dans l'adaptation de *Brucella* à son double mode de vie, parasitaire ou libre est investiguée (R.Hallez, thèse en cours).

Le gène *oxyR*, qui encode un régulateur de la famille LysR, est bien caractérisé chez *E. coli* et *Salmonella* chez qui il joue un rôle important dans l'adaptation au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Un homologue de *oxyR* a été identifié chez *B. abortus* et le mutant correspondant montre une sensibilité accrue à l' H_2O_2 (Kim and Mayfield 2000). L'implication éventuelle du gène *oxyR* dans la virulence de *B. abortus* n'a pas été démontrée.

2.3 La famille de régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr

Un programme d'identification et de caractérisation des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la virulence de *B. melitensis* est en cours dans notre laboratoire (V.Haine, thèse en cours). Nous nous intéressons plus particulièrement au rôle éventuel des régulateurs de la famille Crp/Fnr dans la pathogénie de *Brucella*. Dans cette section, nous décrirons donc les régulateurs de cette famille : les protéines Crp et Fnr de *E. coli*, les autres membres de la famille chez les espèces proches de *Brucella*, et le rôle joué par certains des régulateurs Crp/Fnr dans la virulence.

2.3.1 Généralités

La famille de régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr tire son nom de ses deux membres les mieux caractérisés : la protéine Crp (cyclic AMP receptor protein ou Cap pour catabolite activator protein) et la protéine Fnr (fumarate nitrate reductase regulator) de *E. coli*. A ce jour, cette famille regroupe au moins 70 membres répartis entre de nombreuses espèces bactériennes, et qui, en réponse à des signaux métaboliques et environnementaux, régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus physiologiques très divers.

Tous les membres de la famille Crp/Fnr partagent des éléments structuraux communs qui permettent le regroupement au sein d'une même famille (fig.3). En effet, chaque protéine possède à son extrémité C-terminale un domaine de liaison à l'ADN caractérisé par un motif consensus hélice-coude-hélice (consensus HTH) permettant la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN. La partie centrale de la protéine comporte une longue hélice α impliquée dans la dimérisation. Enfin, la partie N-terminale est constituée d'un domaine senseur du régulateur dont la conformation rappelle vaguement un tonneau β . Dans la partie N-terminale, cinq résidus glycine sont presque toujours conservés ; ils interviennent dans la séparation des brins β qui constituent le domaine senseur (Fischer 1994) (Anjum, Green *et al.* 2000).

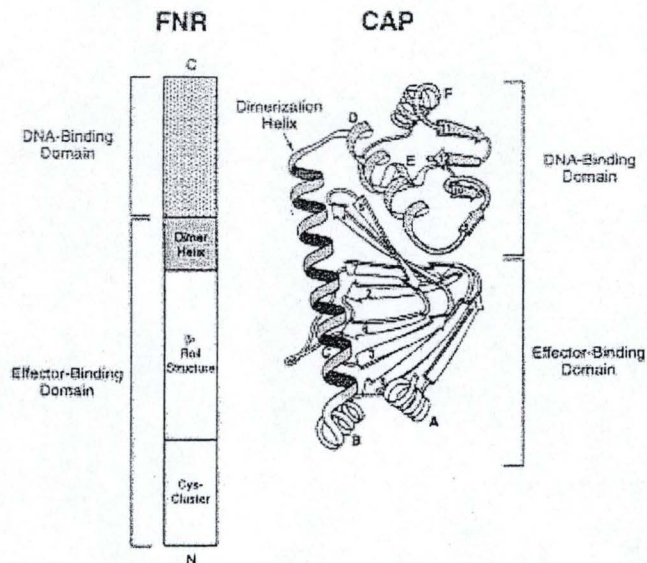


Fig.3. Structures de Fnr et Cap (Catabolite activator protein, aussi appelée Crp pour cAMP receptor protein).(d'après Kiley et Beinert, 1999)

2.3.2 Classification

Les différences existant dans les séquences en acides aminés et dans les fonctions respectives des membres de la famille Crp/Fnr permettent de les répartir en trois classes distinctes (Fischer 1994) (fig 4).

La classe I regroupe principalement des régulateurs impliqués dans le contrôle de phénomènes dépendant de la concentration en oxygène, et dont l'archétype est la protéine Fnr de *E. coli*. Sur base de la conservation de certains résidus dans leur domaine fonctionnel, les protéines de classe I peuvent être subdivisées en trois sous-classes. La classe IA regroupe la protéine Fnr, ainsi que d'autres protéines qui possèdent toutes quatre résidus cystéine conservés (trois dans le domaine N-terminal et un dans la partie centrale de la protéine) impliqués dans la formation d'un centre fer-soufre senseur de l' O_2 . La classe IB regroupe des protéines qui possèdent également quatre cystéines conservées, mais leur espacement dans le domaine N-terminal est plus variable. Les protéines de classe IC se distinguent par l'absence de cystéines conservées. Notons que la création d'un sous-groupe supplémentaire au sein de la classe I a été proposée. Cette nouvelle sous-classe regroupe notamment la protéine Dnr impliquée dans le contrôle du processus de dénitrification chez *Pseudomonas stutzeri* (Vollack, Hartig *et al.* 1999).

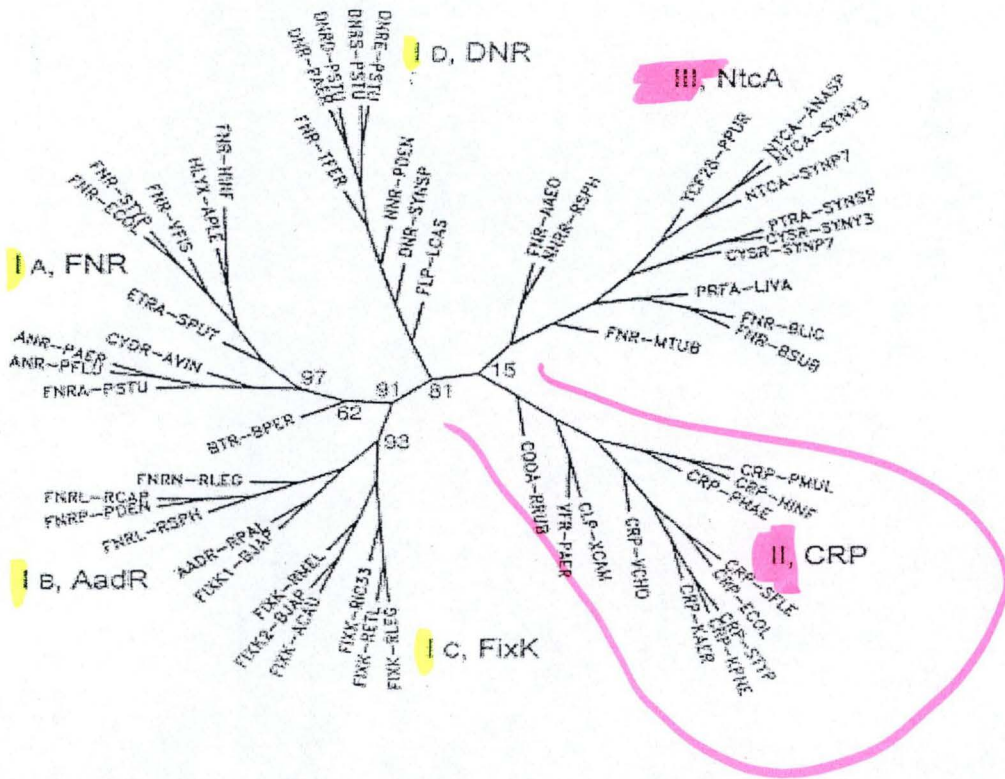


Fig.4. Arbre phylogénétique de la famille Crp-Fnr. (d'après Vollack *et al.*, 1999). AADR-RPAL, *Rhodopseudomonas palustris*; ANR-PAER, *Pseudomonas aeruginosa*; ANR-RFLU, *Pseudomonas fluorescens*; BTR-BPER, *Bordetella pertussis*; CLP-XCAM, *Xanthomonas campestris*; COOA-RRUB, *Rhodospirillum rubrum*; CRP-ECOL, *Escherischia coli*; CRP-HINF, *Haemophilus influenzae*; CRP-KAER, *Klebsiella aerogenes*; CRP-KPNE, *Klebsiella pneumoniae*; CRP-MTUB, *Mycobacterium tuberculosis*; CRP-PHAE, *Pasteurella haemolytica*; CRP-PMUL, *Pasteurella multica*; CRP-SFLE, *Shigella flexneri*; CRP-STYP, *Salmonella typhimurium*; CRP-VCHO, *Vibrio cholerae*; CYDR-AVIN, *Azotobacter vinelandii*; CYSR-SYNP7, *Synechococcus sp.*; CYSR-SYNY3, *Synechocystis sp.*; DNR-PAER, *Pseudomonas aeruginosa*; DNRD-PSTU, DNRE-PSTU et DNRS-PSTU, *Pseudomonas stutzeri*; DNR-SYNP, *Synechocystis sp.*; ETRA-SPUT, *Shewanella putrefasciens*; FIXK-ACAU, *Azorhizobium caulinodans*; FIXK₁-BJAP, *Bradyrhizobium japonicum*; FIXK-RETL, *Rhizobium etli*; FIXK-RIC33, *Rhizobium sp.*; FIXK-RLEG, *Rhizobium leguminosarum*; FIXK-RMEL, *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*; FIXK₂-BJAP, *Bradyrhizobium japonicum*; FLP-LCAS, *Lactobacillus casei*; FNR-AAEO, *Aquifex aeolicus*; FNR-BLIC, *Bacillus licheniformis*; FNR-BSUB, *Bacillus subtilis*; FNR-ECOL, *Escherischia coli*; FNR-HINF, *Haemophilus influenzae*; FNR-VFIS, *Vibrio fischeri*; FNR-STYP, *Salmonella typhimurium*; FNR-TFER, *Thiobacillus ferrooxidans*; FNRA-PSTU, *Pseudomonas stutzeri*; FNRL-RCAP, *Rhodobacter capsulatus*; FNRL-RSPH, *Rhodobacter sphaeroides*; FNRP-PDEN, *Paracoccus denitrificans*; FNRN-RLEG, *Rhizobium leguminosarum*; HLYX-APLE, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; NNR-PDEN, *Paracoccus denitrificans*; NRRR-RSPH, *Rhodobacter sphaeroides*; NTCA-SYNP7, *Synechococcus sp.*; NTCA-SYNP3, *Synechocystis sp.*; NTCA-ANASP, *Anabaena sp.*; PRFA-LIVA, *Listeria ivanovii*; PTRASYNP, *Synechococcus sp.*; VFR-PAER, *Pseudomonas aeruginosa*; YCF28-PPUR, *Porphyra purpurea*.

La classe II comprend des régulateurs impliqués dans le contrôle de gènes cataboliques, tels que la protéine Crp de *E. coli* et d'autres protéines de type Crp hautement conservées chez de nombreuses espèces bactériennes. Il faut cependant noter que certaines protéines de classe II, moins conservées, interviennent plutôt dans le contrôle de processus tels que le développement de la compétence (*Haemophilus influenzae*) ou la phytopathogénicité (*Xanthomonas campestris*).

Les protéines de la classe III sont principalement impliquées dans la régulation du métabolisme de l'azote et du soufre chez les cyanobactéries, ainsi que dans le contrôle de la réduction oxygène-dépendante du nitrate et du métabolisme du CO.

2.3.3 Les protéines Crp et Fnr de *E. coli*

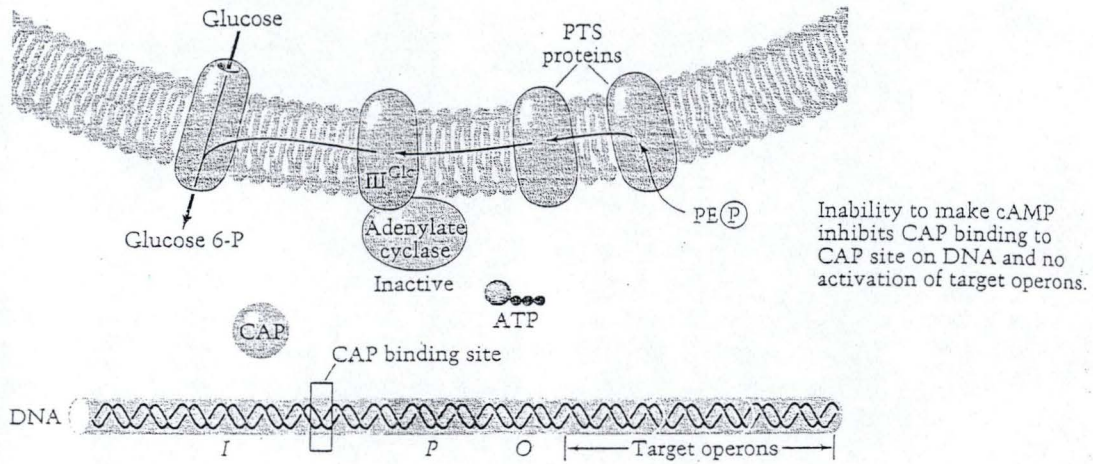
2.3.3.1 Crp de *E. coli*

(d'après (Saier, Ramseier *et al.* 1996); (Neidhardt, Ingraham *et al.* 1990))

La protéine Crp est, avec Fnr, le régulateur le mieux caractérisé de la famille Crp/Fnr. Crp est un dimère constitué de deux sous-unités identiques de 209 acides aminés. Le domaine C-terminal de chaque monomère comporte le consensus HTH de liaison à l'ADN caractéristique des protéines de la famille Crp/Fnr. La partie centrale comporte l'hélice α de dimérisation, et la partie N-terminale comporte le domaine senseur de la protéine. Ce dernier domaine, constitué d'une série de plans β , intervient dans l'activation allostérique de la protéine par l'AMP cyclique. Enfin, chacun des deux domaines fournit également des sites d'interaction avec l'ARN polymérase (Anjum, Green *et al.* 2000).

La protéine réceptrice d'AMP cyclique (Crp) intervient, avec l'AMP cyclique dans un phénomène bien caractérisé chez les entérobactéries, et dénommé répression catabolique. Quand une source de carbone facilement assimilable comme le glucose est présente dans son milieu de croissance, la bactérie n'active pas la synthèse des enzymes impliqués dans le métabolisme d'autres sources de carbone. Ce mécanisme dépendant du complexe cAMP-Crp est régulé par le système PTS (phosphotransferase system) dont la protéine effectrice est l'enzyme IIA^{glc} (anciennement III^{glc}). L'enzyme IIA^{glc} phosphorylée constitue l'activateur allostérique de l'adénylate cyclase, enzyme qui catalyse la synthèse d'AMP cyclique.

(A) Catabolite repression in the presence of glucose



(B) Catabolite activation in the absence of glucose

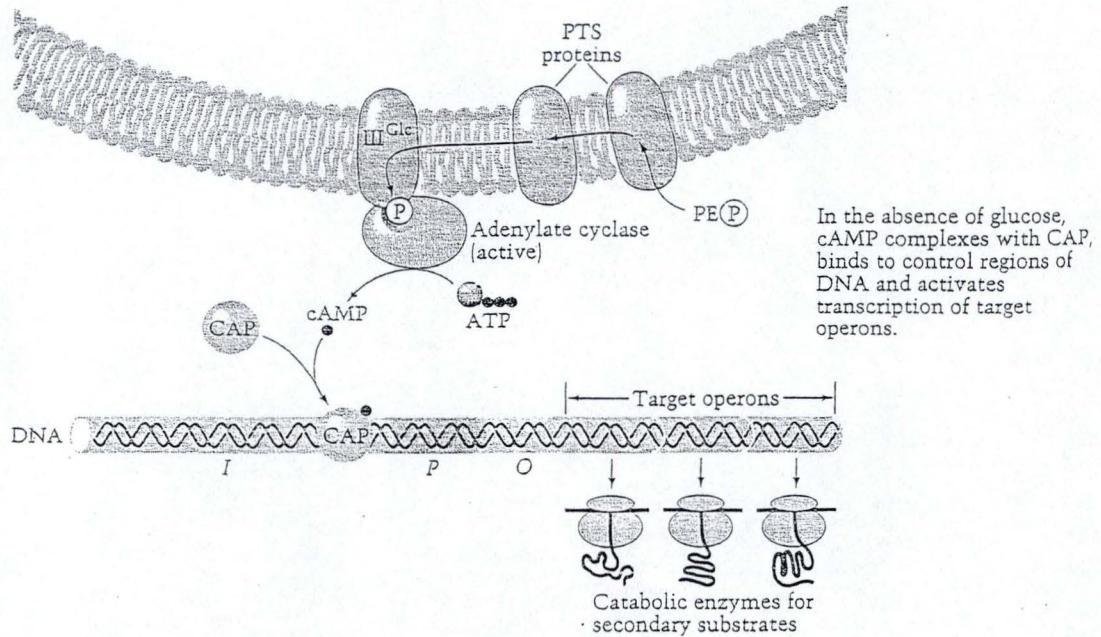


Fig.5. Modèle de la répression catabolique chez *E. coli*. ((Neidhardt, Ingraham et al. 1990))

Durant le transport de glucose, le taux de IIA^{glc} phosphorylée est bas, car le groupement phosphate est rapidement transféré aux molécules de glucose pour former le glucose-6-P. L'adénylate cyclase se trouve donc sous sa forme inactive. Lorsqu'il n'y a plus de glucose dans le milieu, le taux de IIA^{glc} phosphorylée augmente rapidement, l'adénylate cyclase est activée, et le taux d'AMPc augmente dans la cellule. La protéine Crp est activée allostériquement par l'AMP cyclique : la liaison de l'AMP cyclique à Crp induit un changement conformationnel de la protéine qui lui permet de se lier à des séquences d'ADN spécifiques, en amont de ses gènes cibles, gènes sujets à la répression catabolique et intervenant dans le métabolisme du carbone (gènes *lac* (lactose), gènes *gal* (galactose), gènes *mal* (maltose), etc.) (fig.5). La présence du complexe cAMP-Crp offre la possibilité de métaboliser une source de carbone alternative. Le choix de la nouvelle voie métabolique empruntée dépend de l'inducteur présent dans le milieu (lactose, maltose,...).

Le complexe cAMP-Crp peut également agir comme répresseur de la transcription de certains gènes. Ainsi quand Crp est actif, il inhibe l'expression du gène *cya* codant pour l'adénylate cyclase. Crp inhibe également sa propre expression.

Le modulon cAMP-Crp est en fait plus étendu que l'ensemble des gènes sujets à la répression catabolique. Crp intervient, avec l'AMP cyclique, dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires comme par exemple la division cellulaire, l'entrée en phase stationnaire, la synthèse du flagelle. Enfin, le complexe cAMP-Crp contrôle, directement ou indirectement, l'expression de gènes impliqués dans la capture du fer, l'utilisation d'azote, la production de toxines, la régulation du pH, ...

2.3.3.2 Fnr de *E. coli*

La protéine Fnr est un régulateur global qui contrôle l'expression des gènes du métabolisme anaérobique en réponse au manque d'O₂. Cette protéine de 250 acides aminés est, d'un point de vue structural, homologue à la protéine Crp. Cependant, de nombreuses différences structurales apparaissent entre les deux protéines (Lynch and Lin 1996). Dans la partie N-terminale de la protéine Fnr, les résidus qui, chez Crp, interviennent dans la liaison à l'AMP cyclique ne sont pas présents. En effet, Fnr répondant à un autre signal que

Crp, en l'occurrence l'O₂, d'autres résidus sont déterminants dans le domaine senseur de la protéine.

Chez Fnr, quatre cystéines (Cys-20, Cys-23, Cys-29 dans le domaine N-terminal et Cys-122 dans le tonneau β) interviennent dans la formation d'un centre [4Fe-4S] senseur de l'O₂. En anaérobie, chaque monomère de Fnr possède un centre [4Fe-4S] qui permet la dimérisation, et de ce fait la liaison à l'ADN cible. En aérobie, ce centre [4Fe-4S] est dissocié, ce qui diminue la liaison à l'ADN en défavorisant la dimérisation. Lors de la transition d'un milieu aérobie à un milieu anaérobie, la synthèse de novo de protéines n'est pas requise pour observer l'activation de Fnr ; ce qui laisse supposer que la dissociation du centre [4Fe-4S] est réversible (Khoroshilova, Beinert *et al.* 1995) ; (Kiley and Beinert 1998).

De récentes études sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la dimérisation de Fnr suggèrent que la dimérisation de la protéine est médiée par l'association de résidus hydrophobes entre l'hélice α de chaque monomère. La formation du centre Fe-S en anaérobie pourrait induire, via l'interaction avec des résidus de l'hélice α, un changement conformationnel de celle-ci, permettant ainsi la dimérisation (Moore and Kiley 2001) (fig.6).

La protéine Fnr intervient dans le contrôle de phénomènes différents de Crp ; elle active positivement l'expression de nombreux gènes impliqués principalement dans les adaptations de la bactérie à la croissance en anaérobie : respiration anaérobie de nitrate, nitrite, fumarate, etc. Fnr est également un répresseur anaérobie de plusieurs gènes intervenant dans des processus aérobie. La régulation de l'expression des gènes cibles de Fnr peut se faire coopérativement avec d'autres régulateurs globaux. Les gènes dont l'expression est contrôlée par Fnr ont en commun la présence d'un site consensus pour la liaison de Fnr à l'ADN. Cette séquence palindromique (5'-TTGATnnnnATCAA-3') est appelée la «boîte Fnr» (Lynch and Lin 1996) et ressemble au motif de liaison à l'ADN de Crp (TGTGATnnTAnnTCACA) (Saier, Ramseier *et al.* 1996).

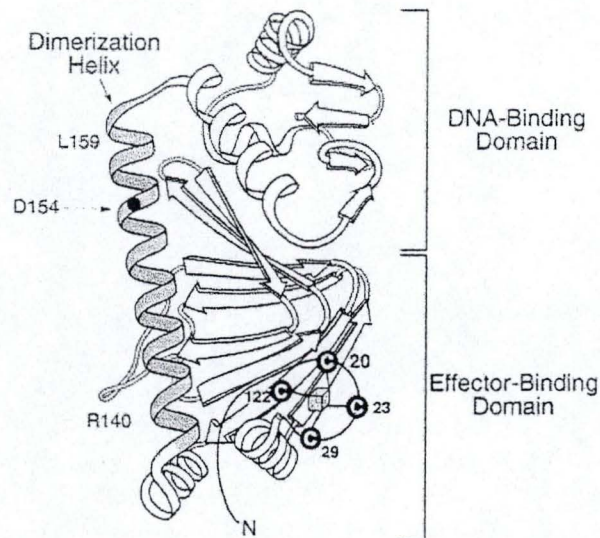


Fig.6. Modèle proposé de l'hélice de dimérisation et du centre Fe-S de Fnr en utilisant la structure de Crp : En aérobie, la charge négative du résidu D154 empêcherait la dimérisation de Fnr. En anaérobie, le centre Fe-S se formerait et induirait un changement conformationnel en interagissant avec des résidus proches situés sur la face interne de l'hélice de dimérisation (Leu-146 et Arg-145). Ce changement de conformation permettrait au résidu Ile-151 de masquer la charge négative de D154, autorisant ainsi la dimérisation (Moore and Kiley 2001)

2.3.4 La famille Crp/Fnr chez les protéobactéries proches de *Brucella*

Brucella appartenant à la sous-classe $\alpha 2$ des protéobactéries, il est intéressant d'examiner les rôles des régulateurs Crp/Fnr déjà décrits chez d'autres espèces de cette sous-classe, ou chez d'autres espèces proches. La plupart de ces régulateurs se trouvent dans la classe I de la famille Crp/Fnr (fig 4), et interviennent donc principalement dans des phénomènes dépendants de la concentration en oxygène. Plus particulièrement, ces régulateurs contrôlent différentes étapes du cycle de l'azote réalisées par les bactéries : la fixation symbiotique de l'azote chez les Rhizobiacées (*Bradhyrhizobium japonicum*, par exemple), ainsi que le processus de dénitrification chez les bactéries du groupe Rhodobacter (*Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, par exemple) et chez les Rhizobiacées (fig.7). Dans la section suivante, nous nous attacherons à décrire le fonctionnement de ces régulateurs à travers plusieurs exemples.

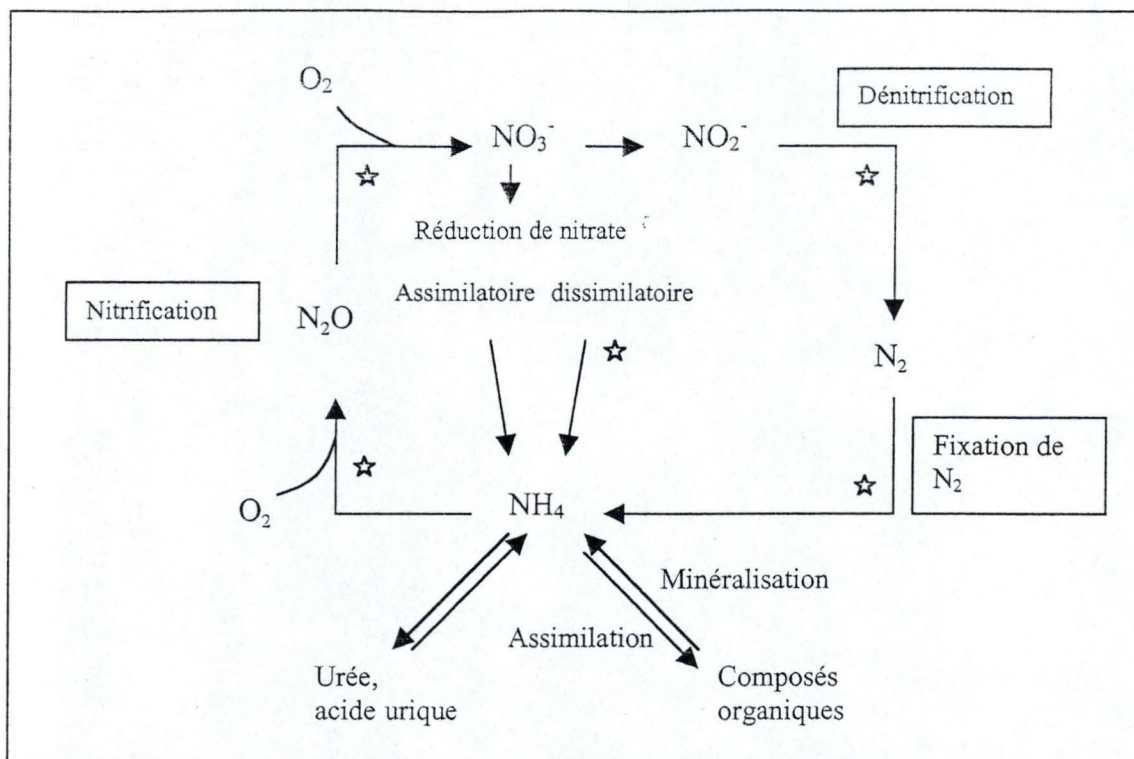


Fig.7. Réaction clé du cycle de l'azote. Les réactions catalysées exclusivement par les procaryotes sont marquées par une étoile (d'après (Lengeler, Drews *et al.* 1999)

2.3.4.1 *Les régulateurs Crp/Fnr et la fixation symbiotique de l'azote* (Fischer 1994)

Les bactéries du genre *Rhizobium* établissent des relations symbiotiques étroites avec des plantes de la famille des légumineuses. Ce sont des bactéries fixatrices d'azote : elles réduisent l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4). Ce processus est très coûteux en énergie et la nitrogénase (complexe enzymatique qui fixe l'azote) est très sensible à l'oxygène moléculaire (O_2). Les nodules racinaires des légumineuses dans lesquels se logent les bactéries fournissent la source d'énergie et l'environnement microaérobie requis par ces dernières pour effectuer la fixation de l'azote atmosphérique ; en échange, les bactéries procurent à la plante une source d'azote sous forme réduite.

Lors de l'infection des nodules racinaires, la bactérie passe donc d'un environnement aérobie à un environnement microaérobie. Ce changement environnemental constitue le signal pour la bactérie, qui active des cascades de régulation, aboutissant à l'expression des gènes requis pour la fixation de l'azote et des gènes permettant la respiration dans ces nouvelles conditions (Fischer 1996). Ces cascades de régulation regroupent différents acteurs dont plusieurs appartiennent à la famille Crp/Fnr. Parmi ces régulateurs, homologues de Fnr, certains possèdent les quatre résidus cystéine nécessaires à la formation d'un centre 4Fe-4S senseur de l' O_2 : fixK₁ de *B. japonicum* (Anthanamatten, Green *et al.* 1992), FnrN₁ et FnrN₂ de *Rhizobium etli* (Lopez, Morera *et al.* 2001) et de

Rhizobium leguminosarum (Gutierrez, Hernando *et al.* 1997). Chez d'autres régulateurs, ces cystéines sont absentes : FixK₂ de *B. japonicum* (Anthanametten, Rossi *et al.* 1998), fixK de *Sinorhizobium meliloti* (Reyrat 1993) et de *R. elti* (Lopez, Morera *et al.* 2001).

Pour comprendre le rôle de ces régulateurs, prenons l'exemple de FixK₁ et FixK₂ de *B. japonicum* (fig 8) (Fischer 1994); (Anthanametten, Rossi *et al.* 1998). Chez cette espèce, FixK₂ occupe une position centrale dans la cascade de régulation qui active la transcription des gènes nécessaires à la fixation de l'azote. L'expression du gène *fixK₂* est sous le contrôle du système à deux composants FixLJ : la protéine membranaire FixL est une hémoprotéine kinase/phosphatase qui, en réponse à une faible tension en O₂, phosphoryle la protéine FixJ qui active alors la transcription de *fixK₂*.

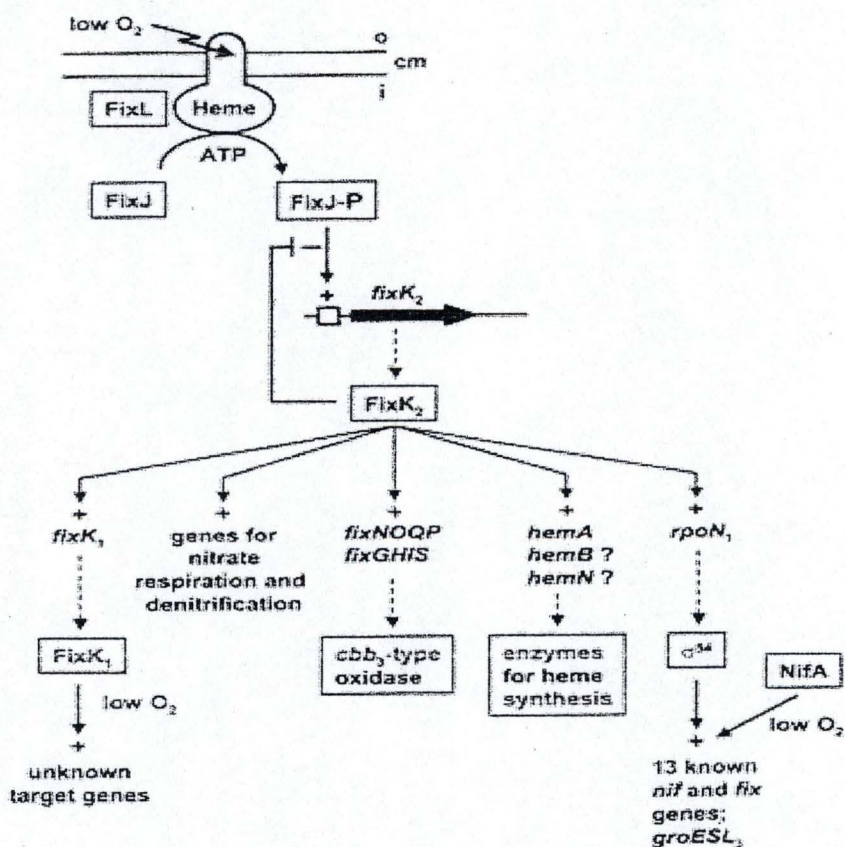


fig.8. Cascade de régulation dépendante de FixLJ-FixK₂ chez *B. japonicum*. (d'après Anthanametten, Rossi *et al.* 1998)

La protéine FixK₂ se fixe à une séquence consensus présente en amont de ses gènes cibles et active leur transcription. Les produits de ces gènes interviennent dans plusieurs processus. Le gène *rpoN*₁ encode le facteur σ^{54} qui active, avec la protéine NifA, la transcription des gènes *nif* et *fix* encodant les enzymes nécessaires à la fixation de l'azote (dinitrogénase, dinitrogénase réductase,...). Les opérons *fixNOQP* et *fixGHIS* encodent respectivement une cytochrome oxydase terminale de haute affinité et un hypothétique complexe rédox couplé à une pompe à cations. Ces deux complexes sont requis pour la respiration dans l'environnement microaérobie que constitue le nodule racinaire de la plante infectée. Les gènes *hem* encodent des enzymes impliqués dans la synthèse de groupements hème. La limitation en O₂ augmentant la synthèse de cytochrome, le besoin de groupement hème augmente (Page and Guerinot 1995); (Fischer, Velasco *et al.* 2001). Enfin, le gène *fixK*₁ encode le régulateur FixK₁ qui, au contraire de FixK₂, possède probablement un cluster Fer-Soufre senseur de l'O₂, et dont les gènes cibles ne sont pas encore identifiés.

La protéine FixK₂ active également la transcription des gènes nécessaires à la respiration de nitrate. En effet, *B. japonicum* est capable d'effectuer un processus appelé dénitrification (réductions successives de nitrate en nitrite, oxyde nitrique, oxyde nitreux, et azote moléculaire ; voir point suivant). Enfin, FixK₂ réprime sa propre transcription permettant ainsi une régulation fine du processus de fixation de l'azote.

La cascade de transduction du signal FixLJ-FixK₂, propre aux bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium*, a été caractérisée chez d'autres espèces : *R. meliloti*, *A. caulinodans* (Fischer 1994) (Fischer 1996) et *R. etli* (Lopez, Morera *et al.* 2001). Plusieurs différences existent dans le fonctionnement de cette cascade de régulation chez ces espèces, mais les acteurs qui la constituent sont les mêmes.

2.3.4.2 La famille Crp/Fnr et la dénitrification (d'après (Zumft 1997))

La dénitrification constitue une autre branche du cycle de l'azote réalisée par les procaryotes (fig.7). L'azote est introduit dans la biosphère par les bactéries fixatrices d'azote telles que *Rhizobium*, et libéré dans l'atmosphère par le processus de dénitrification. D'un point de vue chimique, la dénitrification est la réduction successive du

nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-), oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux (N_2O) et azote moléculaire (N_2) (fig.9). D'un point de vue bioénergétique, la dénitrification constitue une forme de respiration alternative en l'absence d'oxygène moléculaire (O_2). En d'autres termes, le nitrate et ses dérivés peuvent servir d'accepteurs terminaux dans les chaînes de transport d'électrons associées à la création d'une force proton-motrice qui génère l'énergie nécessaire à la bactérie (sous forme d'ATP).

La dénitrification est réalisée par une grande diversité de bactéries appartenant à la classe des protéobactéries : *Pseudomonas sp.*, *Rhodobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium sp.*, etc. D'autres procaryotes, comme les Archae, sont également capables de produire du N_2 à partir de NO_3^- .

La production de N_2 à partir du NO_3^- est divisée en quatre réactions successives catalysées par différentes réductases, comme le montre la figure 9.

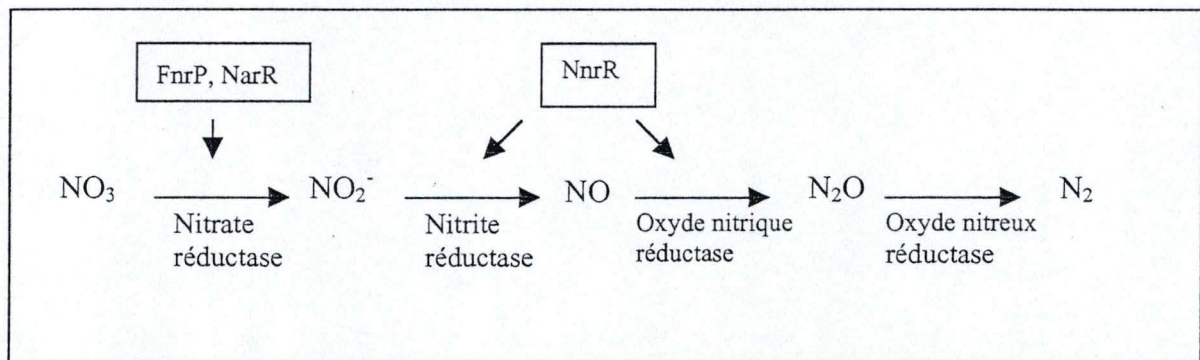


Fig.9. Schéma de la dénitrification, et de sa régulation. NO_3^- , nitrate ; NO_2^- , nitrite ; NO, oxyde nitrique ; N_2O , oxyde nitreux ; N_2 , azote moléculaire. FnrP et NarR activent l'expression de la nitrate réductase, et NnrR active celle de la nitrite réductase et de l'oxyde nitrique réductase.

L'expression de chaque réductase est régulée par la concentration en oxygène, et par la présence de son substrat. Ces réactions peuvent être considérées comme quatre processus respiratoires indépendants les uns des autres. Il faut toutefois noter que l'expression de la nitrite réductase et celle de l'oxyde nitrique réductase sont contrôlées ensemble, de façon à éviter l'accumulation de NO, composé très réactif et nocif pour la bactérie (Tosques, Shi *et al.* 1996) (Zumft 1997).

Les régulateurs de la famille Crp/Fnr (classe I) interviennent aussi dans le contrôle du processus de dénitrification. Ainsi, chez *Paracoccus denitrificans* (protéobactérie du groupe Rhodobacter), trois régulateurs Crp/Fnr interviennent à diverses étapes du

processus (fig.9). FnrP est une protéine de la classe IB (i.e. possédant quatre cystéines pouvant intervenir dans la formation d'un centre Fer-Soufre, senseur de l'O₂). Ce régulateur active l'expression de l'opéron *narGHIIJ* encodant la nitrate réductase, en réponse à une faible tension en O₂ (Van Spanning, De Boer *et al.* 1997). Le régulateur NarR est requis également pour une expression maximale de la nitrate réductase, mais ne présentant pas les cystéines impliquées dans la formation du cluster Fer-Soufre, cette protéine doit répondre directement à un autre signal que l'O₂. Enfin, la protéine NnrR active la transcription de la nitrite réductase et de l'oxyde nitrique réductase simultanément. NnrR ne possèdent pas non plus de cystéines conservées dans son domaine N-terminal.

La régulation du processus de dénitrification est relativement bien décrite chez certaines espèces bactériennes comme *Pseudomonas sp* (Zumft 1997), mais chez d'autres, comme *Rhodobacter sphaeroides*, les mécanismes précis de régulation sont encore à découvrir.

2.3.5 Rôles de régulateurs Crp/Fnr dans la virulence

Plusieurs régulateurs de la famille Crp/Fnr sont impliqués, à des degrés divers, dans le contrôle de l'expression de gènes de virulence de bactéries pathogènes. Chez certaines d'entre elles, ces régulateurs jouent un rôle central dans la régulation de la virulence.

Ainsi, la protéine PrfA de *Listeria monocytogenes* (pathogène intracellulaire causant la listériose) partage des similarités de séquence avec des membres de la famille Crp/Fnr, et des études de mutagenèses dirigées permettent de la classer dans cette même famille (Sheehan, Klarsfeld *et al.* 1996); (Ripio, Dominguez-Bernal *et al.* 1997). Cette protéine, régulateur central de la pathogénie de *L. monocytogenes*, active la transcription des sept gènes de virulence requis pour son cycle infectieux. Les produits de ses gènes interviennent dans l'invasion des cellules hôtes, la lyse du phagosome et la réplication bactérienne dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. PrfA active également sa propre expression, et ce en réponse à un ou plusieurs signaux protéiques de l'hôte (Renzoni, Klarsfeld *et al.* 1997).

Bordetella pertussis (agent causal de la coqueluche) possède un régulateur homologue de Fnr, dénommé Btr (Bannan, Moran *et al.* 1993). La coqueluche est une maladie du

tractus respiratoire supérieur et se caractérise, entre autres, par une accumulation de mucus et de débris cellulaires dans les conduits respiratoires. En conséquence, l'environnement immédiat de la bactérie est très probablement pauvre en O₂. Selon Wood *et al.* (1998), la protéine Btr pourrait activer la transcription de gènes dont les produits sont nécessaires à la croissance dans un environnement pauvre en O₂. Par ailleurs, il a été démontré que Btr est essentiel à la croissance et à la persistance de *B. pertussis* dans le tractus respiratoire en modèle murin (Wood, Khelef *et al.* 1998).

D'autres exemples existent encore dans lesquels des régulateurs Crp/Fnr interviennent, directement ou indirectement dans la régulation des mécanismes de virulence de bactéries pathogènes comme, par exemple, *Neisseria gonorrhoeae* (Householder, Belli 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Pessi and Haas 2000), *Salmonella typhi* (Contreras, Toro *et al.* 1997), ou encore *Yersinia enterocolitica* (Schmiel, Young *et al.* 2000).

comment est réalisé ce screen?
ou est-ce par bioinformatique?

(2)

3 But du mémoire

Un programme de disruption systématique des gènes codant pour les régulateurs transcriptionnels de *Brucella melitensis* 16M a été mis en place au laboratoire, dans le but de détecter ceux qui sont impliqués dans la virulence de cette bactérie (V. Haine, thèse en cours). Dans un premier temps, les gènes codant potentiellement pour des régulateurs transcriptionnels chez *B. melitensis* 16M ont été identifiés par homologie de séquence. Les familles de régulateurs qui possèdent des homologues impliqués dans la régulation de gènes de virulence chez d'autres espèces font l'objet d'une étude plus approfondie : des mutants intégratifs sont construits pour chacun des gènes d'intérêt et le phénotype résultant est étudié afin de mettre en évidence l'éventuelle implication de ces gènes dans la régulation de la pathogénie.

Ce travail a pour but d'étudier l'implication des régulateurs de la famille Crp/Fnr, au nombre de six chez *B. melitensis* 16M, dans le contrôle des mécanismes de virulence de cette bactérie. L'approche utilisée est double. D'une part une analyse des séquences protéiques et nucléotidiques des régulateurs est réalisée : recherche d'homologie, alignements de séquences, ... D'autre part, des mutants intégratifs sont construits pour les six régulateurs et caractérisés par divers tests *in vivo* et *in vitro*.

@ générale } au vue de la difficulté de tirer
des conclusions ^{sur la vir} à partir de mutation de gènes,
disruption
sur l'implication de gènes particuliers
dans la virulence
y a-t-il une leçon à tirer sur l'approche
enseignant
optimale pour aborder ce type de problématique?
la @ efficace
"essential genes for virulence?"
disruption systématique : simple?
26

comment est réalisé ce screen?
ou est-ce pour biojournalistique?

3 But du mémoire

Un programme de disruption systématique des gènes codant pour les régulateurs transcriptionnels de *Brucella melitensis* 16M a été mis en place au laboratoire, dans le but de détecter ceux qui sont impliqués dans la virulence de cette bactérie (V. Haine, thèse en cours). Dans un premier temps, les gènes codant potentiellement pour des régulateurs transcriptionnels chez *B. melitensis* 16M ont été identifiés par homologie de séquence. Les familles de régulateurs qui possèdent des homologues impliqués dans la régulation de gènes de virulence chez d'autres espèces font l'objet d'une étude plus approfondie : des mutants intégratifs sont construits pour chacun des gènes d'intérêt et le phénotype résultant est étudié afin de mettre en évidence l'éventuelle implication de ces gènes dans la régulation de la pathogénie.

Ce travail a pour but d'étudier l'implication des régulateurs de la famille Crp/Fnr, au nombre de six chez *B. melitensis* 16M, dans le contrôle des mécanismes de virulence de cette bactérie. L'approche utilisée est double. D'une part une analyse des séquences protéiques et nucléotidiques des régulateurs est réalisée : recherche d'homologie, alignements de séquences, ... D'autre part, des mutants intégratifs sont construits pour les six régulateurs et caractérisés par divers tests *in vivo* et *in vitro*.

@ générale au vue de la difficulté de tirer des conclusions à partir de mutations de gènes, disruption
sur l'implication de gènes particuliers dans la virulence
y a-t-il une leçon à tirer sur l'approche enseignée optimale pour aborder ce type de problématique?
la @ efficace
"essential genes for virulence?"
disruption systématique : simple?

4 Résultats

4.1 Identification des gènes de la famille crp/fnr chez *Brucella melitensis* 16M

Les régulateurs transcriptionnels sont divisés en plusieurs familles sur base de la séquence de leur domaine de liaison à l'ADN (domaine HTH). Les séquences consensus de ces domaines peuvent être utilisées pour détecter, par homologie, les membres des différentes familles de régulateurs dans un génome donné. Chez *E. coli*, cette approche a permis l'identification de 314 régulateurs regroupés en 14 familles (Perez-Rueda and Collado-Vides 2000).

La recherche de séquences homologues aux consensus HTH³ des familles de régulateurs dans le génome de *Brucella melitensis* 16M a permis l'identification de 190 régulateurs regroupés en 19 familles (V.Haine, thèse en cours). Notre intérêt se porte ici sur la famille Crp/Fnr⁴ qui comporte six membres putatifs chez *Brucella*, dénommés Crp1 à Crp6.

4.2 Analyse génomique des régulateurs Crp de *B. melitensis* 16M

4.2.1 Recherche d'homologie, alignements de séquences

Lors de ce travail, nous avons recherché des régulateurs homologues pour chaque membre de la famille Crp/Fnr de *B. melitensis* 16 M (blastx)⁵ (Altschul, Gish *et al.* 1990). Des alignements multiples⁶ ont ensuite été réalisés entre les séquences protéiques de ces homologues et des régulateurs Crp de *Brucella*, et des domaines conservés ont été recherchés. Avant d'énoncer les résultats obtenus, il convient de faire un bref rappel des éléments structuraux propres aux régulateurs Crp/Fnr.

Les protéines de la famille Crp/Fnr possèdent des caractéristiques structurales communes qui permettent de les regrouper en une seule et même famille : domaine HTH

³ Les séquences consensus de chaque famille de régulateurs transcriptionnels proviennent du programme «CDD Conserved Domain Database» regroupant les programmes pfam et smart (Wheeler, Church *et al.* 2001) (Bateman, Birney *et al.* 2000) (Schultz, Copley *et al.* 2000). Site web : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>

⁴ séquence consensus du domaine HTH de la famille Crp/Fnr : smart 00419.

⁵ site web : <http://serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/> (C. Lambert).

⁶ Les alignements multiples ont été réalisés sur CLUSTALW ; site web : <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>

de fixation à l'ADN dans la partie C-terminale, hélice de dimérisation dans la partie centrale, et domaine senseur dans la partie N-terminale (fig.10). Ce dernier domaine comporte cinq résidus glycine relativement conservés permettant la séparation des brins β qui le constituent (voir intro.point 1.3.1.).

La famille Crp/Fnr peut être subdivisée en différentes classes. Cette séparation se fait principalement sur base des motifs de liaison à l'ADN propres à chaque classe. Cependant, la présence de résidus particuliers dans le domaine senseur permet également cette subdivision. Il s'agit des résidus impliqués dans la formation du centre 4Fe-4S des protéines de classes IA et IB, ou encore des résidus impliqués dans la liaison des protéines de classe II à l'AMP cyclique (Anjum, Green *et al.* 2000).

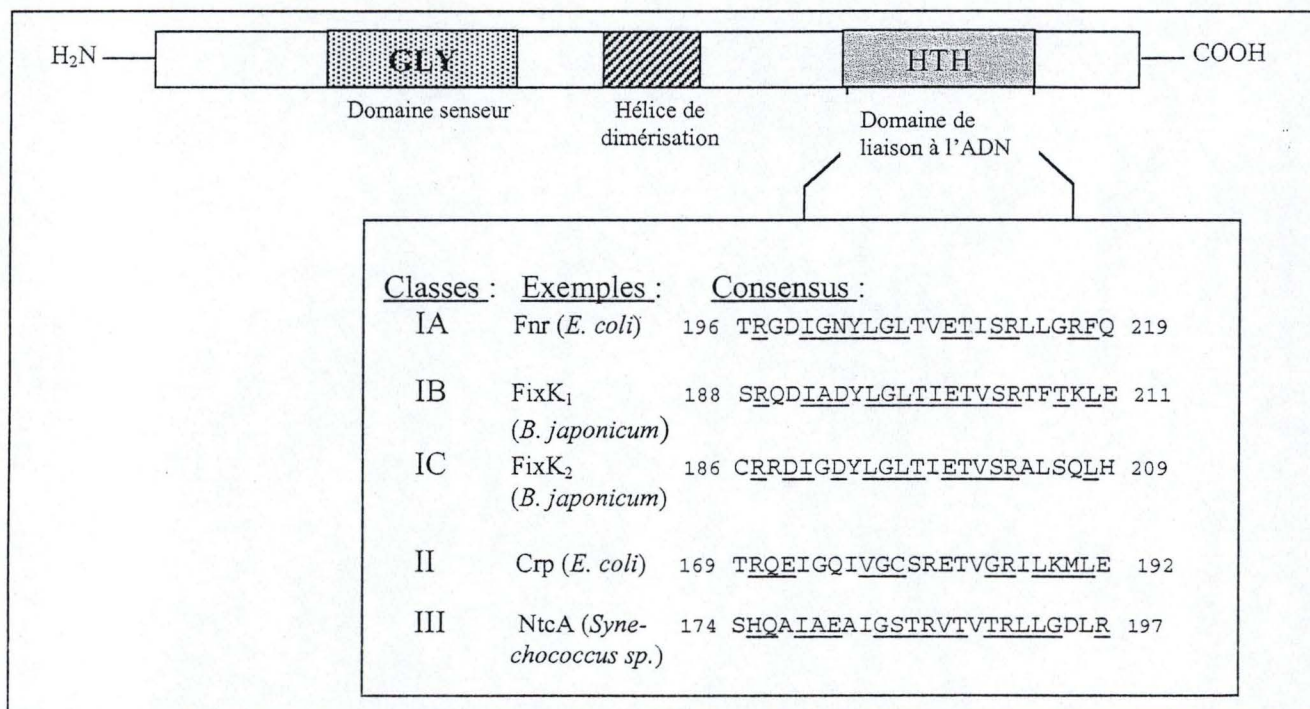


Fig.10.: Structure générale des régulateurs de la famille Crp/Fnr. GLY : région contenant 5 résidus glycine relativement conservés dans le domaine N-terminal de la protéine. HTH : domaine consensus de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice. Encadré : séparation des membres de la famille Crp/Fnr en différentes classes sur base des motifs HTH supposés. Les résidus conservés au sein de chaque classe sont soulignés. (d'après Fischer, 1994)

4.2.1.1 Crp1 (bmeil294)⁸

Crp1 possède plusieurs homologues : FixK₁ de *B. japonicum* (E⁹= 2e-34), AadR de *R. palustris* (E= 3e-34), FnrL de *R. capsulatus* et *R. sphaeroides* (E=4e-26 et 1e-25). Tous ces régulateurs ont en commun leur implication dans la régulation de processus microaérobie ou anaérobie (Anthamatten, Scherb *et al.* 1992) (Egland and Harwood 1999); (Zeilstra-Ryalls and Kaplan 1995); (Zeilstra-Ryalls, Gabbert *et al.* 1997).

Un alignement multiple de ces protéines homologues à Crp1 a fourni quelques indices concernant la protéine de *B. melitensis* (fig.11). Crp1 possède les cinq résidus glycine conservés du domaine senseur et le consensus HTH du domaine C-terminal, caractéristiques des protéines Crp/Fnr. La localisation de l'hélice de dimérisation n'est que présumée¹⁰.

En outre, Crp1 possède quatre résidus cystéine conservés, trois dans le domaine N-terminal et un dans la partie centrale. La présence de ces cystéines, homologues à celles de la protéine Fnr de *E. coli*, suggère que notre protéine d'intérêt pourrait également jouer le rôle de senseur de l'O₂ chez *Brucella*, via la formation d'un centre 4Fe-4S.

Le motif HTH de Crp1 permet le classement de cette protéine dans la classe IB de la famille Crp/Fnr (Fischer 1994). Les résidus glutamate (E), sérine (S) et arginine (R), impliqués dans la reconnaissance de l'ADN cible par Fnr de *E. coli* (5'-TTGATnnnnATCAA-3') (Anjum, Green *et al.* 2000) et FixK₂ de *B. japonicum* (5'-TTGAnCnnGATCAAnG-3') (Fischer 1994) sont conservés dans la protéine Crp1. De plus les domaine HTH de ces différentes protéines sont très similaires, ce qui suggère que l'hélice de reconnaissance de Crp1 pourrait se fixer sur un motif semblable de l'ADN (voir position marquée par «HTH» dans la figure 11).

⁸ Bmeixxxx et bmeiixxxx sont les numéros d'accès à la banque de *B. melitensis* pour le grand et le petit chromosomes respectivement.

⁹ E=expected value, nombre de séquence(s) qu'on aurait pu obtenir par hasard lors d'une recherche d'homologie par blast (Altschul, Gish *et al.* 1990). Plus cette probabilité est petite, plus la similarité est grande. Les E values sont obtenues en comparant la séquence de la protéine d'intérêt (ici Crp1) avec la banque peptidique nr, qui regroupe les banques Genpept, TrEMBL et DDBJ.

¹⁰ La localisation de l'hélice de dimérisation putative a été réalisée sur base d'un alignement multiple des protéines Crp1 de *B. melitensi*, Fnr et Crp de *E. coli* (donnée non montrée). En effet, pour ces deux dernières protéines, le domaine de dimérisation a été identifié (Anjum, Green *et al.* 2000) (Moore and Kiley 2001).

fixK1Bjap	-----MKPSVVMIEPNGHFCS-DCAIRTSAVCSGLDAAELREFEHLGRRVHFSSGETV	52
aadRRpal	-----MPHLAYPTTTCGFRCEHCAVRGLAICGELGPADHEEFERLAQHVRVYGPKEAL	54
crp1Bmeli	MVVVFPALDQNKLAARTPCNVCE-DCCVRSMAVCSALDDGDLAALAEAIMTSKKLDTNEML	60
fnrLRcap	-----MSHDDAHPVSLQCCG-DCPIRHRAVCARCESSELDELEGAKYYRSFPAQQTV	49
fnrLRsph	-----MTLHEVPTILHRCG-DCPIRHRAVCARCDSEELATLEQIKYYRSYQAGQTV	49
fixK1Bjap	FSEEDITTSFYNVLEGVMRLYKLLPDGRRQIVGFALPCDFLGMNLSGRHNFSAIDAIGAVT	112
aadRRpal	FSEDEVADSVYSLIEGIARLYKLLPDGRRQIIIGFALPCDFLGMAPGNRYSFSAADSIGGVT	114
crp1Bmeli	VEEGEPKLRVYSLTSGMLRIYTSLPDGRRIAGFLFPCDFLGLADDEVYSLSAEAVVPSA	120
fnrLRcap	IWSGDKMDFVASVVSGIATLTQTLEDGRTQMVGLLLPSDFVGRPGRDRAAYNVTATTDIL	109
fnrLRsph	IWSGDKMDFVASVVTGIATLTQTMEDGRRQMVGLLLPSDFVGRPGRQTVAYDVTATTDLL	109
fixK1Bjap	VCFQFAKAPFGRFIEERPQLLRRINELARELSQARDHMVLLGRRSADEKVA AFLGWRE	172
aadRRpal	VCKKFRGPFPLRFIENRPQMLLRMDFATRELSLAQDQMLLLGRRSAEEKVA FLVWRDR	174
crp1Bmeli	LCAFSAKEIERLMERFPKLERLYQMTRLALRTARDNQLVGLRLAPVEKLSFLLVLSAR	180
fnrLRcap	MCCFRKRPFEEMMERTPHIAQRLLQMTLDELDAAREWMLLLGRKTAREKIASLLSIVARR	169
fnrLRsph	MCCFRKRPFEEMMQKTPHVGQRLLQMTLDELDAAREWMLLLGRKTAREKIASLLAIARR	169
	H	
fixK1Bjap	LLALKGASD---TVPLPMSRQDIADYLGTLLETIVSRFTFKLERHGAI AIHGG-ISLLD	227
aadRRpal	LARLEGVTK---TVSLPMGRQDIADYLGTLLETIVSRFTFKLEREKLVIVPDG-VRVLD	229
crp1Bmeli	AEKRGEKPN---PVHLLMNRDIDYLGTLLETIVSRFTFKLKTQGLIQLRDANTVEILS	236
fnrLRcap	DASIRHRKMRGRLSFDLPLTREAMADYLGTLLETIVSRQMSALKRKGVI ELEGKRHVTVPD	229
fnrLRsph	DAALKLRESNGPMTFDLPLTREEMADYLGTLLETIVSRQVSALKRKGVI ALEGKRHVIVTD	229
	HTH	
fixK1Bjap	PARVEALAAA-----	237
aadRRpal	PKRFDALAAA-----	239
crp1Bmeli	RRSLAVVAGLDPDNL---	251
fnrLRcap	MDRLLEAGDDSDGGLIA	247
fnrLRsph	FARLLEEAGDDSDGGLPV	247

fig.11. Alignement multiple des protéines Crp1 de *B. melitensis*, FixK₁ de *B. japonicum*, AadR de *R. palustris*, FnrL de *R. capsulatus* et *R. sphaeroides*. Les résidus conservés sont indiqués en gras. Les cinq résidus glycine qui séparent les brins β du domaine N-terminal sont soulignés. Les quatre résidus cystéine conservés du domaine senseur sont encadrés. L'hélice de dimérisation (H) supposée est soulignée. Le domaine de liaison à l'ADN (HTH) est souligné, les résidus permettant le regroupement dans la sous-classe IB sont surlignés en gris, et enfin, les résidus supposés importants dans la reconnaissance de l'ADN sont encadrés.

4.2.1.2 Crp2 et Crp3 (bmei1752 et bmeii0854)⁸

Les protéines Crp2 et Crp3 de *B. melitensis* 16M sont homologues entre elles (48% d'identité pour 99 résidus sur 205). Les premiers homologues de ces deux protéines ne sont pas encore caractérisés ; il s'agit de régulateurs transcriptionnels putatifs de *S. meliloti* (E= 2e-41 et E= 2e-42), *M. loti* (E= 7e-25 et E= 2e-20), etc.

L'alignement multiple réalisé entre les protéines Crp2 et Crp3, et leur premier homologue montre que ces protéines appartiennent à la famille Crp/Fnr : le consensus HTH est présent ; Crp3 possède les cinq glycines conservées du domaine senseur et Crp2 en possède quatre (fig.12). Cependant, le motif HTH de ces deux protéines ne permet pas de les regrouper dans une des classes de la famille Crp/Fnr. Cette dernière constatation,

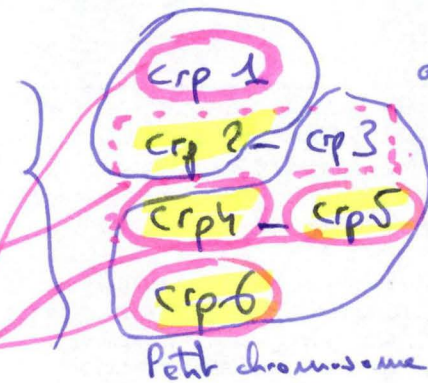
G⁺ chromosome

virulence
So vir?

réduite ~~met~~

pas implic. de
mét. NO₂

NO₂ met:



any identity or Δ -functionality possible?

48% identity -

61% identity

same count as crp 1.

Petit chromosome.

- suggere mutants doubles
fautes? comment?

- réflexion au niveau de la redundance
des voies métaboliques: quiz pour la
famille crp...?

Resultat

- Δ crp - bon pour effet de Δ sur virulence en jours...
- pas d'effet de Δ sur croissance en milieu minimum
-

Double mutants à envisager

crp 1 + crp 6 $\hat{=}$ phénotype Δ NO₂ métabolisme
 \neq ? virulence --

crp 2 + crp 3
génétyques très homologues?
+ pas implication de métabolisme NO₂

crp 4 + crp 5
+ implication de métabolisme NO₂

Triple crp 4 + crp 5 + crp 6
NO₂ métabolisme
+ virulence.

ainsi que l'absence d'homologues caractérisés ne permet pas de proposer l'une ou l'autre fonction pour les protéines Crp2 et Crp3.

crp2Bmeli	-----MEAAPILAKLEAREIDALATLDIENNFAADAIIEQGARVRSIHLV	47
crp3Bmeli	MGISSEDNVLHNIFFENQPINSAFNDDDLGTLKSLPVSLKHYPPHTIVSRQGDWTNSILII	60
RTSmeli	--MTVASEAFARVLETSILRLALDDSDKSHFGSLGFILRRYPHAVITROGEEEDRIFVV	58
crp2Bmeli	RS <u>GW</u> GC CI YRDLSS Q <u>QR</u> Q II D F PMRCD FV GLRTSNGYSYNTIA AI TPMS IF E IP LN SL ENA	107
crp3Bmeli	NS <u>GW</u> SC CI YRDL PE <u>G</u> DR Q IL D F PMK G D FL GF R AGLGFN YY TL FA ITDLS VVE ISLD IL AEK	120
RTSmeli	H <u>S</u> G <u>W</u> GC IC TNLV NG ER Q IL D FL K GE V VAS R A F E G E G LE S F T A Q TE L M L F E A P A K A I SS G	118
crp2Bmeli	IKHAPRLS F ILIE LL SR Q RS F LI E HL T N V GCR N A F V R TA H LL L ELSD R V K SC G M G EP D S F	167
crp3Bmeli	MRKSP P LA V T F MEL T AR Q RT IL LE HL IN L GR R TS L ARI A HL M LE L GF R TKANG T GD A H G F	180
RTSmeli	LAH S TS L A A GL L G A V A RE K A I LS Q HL T N L G R RS A L V RT A H F LE L EL G TR L E K A D A A K T H E F	178
	H	
crp2Bmeli	YC P LT Q Y Q L A D A L G L T PI H LN R ML R EL R E E GL V LF R SN R VE I LN R E Q LA A LA E Y D G E F M R	227
crp3Bmeli	YC P LT Q G E L A D A L G L T PI H LN R ML R EL R ED N LL V F K N N EV R FL N RP A LM Q V C S F D E N Y LS	240
RTSmeli	E <u>C</u> P LT Q Y D LA A AL G V T A I H V NR M L R EL R Q R GY L D F R Q G S V H LL N KK G LE H F A D F D P G Y LR	238
	HTH	
crp2Bmeli	MA V F A R H E-----	235
crp3Bmeli	AN I F T NI H L I PR	253
RTSmeli	LP G E T -----	242

Fig.12. Alignement multiple des protéines Crp2 et Crp3 de *B. melitensis*, et d'une protéine de la famille Crp/Fnr chez *S. meliloti*. Les résidus conservés sont indiqués en gras. Les cinq résidus glycine qui séparent les brins β du domaine N-terminal sont soulignés. L'hélice de dimérisation (H) supposée et le domaine de liaison à l'ADN (HTH) sont soulignés.

4.2.1.3 Crp4 et Crp5 (bmeii0966 et bmeii0986)⁸

Les protéines Crp4 et Crp5 sont également homologues entre elles (61% d'identité pour 142 résidus sur 233), et possèdent plusieurs homologues non caractérisés : une protéine de *Alcaligenes faecalis* ($E=6e-44$ et $E=2e-96$), une protéine de *A. tumefaciens* ($E=3e-42$ et $E=3e-94$), etc. Crp4 et Crp5 sont également proches des protéines NnrR de plusieurs souches de *R. sphaeroides* ($E=3e-42 \rightarrow 9e-27$ et $E=2e-51 \rightarrow 8e-48$). Ces protéines interviennent dans la régulation de l'expression des nitrite et oxyde nitrique réductases lors de la dénitrification (Sabaty, Schwintner *et al.* 1999); (Tosques, Shi *et al.* 1996).

Un alignement multiple a été réalisé entre les protéines Crp4 et Crp5, et les protéines NnrR de deux souches de *R. sphaeroides* (fig.13.). Ces protéines possèdent les cinq résidus glycine du domaine senseur, et le consensus HTH qui leur permettent d'être regroupées dans la famille Crp/Fnr. Sur base de l'analyse plus précise du domaine HTH, elles sont groupées dans la classe I, mais l'appartenance à l'une ou l'autre sous-classe ne peut pas être proposée.

Nnr_1Rsph	-----MNK L DE S LL T K L PP F S R LD R P Q IR T IL D Q A V P RR Y DE G T T V F G E G M E A E R F	51
NnrRRsph	ML P Q I R N G S V N K L DE T LL T RL P PP F S L LD R P Q IR T IL D Q A T S RR Y DE G S T V F G E G M A D R F	60

crp4Bmeli	-----MAAIIIDWALVRSLPVFSGMDDAAFEQLMGLAMQRAVPKGSVAFKQGEARLF	52
crp5Bmeli	-----MAMIDRGLVVRKLSLFAKMRDDELDRVSVYATSRVPPQGESIFEQGEASCF	51
Nnr_lRsph	YLLLDG ³⁰ TIRVVRTTPT ³⁵ GEQ ³⁸ I ⁴⁰ I ⁴² ALHIG ⁴⁵ PG ⁴⁸ QL ⁵⁰ FG ⁵² IAPALARDTYPATAVA ⁵⁵ AAADC ⁵⁸ VTLSW ⁶⁰ PVR	111
NnrRRsph	YLLLDG ³⁰ TIRVVRTTPT ³⁵ GEQ ³⁸ I ⁴⁰ I ⁴² ALHIG ⁴⁵ PG ⁴⁸ QL ⁵⁰ FG ⁵² IAPALARDTYPATAVA ⁵⁵ AAAE ⁵⁸ CVTL ⁶⁰ SWPVR	120
crp4Bmeli	YLLVQ ³⁰ GRLKVMQV ³⁵ TAD ³⁸ QQL ⁴⁰ LIVRVVNP ⁴⁵ GEFF ⁴⁸ FG ⁵⁰ FAMALGRE ⁵² DYPGTPLAVVDC ⁵⁵ SVIAW ⁵⁸ PME	112
crp5Bmeli	YLLLHG ³⁰ R ³² LKVNQV ³⁵ TPD ³⁸ GQQL ⁴⁰ IIVRMVHP ⁴⁵ GD ⁴⁸ LF ⁵⁰ GFARALQ ⁵² RNDY ⁵⁵ PGTATAV ⁵⁸ MESIVLAW ⁶⁰ PTE	111
Nnr_lRsph	LWPTFTANYPGFATESYRTL ¹⁰ GARLGEMQSRITELATQ ¹⁵ VEQ ¹⁸ RVAACLLRLVNQ ²⁰ SGR ²² KVET	171
NnrRRsph	LWGD ¹⁰ FVASYPGFATESNRTL ¹⁵ GARLGEMQNRITELATQ ²⁰ VEQ ²³ RVAACLLRMVNQ ²⁵ SGR ²⁷ KVAT	180
crp4Bmeli	MMTAFMASNPALAVNTMQMI ¹⁰ GRRLDAAHSRIREISTQ ¹⁵ VEQ ¹⁸ RVAVLRLVREAGIQ ²⁰ EDT	172
crp5Bmeli	LWDYFVEQNPLAMNAIQTI ¹⁰ GKRL ¹² EEAHT ¹⁴ RIEMSTEEVERRVA ¹⁶ HAVLRLSRQAGKKEET	171
H		
Nnr_lRsph	GIEISFPITRQ ¹⁰ NISEM ¹² TG ¹⁴ TLLHT ¹⁶ VSRLLSAWERAGIVESARRRIVVTAPHRLVVL ²⁰ SGASG	231
NnrRRsph	GIEISFPITRQ ¹⁰ NISEM ¹² TG ¹⁴ TLLHT ¹⁶ VSRLLSAWEREGIVESTRRRIVVTAPHRLVVL ²⁰ SGPAG	240
crp4Bmeli	GLRIDFPVSRQ ¹⁰ DAELT ¹² GTLLHT ¹⁴ VSRI ¹⁶ VSQWQSKGWVEGGRQSL ²⁰ LVDRRLRQIAEGEI	232
crp5Bmeli	GIRIDFPISRQ ¹⁰ DAEMT ¹² GTLLHT ¹⁴ VSRI ¹⁶ LSNWE ¹⁸ TKGLVQGG ²⁰ RQLLVLD ²² SAGLRR ²⁴ LAEGED	231
HTH		
Nnr_lRsph	QA	233
NnrRRsph	QV	242
crp4Bmeli	--	232
crp5Bmeli	--	231

Fig.13. Alignement multiple des protéines Crp4 et Crp5 de *B. melitensis*, NnrR de *R. sphaeroides* f. sp. *Denitrificans* (Nnr-lRsph) et *R. sphaeroides* 2.4.3. (NnrRsph). Les résidus conservés sont indiqués en gras. Les cinq résidus glycine qui séparent les brins β du domaine N-terminal sont soulignés. L'hélice de dimérisation (H) supposée et le domaine de liaison à l'ADN (HTH) sont soulignés.

4.2.1.4 Crp 6 (*bmeii0947*)⁸

La protéine Crp6 possède plusieurs homologues bien caractérisés : la protéine NarR de *P. pantotrophus* ($E=9e-39$) et la protéine HbaR de *R. palustris* ($E=7e-19$). NarR intervient dans le contrôle de l'expression de la nitrate réductase lors de la dénitrification (Wood, Alizadeh *et al.* 2001); et HbaR régule la voie de dégradation anaérobie de composés aromatiques (England and Harwood 2000).

La conservation de certains résidus du domaine HTH de Crp6, NarR et HbaR suggère leur appartenance à la classe I de la famille Crp/Fnr (fig.14). Cependant, comme dans le cas de Crp4 et Crp5, ces protéines ne peuvent être regroupées dans l'une ou l'autre sous-classe. Notons que Crp6, tout comme ses homologues, ne possèdent pas toutes les glycines du domaine senseur, dont la conformation pourrait, dès lors, être différente.

crp6Bmeli	---MRRDDKIALKNQPLFADMADATFERIMRPSFVQSFPPRTMLLTENEPADFLFAVLD	56
NarRPpant	---MREEDRNDIRNLPFRNMTSPCFDALIHAAYDQVPPAQLELIRQGEVANFLHVLE	56
hbaRRpal	MASKLTGGDLQIIIRIAVFRGLKAETVAHMIAPATAISVRARESIARQDEPATAFFIVVG	60
crp6Bmeli	<u>G</u> LVLM ³⁰ SAS-SQD ³² DTALEILRP ³⁵ DV ³⁸ FILAAVLNNDVCLQ ⁴⁰ SAQTLTATRVL ⁴⁵ MPAELVREQ	115
NarRPpant	<u>G</u> AVELYAN-WQDRDTMAVVQPVAT ³⁵ FILAA ³⁸ CMRDAPY ⁴⁰ LMSARTLQ ⁴⁵ RSRI ⁴⁸ VLIPAVDVRAA	115
hbaRRpal	<u>G</u> VWKLFRSNLA ³⁰ QDEAVIEI ³⁵ MSR ³⁸ GSFAEAAAL ⁴⁰ TGHRYLANAEAVTDARVARI ⁴⁵ PADHLVRC	120
crp6Bmeli	MSEDPAFMHAVVFELARAYRRLVKELKAQKLRSCAQR ¹⁰ LANWIVKESLANDGADVVSIPYE	175
NarRPpant	FSRDHGFALATVQELSEGYNLVRHAKNKLARNARERLGAYLWQRSQEAGGV ¹⁵ LVGFVLPQE	175
hbaRRpal	IRANPDISVPMIASICQHHHLVQRVEQLKAQSGVQLAEFLASLAITEQ ¹⁵ GSCALVLPYD	180

crp6Bmeli	KRILAA YLG MT PENLSRSFANLASHGVHVQASAIRITDKAGLLQFAAPSSLLIDQEEPTRP 235
NarRppant	KRL LASYLG MT PESLSRA FK ALREHG VH IDGMRVTITDPVALKALVQPNTLLDTALNIP- 234
hbaRRpal	KAL IAGELGL TP ESLSRA FK LR SI GVTV DA SQVAVR DV ARLRK LA T DGR SAVRGKLQAV 240
	HTH
crp6Bmeli	A 236
NarRppant	- 234
hbaRRpal	R 241

Fig.14. Alignement multiple des protéines Crp6 de *B. melitensis*, NarR de *P. pantotrophus*, et HbaR de *R. palustris*. Les résidus conservés sont indiqués en gras. Les résidus glycine conservés qui séparent les brins β du domaine N-terminal sont soulignés. L'hélice de dimérisation (H) supposée et le domaine de liaison à l'ADN (HTH) sont soulignés. Les résidus permettant le regroupement dans la classe I sont surlignés en gris.

4.2.2 Localisation chromosomique et voisinage des gènes *crp*

Les gènes *crp* de *B. melitensis* 16M se répartissent sur les deux chromosomes de cette bactérie : *crp1* et *crp2* se trouvent sur le grand chromosome ; *crp3*, *crp4*, *crp5* et *crp6* se trouvent sur le petit chromosome (fig.15).

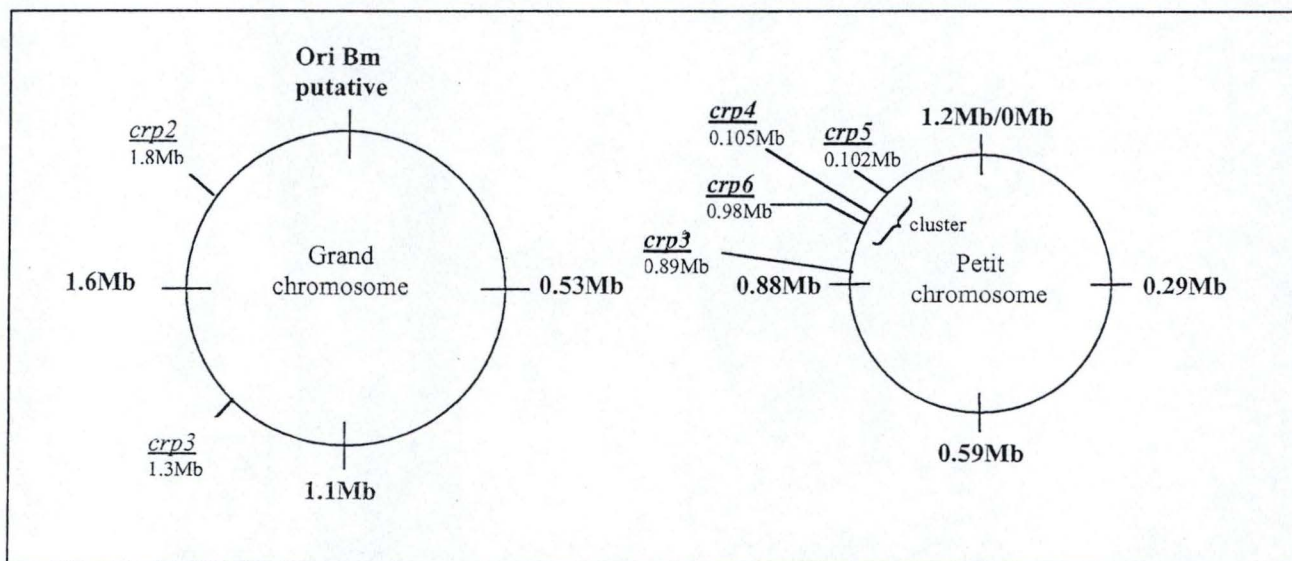


Fig.15. «Horloge» chromosomique représentant la localisation des gènes *crp* sur les deux chromosomes de *B. melitensis* 16M : petit chromosome = 1.17 Mb, grand chromosome = 2.12 Mb. Le «cluster» indique la localisation chromosomique des gènes qui permettraient la dénitrification par *Brucella* (voir texte).

Les voisinages chromosomiques des gènes *crp1*, *crp2* et *crp3* ne fournissent aucun indice quant à leur fonction régulatrice. Par contre, les gènes *crp4*, *crp5* et *crp6* possèdent un entourage génomique intéressant (fig.16). En effet, ces gènes se trouvent dans un cluster génomique regroupant les gènes indispensables à la réalisation d'un processus de

dénitrification anaérobie complet (Delvecchio, Kapatral *et al.* 2002) (fig.15). *Brucella* a toujours été décrite comme une bactérie aérobie stricte ; mais il n'a jamais été démontré qu'elle n'était pas capable de respirer en anaérobie, par réduction successive de nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), oxyde nitrique (NO) et oxyde nitreux (N_2O) (i.e. par dénitrification).

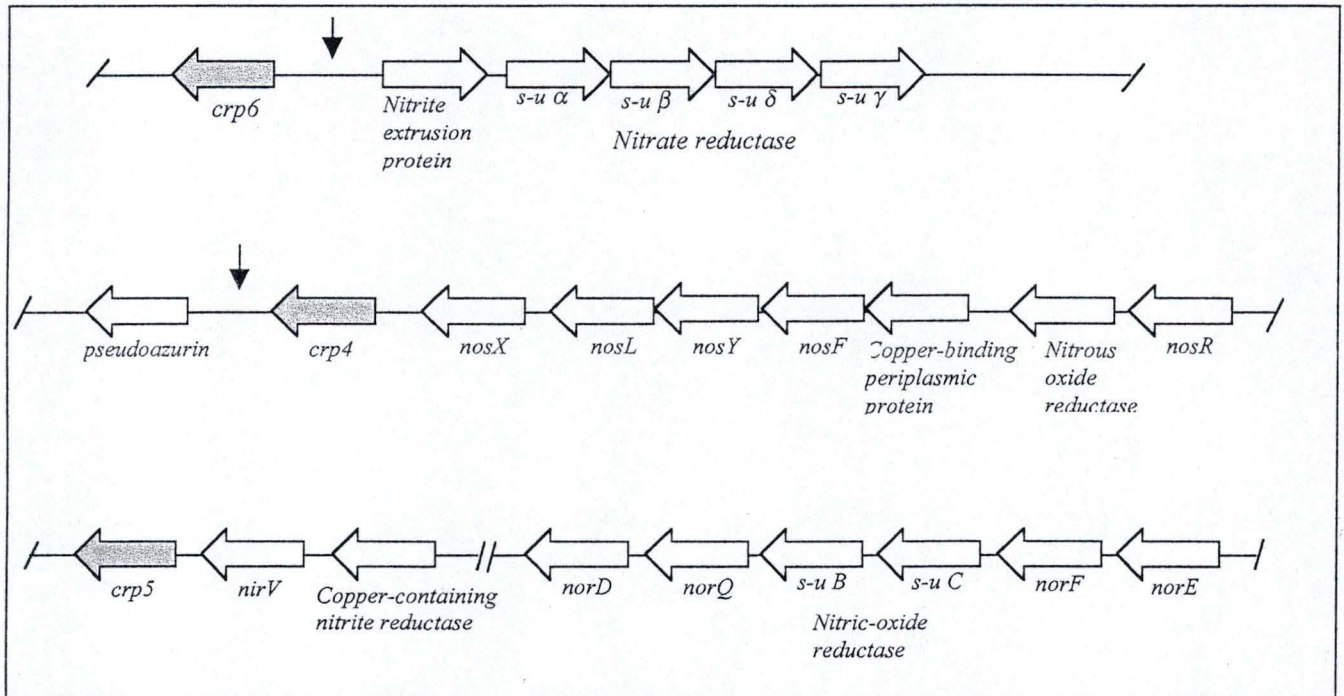


Fig.16. Représentation schématique des environs chromosomiques des gènes *crp4*, *crp5* et *crp6*. (Pour la fonction des gènes cités voir annexe1). Les flèches indiquent les sites d'atterissage supposés de Crp1.

Le gène *crp6* se localise juste en amont de l'opéron encodant le transporteur des différentes formes oxydées d'azote, ainsi que les différentes sous-unités de la nitrate réductase. La même organisation génomique est observée pour le premier homologue de *crp6*, *narR*, impliqué dans le contrôle de l'expression de la nitrate réductase chez *P. pantotrophus* (Wood, Alizadeh *et al.* 2001). Une hypothèse de travail intéressante serait que la protéine Crp6 contrôle l'expression de la nitrate réductase.

Le gène *crp5*, quant à lui, se situe à proximité de deux gènes dont les produits pourraient intervenir dans la réduction de nitrite. Un peu plus en amont, se trouvent les gènes impliqués dans la réduction de l'oxyde nitrique. Chez *R. sphaeroides*, le produit du gène *nnrR*, homologue de *crp5*, régule l'expression des nitrite et oxyde nitrique réductases simultanément (Tosques, Shi *et al.* 1996). Dès lors, on peut émettre l'hypothèse que Crp5 régule la production de la nitrite réductase et de l'oxyde nitrique réductase chez *Brucella*.

Enfin, le gène *crp4* est localisé en amont des gènes nécessaires à la réduction de l'oxyde nitreux. Ici aussi, on peut poser l'hypothèse que Crp4 régule ces gènes, bien que

cette fois, une telle hypothèse ne soit pas soutenue par des données expérimentales obtenues chez d'autres espèces.

Il est intéressant de noter qu'en amont des gènes encodant Crp6 et la pseudoazurine, on peut retrouver la séquence d'atterrissage de Fnr de *E. coli* (5'-TTGATnnnATCAA-3'). Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, la séquence en acides aminés du site de liaison à l'ADN de Crp1 est proche de celle de Fnr de *E. coli*, et on peut penser que ces deux protéines pourraient reconnaître un motif de liaison semblable sur l'ADN. Nous pouvons dès lors poser l'hypothèse que Crp1 régule l'expression des gènes *crp6* et de la pseudoazurine.

4.3 Construction des mutants intégratifs

La construction d'un mutant intégratif consiste à disrupter le gène d'intérêt par intégration d'un plasmide suicide. La stratégie est la suivante : un fragment du gène d'intérêt est amplifié par PCR et cloné dans le vecteur pSKoriTKan, non répliquatif chez *Brucella*. Le plasmide résultant est introduit chez *Brucella* par transfert conjugatif, et les clones recombinants sont sélectionnés sur un milieu contenant les antibiotiques adéquats (ici, l'acide nalidixique pour sélectionner la souche de *Brucella* et la kanamycine pour sélectionner les clones recombinants). L'insertion du plasmide à l'endroit ciblé est vérifié par Southern blot.

4.3.1 Constuction des vecteurs

4.3.1.1 Amplification par PCR d'un fragment interne des gènes d'intérêt

Définitions des amorces

Les amorces nucléotidiques ont été définies de manière à amplifier un fragment du gène d'intérêt codant pour la partie N-terminale de la protéine correspondante. De cette façon, la disruption des gènes d'intérêt inactive la fonction du régulateur (fig.17). En effet , le domaine de liaison à l'ADN (domaine HTH) des six protéines Crp se trouvant à leur extrémité C-terminale, la disruption des gènes en N-terminal empêche la production d'une protéine tronquée capable de se fixer à l'ADN.

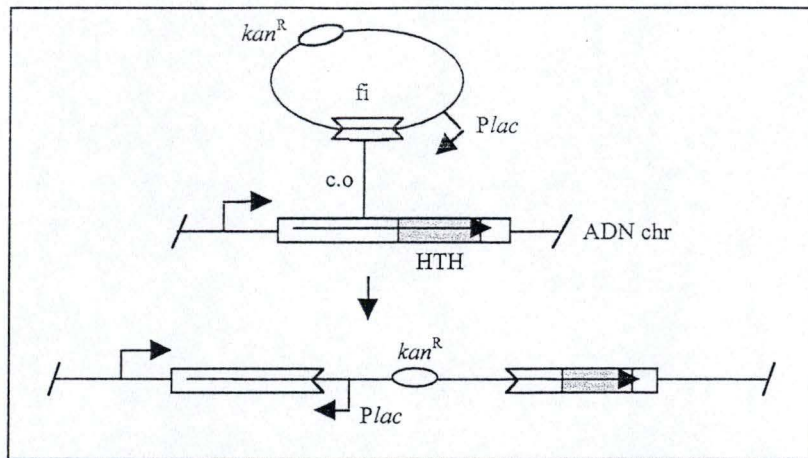


Fig.17. Localisation du fragment PCR amplifié par rapport au domaine HTH.
L'orientation de la transcription est indiquée par une flèche. kan^R = gène encodant la résistance à la kanamycine, fi = fragment interne, C.O.= crossing-over, ADN chr = ADN chromosomique de *B. melitensis*.

Quelques aménagements ont également été réalisés sur les amorces. Premièrement, des sites de restriction ont été ajoutés à chacune d'entre elles : un site *XbaI* pour le primer F (amorce amont) et un site *SaII* pour le primer R (amorce aval). Ces sites permettent, par restriction diagnostique, de vérifier le sens de l'insert cloné dans le vecteur (voir point suivant). Ensuite, une moitié de site *EcoRV* a été ajouté aux primers F et R, reconstituant ainsi un site *EcoRV* de part et d'autre de l'insert lors du clonage dans le pSKoriTKan. Ceci permettra de ressortir cet insert si nécessaire (ce ne fut pas le cas dans notre travail). Et enfin, un codon générant un stop a été ajouté à l'amorce R de façon à éviter la production d'une protéine hybride entre le plasmide et le régulateur disrupté. Notons que le site *XbaI* de l'amorce F comporte un codon générant un stop (fig.18).

<u>Primer F</u> 5'- atc <u>TCTAG</u> A ----- 3' <i>SaII</i>	<u>Primer R</u> 3'----- ATCGT <u>CGAC</u> cta -5' <i>XbaI</i>
---	---

Fig.18. Sites ajoutés aux amorces utilisées pour la PCR : en minuscules, demi sites *EcoRI* ; en gras, codon générant un stop ; et en majuscules, sites *XbaI* et *SaII*.

Amplification par PCR

La *Pwo* (polymérase proofreading) a été utilisée pour amplifier les six fragments d'intérêt à partir d'une préparation d'ADN génomique de la souche sauvage (*Brucella melitensis* 16M NaI^R). Les produits PCR obtenus ont été purifiés, et analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Pour chaque gène *crp*, des fragments PCR de la taille attendue (entre 350 et 400 pb) ont été obtenus (fig.19).

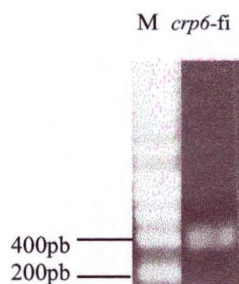


Fig.19. A titre d'exemple, électrophorèse en gel d'agarose 1% du produit PCR *crp6-fi* (fragment interne du régulateur *crp6*). M=marqueur de taille moléculaire. On observe une bande de \pm 400pb, taille attendue pour le fragment PCR *crp6-fi*.

4.3.1.2 Clonage des fragments PCR dans le pSKoriTKan

Les six fragments PCR purifiés ont chacun été insérés au site *EcoRV* unique d'un plasmide pSKoriTKan, qui permet un criblage blanc/bleu et une sélection sur kanamycine. Le mélange de ligation a ensuite été transformé dans des *E. coli* DH10B CaCl₂ compétentes. Les bactéries ainsi transformées ont été étalées sur milieu sélectif (LB agar + kanamycine) additionné d'IPTG et de X-gal.

Les colonies blanches (transformées avec un plasmide dont le gène *lacZ'* a été disrupté par un insert) ont été sélectionnées pour réaliser des minipréparations d'ADN plasmidique. Les constructions ainsi obtenues ont été vérifiées par restriction diagnostique avec les enzymes *XbaI* et *SalI*, de façon à sélectionner les plasmides comportant un insert cloné dans le sens opposé au promoteur *plac* du pSKoriTKan (fig.20 et fig 21). On réduit ainsi le risque de produire une protéine tronquée lors de l'intégration dans le génome de *Brucella*. Pour chacune de nos six constructions, plusieurs candidats ont montré le profil de restriction attendu. Les inserts portés par ces candidats ont ensuite été séquencés avec les primers universels de la série M13mp (Messing, 1983). Les six constructions pSKoriTKan-*crpfi* (fragment interne des gènes *crp*) se sont avérées correctes.

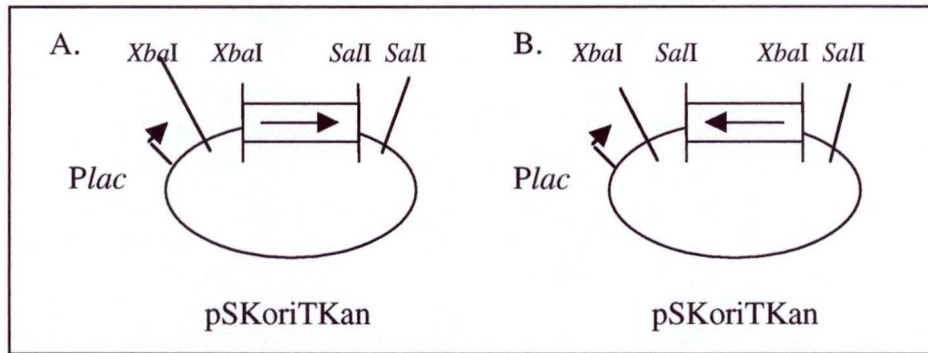


Fig.20. Cas A : Le fragment PCR du régulateur se trouve dans le sens du Plac. Cas B : Le fragment PCR du régulateur se trouve dans le sens opposé au Plac (profil attendu). Les tailles des fragments de restriction *XbaI* et *SalI* sont fort différentes, suivant le sens où le fragment interne est inséré (voir aussi fig.21)

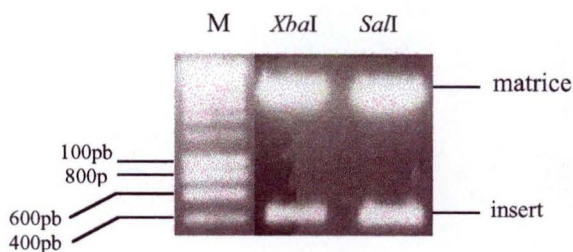


Fig.21. A titre d'exemple, restriction diagnostique de la construction pSKoriTKan-*crp2fi* (fragment interne du gène *crp2* cloné dans le psKoriTKan). La restriction avec *XbaI* permet de ressortir un fragment de 420pb et la restriction avec *SalI* permet de ressortir un fragment de 400pb (tailles attendues).

4.3.2 Construction des mutants *crp* chez *Brucella melitensis* 16M

4.3.2.1 Transfert conjugatif des constructions dans *B. melitensis* 16M

? conjugaison
E. coli - Brucella ?

Les constructions (pSKoriTKan + fragment interne) ont été transformées dans la souche S17-1 de *E. coli* et transférées par conjugaison à une souche de *B. melitensis* 16M (Nal^R). Les clones recombinants ont été sélectionnés sur milieu 2YT additionné d'acide nalidixique (25 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml ou 10 µg/ml¹⁰). Pour chaque mutant, une dizaine de clones candidats ont été obtenus sur milieu sélectif.

¹⁰ Pour la sélection des mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6*, la concentration en kanamycine était de 50 µg/ml. Cependant, l'observation en southern blot de profils d'intégration multiple pour les candidats mutants *crp3* nous a poussé à diminuer la concentration en kanamycine à 10 µg/ml pour les candidats *crp1* et *crp3*.

4.3.2.2 Validation des mutants par Southern blot

L'ADN génomique de candidats pour les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* a été extrait, restreint par *Hind*III et *Eco*RI et testé par Southern blot. La sonde utilisée pour le Southern blot est la cassette Kan (gène encodant la résistance à la kanamycine) marquée radioactivement. Pour la restriction par *Hind*III, la révélation montre deux bandes : une bande constante de 2029 pb et une bande variable dépendante de la position du site *Hind*III dans le génome de *B. melitensis*. Pour la restriction par *Eco*RI, la sonde s'hybride sur une bande unique, de taille variable (fig.22.). Les profils obtenus pour les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* sont montrés à la figure 23.

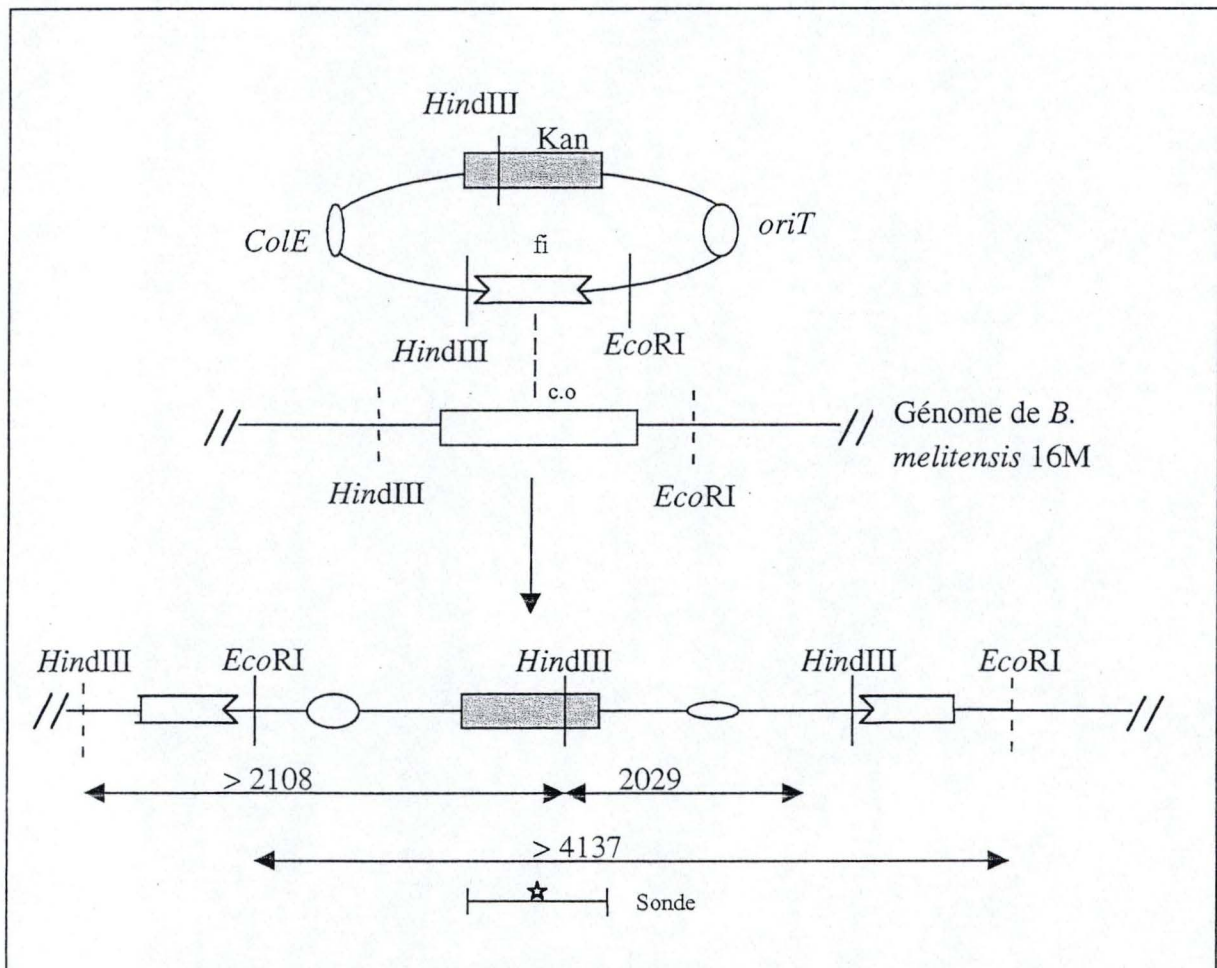


Fig.22. Tailles attendues en Southern blot avec la sonde Kan* (cassette Kan marquée radioactivement) pour un mutant dans lequel l'intégration s'est déroulée comme prévu. c.o : crossing over, fi : fragment interne, *ColE* : origine de répllication chez *E. coli*, *oriT* : origine de transfert conjugatif.

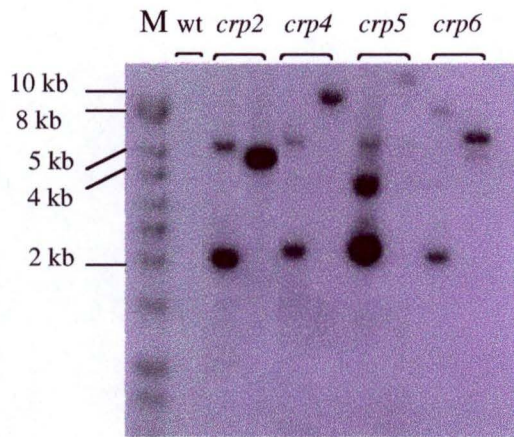


Fig.23. Autoradiographie du Southern blot effectué avec comme sonde la cassette Kan marquée radioactivement. L'ADN génomique des candidats mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* a été restreint par *HindIII* et par *EcoRI* (première et seconde piste pour chaque mutant respectivement). Les bandes attendues avec *HindIII* sont : pour chaque candidat, une bande constante à 2 kb ; pour *crp2* et *crp4*, une bande à 5.1 kb ; pour *crp5*, une bande à 3.4 kb ; pour *crp6*, une bande à 8 kb. Les bandes attendues avec *EcoRI* sont : pour *crp2*, une bande à 4.1 kb ; pour *crp4*, une bande à 9 kb ; pour *crp5*, une bande à 12 kb ; et pour *crp6*, une bande à 5.6 kb. M= marqueur de taille, wt=ADN génomique de la souche sauvage (*B. melitensis* 16M Nal^R), restreint avec *HindIII* et utilisé comme contrôle négatif.

Les préparations d'ADN génomique des candidats pour les mutants *crp1* et *crp3*, ont quant à elles été restreintes par les enzymes *HindIII* et *SspI*. Ici, une sonde spécifique a été utilisée pour le southern blot ; il s'agit du fragment PCR de la partie interne des régulateurs étudiés marqués radioactivement. Dans ce cas, la sonde s'hybride sur deux fragments *HindIII* de taille variable et deux fragments *SspI* également de taille variable (fig.24). Les profils obtenus pour les mutants *crp1* et *crp3* sont montrés à la figure 25.

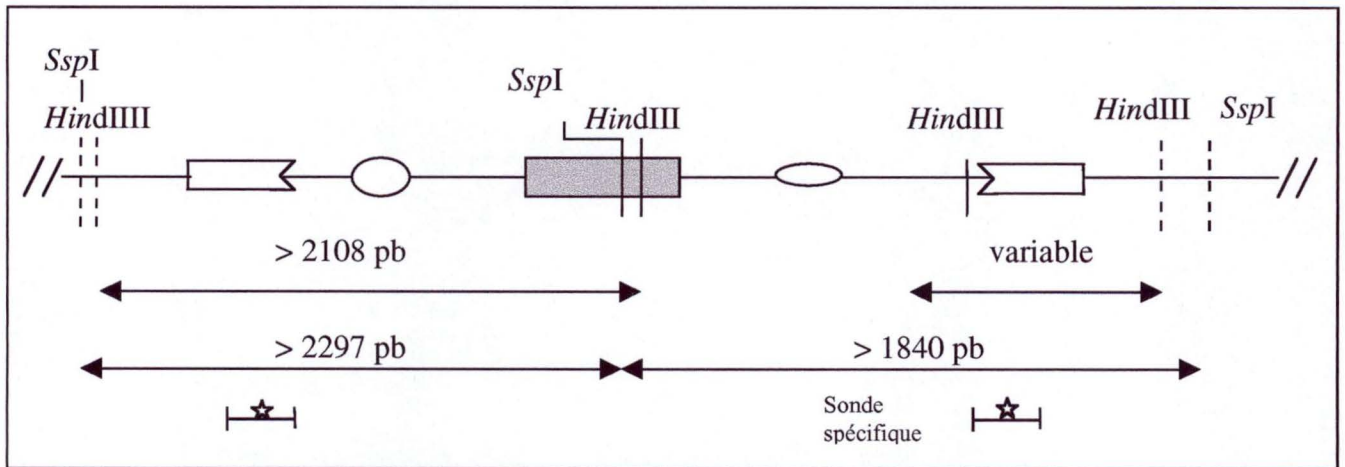


fig.24. Tailles attendues en Southern blot avec une sonde spécifique (fragment PCR du régulateur cible, marqué radioactivement) pour un mutant dont l'intégration s'est déroulée comme prévu.

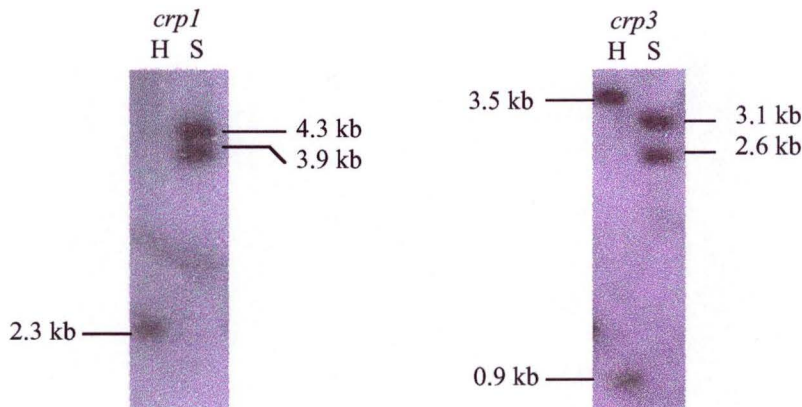


Fig.25. Autoradiographies des Southern blots effectués avec des sondes spécifiques pour les candidats mutants *crp1* et *crp3*. Les ADN génomiques ont été restreints avec *HindIII* (H) et *SspI* (S) et les profils attendus (et obtenus) en Southern blot sont indiqués. Notons que dans le cas de *crp1*, il existe trois sites *HindIII* dans le régulateur. La sonde spécifique recouvre quatre fragments *HindIII* dont trois sont trop petits (160, 150 et 310 pb) pour être visibles sur le gel de migration.

Pour les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6*, deux candidats ont été testés en Southern blot ; chacun montrant le profil de restriction attendu. Pour les mutants *crp1* et *crp3*, 16 candidats et 10 candidats respectivement ont dû être testés avant d'obtenir les profils de restriction attendus.

Parmi les candidats mutants validés par Southern blot, un mutant a été choisi pour chacun des régulateurs *crp*. Les six mutants sélectionnés ont été nommés respectivement mutant *crp1*, *crp2*, *crp3*, *crp4*, *crp5* et *crp6*, et ont été utilisés pour les expériences de caractérisation phénotypique *in vivo* et *in vitro*.

suggestif de redondance...

4.4 Caractérisation phénotypique des mutants

L'obtention des six mutants *crp* par disruption intégrative montre déjà que les gènes *crp* ne sont pas essentiels pour la croissance sur milieu riche (2YT). Pour évaluer l'implication des gènes *crp* dans la virulence de *B. melitensis* 16M, la survie des six mutants *crp* a été testée, en comparaison avec la souche sauvage, lors d'infections dans le modèle murin BALB/c. En parallèle, différents tests, visant à comprendre plus précisément dans quel(s) processus les régulateurs *crp* de *B. melitensis* 16M interviennent, ont été réalisés.

4.4.1 Test au cristal violet

Un des facteurs de virulence les mieux caractérisés de *Brucella* est la chaîne O du lipopolysaccharide (LPS). La souche sauvage *B. melitensis* 16M présente un phénotype

lisse (smooth), c'est-à-dire qu'elle possède la chaîne O du LPS. Les mutants de type rugueux (rough) ne possèdent pas cette chaîne et sont souvent atténués dans leur virulence (Godfroid, Taminiou *et al.* 1998). Il est donc intéressant de connaître le phénotype - smooth ou rough - des mutants *crp* avant de tester leur survie en modèle murin, pour s'assurer qu'une éventuelle atténuation de leur virulence ne serait pas due à un phénotype rough apparu suite à une mutation spontanée.

Un test simple, décrit par White en 1951, permet de différencier les souches smooth des souches rough ; il s'agit de la coloration au cristal violet. Les bactéries smooth excluent le colorant, tandis que les bactéries rough l'incorporent. Lors de ce test, deux souches contrôles ont été utilisées : la souche sauvage *B. melitensis* 16M comme contrôle smooth et la souche mutante ΔF (délétant pour le gène de la formyltransférase, (Godfroid, Cloeckert *et al.* 2000)) comme contrôle rough.

Les six mutants *crp* présentent un phénotype smooth, ce qui nous permet de les tester en modèle murin et nous indique qu'aucun des régulateurs Crp n'est impliqué dans le contrôle de la biosynthèse du LPS, du moins sur le milieu utilisé.

4.4.2 Test de survie en modèle murin

Afin d'évaluer la virulence des mutants *crp*, des infections en modèle murin ont été réalisées selon les modalités suivantes. Pour chacun des mutants *crp*, ainsi que pour la souche parentale (*B. melitensis* 16M NaI^R), quatre souris mâles BALB/c âgées de sept semaines ont été infectées par voie intra-péritonéale (à raison de $5 \cdot 10^5$ bactéries par souris). Après quatre semaines d'incubation, les souris ont été sacrifiées et leur rate a été récupérée pour en extraire les *Brucella*. Le nombre de bactéries (CFU, colony forming units) par rate a été dénombré pour chaque mutant et pour la souche parentale (fig.26.).

Les résultats obtenus montrent que les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* sont légèrement atténués dans leur virulence par rapport à la souche sauvage. En effet, on dénombre environ dix fois moins de bactéries pour les souris infectées avec les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6*, par rapport aux souris infectées avec la souche parentale. Toutefois, cette atténuation, significative, mais légère devrait être confirmée, par exemple par dénombrement des CFU dans la rate à d'autres temps post-infection. Les mutants *crp1* et *crp3*, sont quant à eux aussi virulents que la souche parentale.

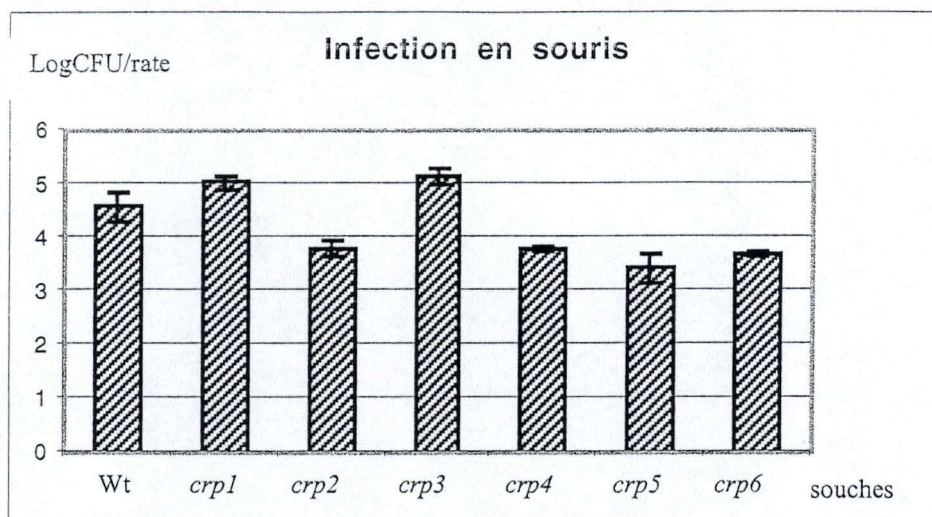


Fig.26. Survie en souris des mutants *crp1*, *crp2*, *crp3*, *crp4*, *crp5* et *crp6*, en comparaison avec la souche parentale (wt) après quatre semaines d'infection. Log CFU/rate = \log_{10} du nombre de bactéries par rate.

4.4.3 Test de croissance sur milieu minimum

La vacuole de répliation de *Brucella* est un environnement pauvre en nutriments. Le test de croissance de *Brucella* en milieu minimum consiste à mimer cet environnement pauvre : il contient une source de carbone sous forme de glycérol et d'acide lactique, une source d'azote sous forme d'acide glutamique, de l'acide nicotinamique (NAD), de la biotine (cofacteur essentiel à la croissance de *Brucella*), et différents ions. Par définition, les mutants présentant une auxotrophie ne se développeront pas sur ce milieu.

La croissance des six mutants *crp* a été testée sur milieu minimum, avec comme contrôle de croissance la souche sauvage (nous ne disposons pas à ce jour de mutants auxotrophes sur le milieu minimum décrit). En parallèle, les mutants ont été déposés sur milieu 2YT afin de contrôler leur croissance sur milieu riche. Les résultats montrent qu'aucun des mutants *crp* n'est auxotrophe. En effet, les six mutants, ainsi que la souche sauvage, poussent sur milieu minimum et sur milieu riche.

4.4.4 Test de réduction de nitrate en anaérobie

Le séquençage récent du génome de *B. melitensis* 16M (DeIVecchio, Kapatral *et al.* 2002) montre que cette bactérie, bien que décrite comme aérobie stricte, pourrait être capable de respirer en anaérobie grâce au processus de dénitrification. En effet, *Brucella* possède tous les gènes nécessaires à la réduction successive de nitrate, nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux. Par ailleurs, le contexte génomique des gènes *crp4*, *crp5* et *crp6*,

ainsi que les homologues partagés avec plusieurs régulateurs de la dénitrification chez d'autres espèces, suggèrent que ces gènes pourraient intervenir dans le contrôle d'un tel processus chez *Brucella*.

4.4.4.1 Test de réduction de nitrate en anaérobie pour la souche sauvage

Lors de ce travail, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier si la souche sauvage *B. melitensis* 16M était capable de respirer en anaérobie par réduction de nitrate. Une question semblable avait été posée et résolue pour *Mycobacterium sp* (Weber, Fritz *et al.* 2000); nous avons utilisé la même approche pour répondre à cette question chez *Brucella*.

L'activité de réduction de nitrate en anaérobie a été testée comme suit. La souche sauvage a été cultivée dans un milieu 2YT enrichi en nitrate (10 mM de nitrate de sodium), parallèlement en aérobie et anaérobie. La réduction de nitrate a été testée par détection du nitrite qui est présent dans le milieu de culture si le nitrate est réduit par la bactérie (voir Matériel et méthode, point 5.7.).

En anaérobie, de l'ordre de 50 μ M de nitrite ont été détectés dans le milieu de culture ; par contre en aérobie, le nitrite n'était pas produit. Ces résultats nous indiquent que ^{WT} *Brucella* est capable de respirer en anaérobie, par réduction du nitrate. Cependant, rien ne peut être conclu en ce qui concerne les étapes suivantes de la dénitrification (réduction de nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux), et une éventuelle multiplication de *Brucella* en anaérobie.

4.4.4.2 Test de réduction de nitrate en anaérobie pour les mutants *crp*

Dans un second temps, nous avons voulu tester les mutants *crp* pour la réduction de nitrate en anaérobie, afin de vérifier leur éventuelle implication dans le contrôle de cette première étape de la dénitrification. Rappelons que les gènes *crp4*, *crp5* et *crp6* sont situés à proximité des divers réductases impliquées dans la dénitrification.

Comme pour la souche sauvage, des cultures de chaque mutant *crp* ont été réalisées dans du milieu 2YT enrichi en nitrate en anaérobie. La souche sauvage a été utilisée comme contrôle positif (fig.27).

Pour les mutants *crp2* et *crp3*, de l'ordre de 60 μM de nitrite ont été détectés dans le milieu de culture. Ces mutants qui présentent un phénotype similaire à celui de la souche sauvage ne sont donc pas impliqués dans le processus de réduction de nitrate.

Les mutants *crp1* et *crp6* présentent un phénotype semblable. La présence de nitrite n'a pas été détectée dans les milieux de cultures de ces mutants, ce qui indique qu'ils sont déficients pour la réduction du nitrate. Ces données suggèrent que les produits des gènes *crp1* et *crp6* pourraient être impliqués dans le contrôle de l'expression de la nitrate réductase.

Pour le mutant *crp5*, on observe une forte accumulation de nitrite dans le milieu de culture ($>100\mu\text{M}$). Ces données sont compatibles avec une fonction possible du régulateur Crp5 dans la régulation de l'expression de la nitrite réductase. En effet, si la nitrite réductase n'est pas exprimée dans le mutant *crp5*, il est logique d'observer une accumulation de son substrat, le nitrite.

Enfin, le mutant *crp4* présente une activité de réduction de nitrate plus faible que la souche sauvage : environ 21.8 μM de nitrite ont été détectés dans le milieu de culture. Ces données ne permettent aucune interprétation claire sans informations complémentaires.

Toutes ces données sont le fruit d'une expérience unique, et doivent bien sûr être confirmées. Dans ce cas-ci non plus, rien ne peut être conclu quant au comportement de *Brucella* en anaérobie : se contente-t-elle de survivre, ou bien se multiplie-t-elle activement ?

Souches	Homologues du gène muté impliqués dans le contrôle de la dénitrification	Activité de réduction de nitrate	
		DO (à 530nm)	Concentration en nitrite (μM)
<i>crp1</i>	?	0.015	-
<i>crp2</i>	non	0.519	± 58.4
<i>crp3</i>	non	0.534	± 60.0
<i>crp4</i>	oui	0.174	± 21.8
<i>crp5</i>	oui	1.904 (dilution 2x)	>100
<i>crp6</i>	oui	0.007	-
wt	-	0.423	± 47.1

Fig.27. Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les tests de réduction de nitrate réalisés pour les six mutants *crp*. Le gène *crp1* ne possède pas d'homologues proches dont l'implication dans le contrôle de la dénitrification est démontrée, mais plusieurs homologues impliqués dans le contrôle d'autres processus anaérobie existent.

5 Discussion et perspectives

5.1 Récapitulatif des résultats obtenus.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la famille de régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr chez *B. melitensis* 16M. Nous avons voulu tester l'implication de ces régulateurs dans la virulence de cette bactérie. A cette fin, deux approches ont été utilisées en parallèle. D'une part, une analyse des loci *crp* et de leurs homologues a été réalisée. D'autre part, des mutants intégratifs ont été construits pour chacun des six gènes *crp*, et les phénotypes résultants ont été analysés *in vivo* et *in vitro*.

L'analyse génomique nous a révélé que plusieurs de nos régulateurs (Crp4, Crp5 et Crp6) présentent de fortes homologies avec des protéines impliquées dans le contrôle de la dénitrification anaérobie chez des espèces bactériennes proches de *Brucella*. Ces homologies concordent avec le contexte chromosomique des gènes *crp4*, *crp5* et *crp6*. En effet, ces gènes sont situés à proximité des complexes génomiques encodant les nitrate, nitrite et oxyde nitrique, et oxyde nitreux réductases, respectivement. En ce qui concerne le régulateur Crp1, il partage des homologies avec des protéines possédant un centre senseur de l'oxygène leur permettant de répondre à des changements de concentration en O₂. Enfin, les régulateurs Crp2 et Crp3 ne présentent aucun homologue caractérisé, dès lors, nous ne pouvons pas émettre d'hypothèses quant à leur fonction.

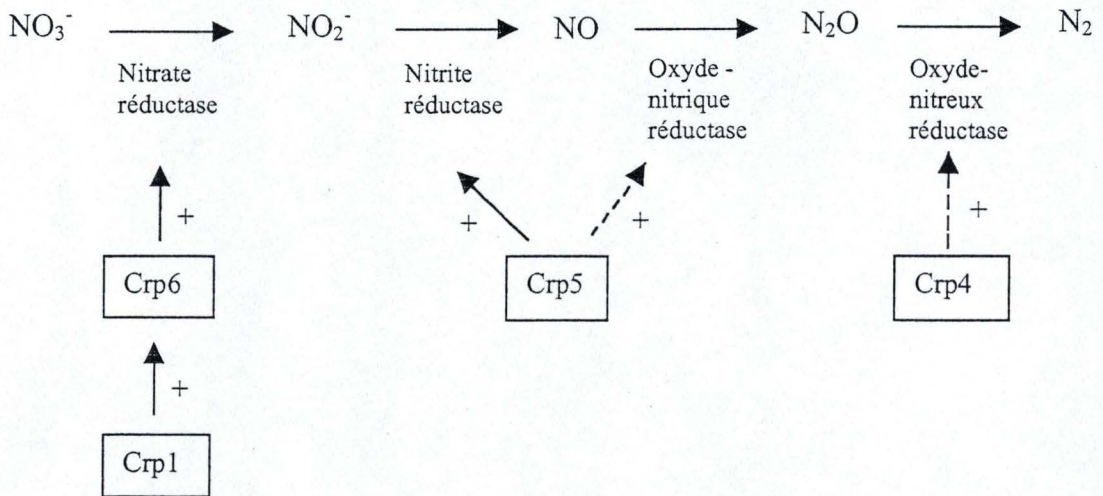
Les six mutants intégratifs *crp* ont été obtenus avec succès; ce qui montre que les régulateurs Crp ne sont pas essentiels à la survie de *Brucella* sur milieu riche. Par contre, en modèle murin, les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* montrent une légère atténuation de croissance par rapport à la souche parentale à quatre semaines post-infection.

Bien que *Brucella* soit décrite comme aérobie stricte, elle possède les gènes nécessaires à la respiration en anaérobie par réduction successive de nitrate, nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux. Un test de réduction de nitrate a mis en évidence que *Brucella* respire en anaérobie. En ce qui concerne nos mutants, les résultats de ce test montrent que les mutants *crp1* et *crp6* ne réduisent pas le nitrate en anaérobie, alors que les mutants *crp2*, *crp3*, *crp4* et *crp5* quant à eux le réduisent. Notons que le mutant *crp4* a une activité de réduction du nitrate moindre que la souche sauvage, tandis que pour le mutant *crp5*, nous observons une accumulation de nitrite qui pourrait être due à l'absence d'activité de réduction de nitrite.

5.2 Discussion

5.2.1 Rôles de Crp1, Crp4, Crp5 et Crp6

Les résultats obtenus pour l'analyse génomique des loci *crp* et pour les tests de réduction de nitrate *in vitro* pour les mutants *crp1*, *crp4*, *crp5* et *crp6* nous amènent à proposer le modèle de régulation suivant :



L'homologie de Crp6 avec la protéine NarR (régulateur de l'expression de la nitrate réductase chez *P. pantotrophus*) (Tosques, Shi 1996), et l'incapacité du mutant *crp6* à réduire le nitrate suggèrent que ce régulateur pourrait activer l'expression de la nitrate réductase chez *Brucella*.

Le mutant *crp1* présente le même phénotype que le mutant *crp6*. Par ailleurs, la présence d'une boîte *fnr* en amont du gène *crp6* laisse penser que le régulateur Crp1, dont le domaine de liaison à l'ADN est proche de celui de Fnr (Fischer 1994), pourrait activer la transcription du gène *crp6*.

Le régulateur Crp5 est homologue à la protéine NnrR qui active simultanément l'expression de la nitrite réductase et de l'oxyde nitrique réductase chez *R. sphaeroides* (Wood, Alizadeh *et al.* 2001). L'accumulation de nitrite par le mutant *crp5* sur milieu nitrate en anaérobiose concorde avec l'hypothèse selon laquelle Crp5 jouerait un rôle similaire à celui joué par NnrR.

but de survie en souris

↳ définites de la virulence
liées de ce modèle

relevance du modèle souris
pour *B. melitensis* ?

Soch. capotable d'âne pentapne
et hautement adaptable

↳ impact sur approche opt-probabilité succès

② si la respiration de nitrate est Δ pour l'adaptation
de la bactérie durant l'injection se serait. il par
logique que la Soch. ait mis au point des
systèmes de "recours" redondants pour lui
permettre de survivre en cas de mutation dans
un ou plusieurs gènes clés...

impact pour l'approche opt.

Le test de réduction de nitrate utilisé ne nous permet pas d'examiner le rôle de Crp4 dans le contrôle de l'expression de l'oxyde nitreux réductase, cependant la localisation du gène *crp4* est en accord avec l'hypothèse d'une telle fonction.

Les résultats des infections en modèle murin par les mutants *crp* suggèrent l'existence d'un lien entre la respiration par réduction anaérobie de nitrate (voire de nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux) et la virulence de *Brucella*. En effet, les mutants *crp4*, *crp5* et *crp6*, potentiellement impliqués dans un tel processus de respiration, sont légèrement, bien que significativement, atténués en souris par rapport à la souche parentale. L'absence d'atténuation du mutant *crp1* pourrait par exemple s'expliquer par l'existence de régulateurs redondants activés *in vivo*.

L'implication dans la virulence de la respiration anaérobie par réduction de nitrate a déjà été démontrée chez certaines espèces bactériennes dites aérobie strictes. Ainsi, chez *Mycobacterium bovis* BCG, la respiration de nitrate semble être un processus important pour la virulence en modèle murin. Un mutant déficient pour la réduction de nitrate est incapable de persister dans les poumons, le foie et les reins d'une souris immuno-compétente, et se répand peu dans ces organes chez une souris immuno-déficiente. Dans la rate, la réduction anaérobie de nitrate semble dispensable pour la survie des mycobactéries. Ces résultats suggèrent, d'une part, que ce processus est essentiel pour la survie des mycobactéries en souris immuno-compétentes, et d'autre part, que ce rôle est spécifique d'organe (Weber, Fritz *et al.* 2000); (Fritz, Maass *et al.* 2002). Par ailleurs, *Brucella* et *Mycobacterium* sont tous deux des pathogènes intracellulaires de macrophages, et se retrouvent donc, chez leur hôte, dans des organes similaires : rate, foie, poumon, etc. On peut donc imaginer que, tout comme *Mycobacterium*, *Brucella* pourrait utiliser la respiration de nitrate pour s'adapter à un environnement anaérobie rencontré lors de son cycle infectieux. Le régulateur Crp6 semble être un bon candidat pour réguler ce processus.

Brucella pourrait également utiliser la dénitrification pour détoxifier l'oxyde nitrique (NO). Le NO est un composé toxique produit par les macrophages pour se défendre contre divers pathogènes, et qui induit l'apoptose, stratégie également utilisée pour éliminer les bactéries intracellulaires. De récentes études, chez *B. abortus*, ont montré que, durant les premières 24 heures d'infection, le NO accélère l'élimination des *Brucella* dans des macrophages activés, mais celle-ci est incomplète. Par ailleurs, après 72 heures d'infection, la concentration en NO dans ces macrophages diminue de moitié, et l'apoptose n'est pas

déclenchée (Wang, Qureshi *et al.* 2001). Ces données suggèrent que *Brucella* pourrait utiliser l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase pour éliminer le NO. Cette hypothèse concorde avec l'observation que la disruption des gènes *crp4* et *crp5*, dont les produits réguleraient l'expression de ces réductases, provoque une atténuation en modèle murin.

5.2.2 Rôle de Crp2 et Crp3

Le fait qu'aucun homologue de Crp2 et Crp3 n'est caractérisé, ainsi que l'absence de phénotype lors des tests réalisés *in vitro* pour les mutants *crp2* et *crp3* ne nous permet d'émettre aucune hypothèse quant aux fonctions de ces régulateurs. Par ailleurs, malgré l'homologie existant entre les gènes *crp2* et *crp3*, les différences de phénotype entre ces mutants en ce qui concerne l'infection en modèle murin suggèrent que ces deux régulateurs ont des fonctions différentes.

5.3 Perspectives

Dans un premier temps, une cinétique d'infection en souris (une, quatre et huit semaines post-infection) devrait être effectuée pour confirmer l'atténuation observée pour les mutants *crp2*, *crp4*, *crp5* et *crp6* durant ce mémoire. Si ce phénotype est confirmé, des expériences de complémentation seront réalisés, afin de montrer que l'apport d'une copie sauvage des gènes *crp* dans les mutants restaure le phénotype sauvage en modèle murin. Cette complémentation confirmerait également l'implication des gènes *crp* dans les phénotypes observés pour les tests de réduction de nitrate.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle la réduction de composés azotés est impliquée dans la pathogénie de *Brucella*, plusieurs expériences peuvent être envisagées. Tout d'abord, il serait intéressant de disrupter les gènes encodant les différentes réductases de *Brucella* (nitrate, nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux réductases), et d'observer les phénotypes mutants en modèle murin. Cependant, étant donnée l'observation que, chez *Mycobacterium*, la respiration de nitrate est dispensable dans la rate de souris BALB/c, mais pas dans le poumon et le foie par exemple, les *Brucella* devraient aussi être dénombrées dans ces deux organes. Les mêmes expériences pourraient être effectuées pour les mutants *crp1*, *crp4*, *crp5* et *crp6*.

Brucella pourrait utiliser l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase pour détoxifier le NO. L'expérience suivante renforcerait cette hypothèse : nous pourrions réaliser des infections avec nos mutants (mutants *crp4*, *crp5* et des mutants dans l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase), en comparaison avec la souche parentale, dans des macrophages activés pour la production de NO (avec de l'interféron gamma) et des macrophages non-activés, tel que proposé par Wang *et al* (2001). La concentration en NO serait mesurée et la proportion de macrophages apoptotiques observée à divers temps post-infection, afin de mettre en évidence une éventuelle incapacité de nos mutants à détoxifier le NO et à empêcher l'apoptose induite par ce dernier.

Afin d'affiner notre modèle de régulation, plusieurs méthodes peuvent également être envisagées. Premièrement, des constructions comportant les promoteurs des gènes encodant les réductases clonés en amont d'un rapporteur peuvent être placées dans les différents contextes mutants (*crp1*, *crp4*, *crp5* et *crp6*) et sauvage. Ceci permettrait de vérifier l'implication des gènes *crp* dans le contrôle de l'expression de ces réductases. Une fusion du promoteur du gène *crp6* avec un gène rapporteur, placée dans la souche parentale et dans le mutant *crp1*, permettrait de confirmer le rôle de Crp1 dans l'activation de la transcription de ce gène. Ensuite, de nouvelles cibles des régulateurs Crp pourront être identifiées lors d'analyse des profils transcriptionnels des différents mutants (Northern blot, cDNA microarrays), en comparaison avec la souche parentale, dans différentes conditions de culture. Enfin, le clonage des promoteurs *crp* en amont d'un gène rapporteur permettrait d'étudier les conditions d'induction de ces gènes, et donc de leurs cibles.

→ par la mention de double mutants

6 Matériel et méthodes

6.1 Souches bactériennes et plasmides

6.1.1 Souches bactériennes

6.1.1.1 *Escherischia coli*

S17 -I

La souche d'*E. coli* S17- I est entre autres, résistante à la streptomycine (Sm^R) et possède, intégré dans son chromosome bactérien, le plasmide RP4 qui encode différentes protéines indispensables au transfert d'ADN vers une bactérie receveuse. Cette souche est notamment utilisée pour le transfert d'ADN plasmidique à *Brucella*, par conjugaison.

DH10B

La souche bactérienne DH10B de *E. coli* est utilisée pour la transformation par divers plasmides et produits de ligation. Elle est résistante à la streptomycine.

6.1.1.2 *Brucella sp*

Bm 16M (MCM Nal R)

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est *B. melitensis* biovar 1 16M, de phénotype smooth, et rendue récemment résistante à l'acide nalidixique (NalR) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur. Cette souche a été reçue de A. MacMillan et isolée sur le terrain en 1955.

6.1.2 Plasmides

6.1.2.1 Test blanc/bleu

Les éléments génétiques portés par la souche DH5 α (Δ lac) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacZ' (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène lacZ (partie N-terminale de la β -galactosidase) peut néanmoins se faire. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur X-gal (20 μ g / ml), substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Le test blanc-bleu met en évidence les bactéries présentant un plasmide contenant un insert car celui-ci est disrupté dans le gène lacZ' et la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. La colonie bactérienne apparaîtra blanche. L'addition d'IPTG (0.1 mM) dans le milieu de culture permettra l'expression de lacZ.

6.1.2.2 pSKoriTKan

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK(-) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée (Anne Tibor *et al.*) (Figure 28). Il porte une origine de répllication ColE1 non fonctionnelle chez *Brucella* ; c'est donc un plasmide non réplificatif chez cette bactérie. Il porte la cassette de résistance à la kanamycine disruptant le gène bla qui encode la résistance à l'ampicilline (V. Haine, mémoire de licence 2000).

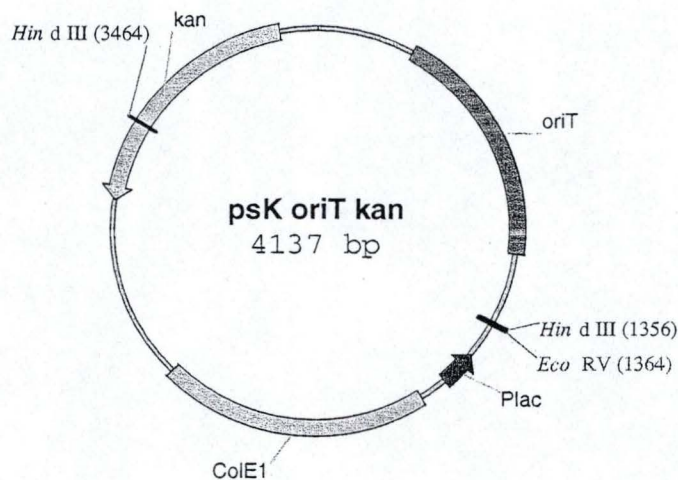


Fig.28. Plasmide pSKoriTKan. Kan : cassette encodant la résistance à la kanamycine ; colE1 : origine de répllication (non fonctionnelle chez *Brucella*) ; oriT : origine de transfert conjugatif.

6.2 Milieux de culture

6.2.1 Milieu Luria Bertani (LB)

Forme liquide :	- Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g/ L
	- NaCl	5 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
Forme solide :	- Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g/ L
	- NaCl	5 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
	- Agar	12 g/ L

6.2.2 Milieu 2YT

Forme liquide :	- mix pour LB liquide	20 g/ L
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
Forme solide :	- mix pour LB agar	32 g/ L
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
	- Agar	1 g/ L

Après préparation, les milieux sont stérilisés par autoclavage (20 min. à 120 °C)

6.2.3 Milieu minimum pour *Brucella*

Forme solide : - Préparer 500 ml de la composition suivante :

- NaCl	7.5 g
- Dipotassium phosphate	10 g
- Thiosulfate de sodium	0.1 g
- Glycérol	30 g
- Acide lactique	5 g
- Acide L-glutamique	1.5 g
- Composé 1 (métaux)	1 ml
- Composé 2 (vitamines)	1ml
- Composé 3 (biotine)	1 ml
- Ajuster le pH à 6.8-7.0	
- Stériliser le milieu par filtration	
- Mélanger le milieu avec 500 ml d'une solution d'agar (12 g) stérilisé par autoclavage	

Composé 1 :	- MgCl ₂ *6H ₂ O	8.330 g
	- FeSO ₄ *7H ₂ O	0.050 g
	- MnCl ₂ *4H ₂ O	0.040 g
	- Ca pantothénate	0.004 g

Composé 2 :	- Thiamine HCl	20 mg
-------------	----------------	-------

- Acide nicotinamidique	20 mg
Composé 3 : -Biotine	0.01 g

6.2.4 Milieu enrichi en nitrate

Forme liquide : - Autoclaver du 2YT liquide

- Ajouter du nitrate de sodium (NaNO_3) pour obtenir une concentration de 10 mM

6.2.5 Antibiotiques

- Kanamycine (Kan 50)	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Acide nalidixique (Nal 25)	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

6.3 Manipulation et analyse de l'ADN

6.3.1 Techniques classiques de biologie moléculaire

6.3.1.1 Electrophorèse en 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 inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueur de taille l'HyperLadder de Bioline (fig 29).

Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN présent. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Mode opératoire

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide
- Quand la solution est refroidie, ajouter 5 μl de BrEth, et couler la solution sur un support *ad hoc* muni d'un peigne
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm)

Solution, tampons et matériel

- * Solution de bromure d'éthidium: 2 µg/ ml
- * Solution d'alourdisseur: - glycerol 50%
 - EDTA 100 mM
 - SDS 1%
 - Bleu de bromophénol
- * Tampon TAE (50 fois concentré): - Tris-HCl, pH 8,0 40mM
 - EDTA 50 mM
 - Acide acétique glacial 57,1 ml/ L

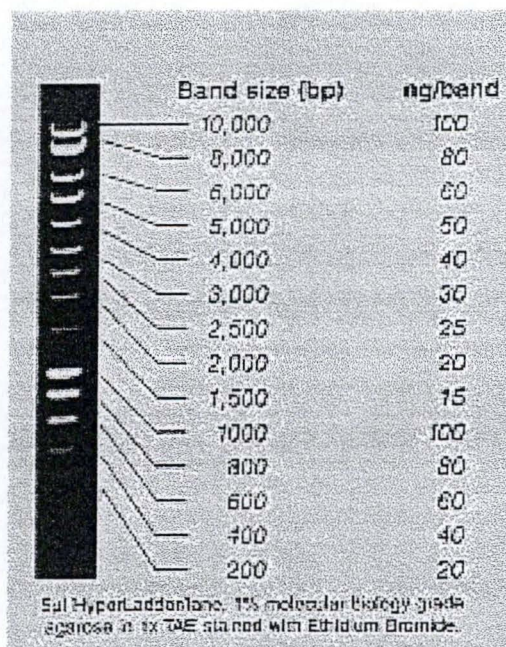


fig.29. Marqueur de taille utilisé pour les gels d'agarose : «HyperLadder» (Bioline)

6.3.1.2 Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen, 1U/ µl). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg²⁺.

Mode opératoire

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liquer
- 1/10^{ème} du volume final de tampon de ligation 10x
- Le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN)
- Compléter avec de l'eau distillée stérile
- Incuber, à température ambiante 2-3 heures (pour des bouts francs)

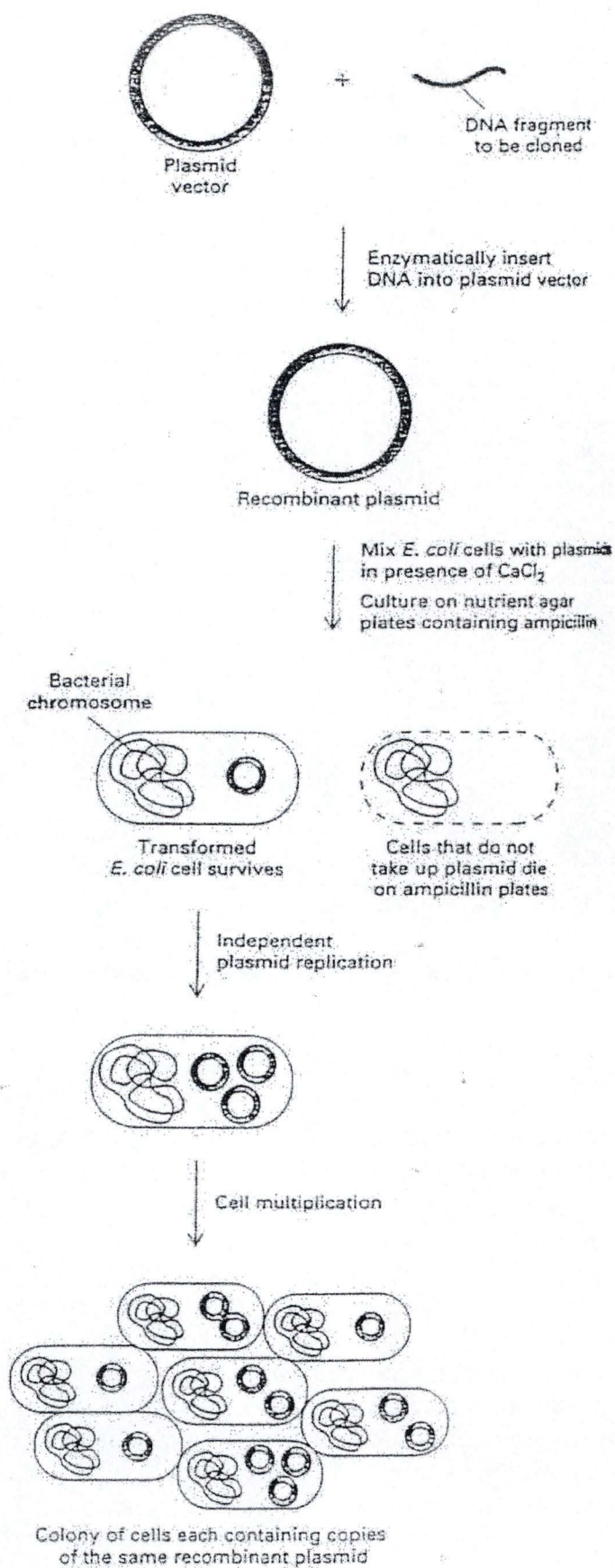


Figure 30 : Principe de la transformation bactérienne

6.3.1.3 Transformation bactérienne

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie (Fig. 30). Nous utilisons ici la transformation chimique pour transformer la souche *E. coli* S17-1. Pour cette transformation, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroblaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

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

Mode opératoire

Transformation des cellules compétentes

- Ajouter environ 10 μl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN à 50 à 150 μl de cellules compétentes
- Déposer 30 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique de 45 secondes à 37 °C
- Ajouter 900 μl de LB liquide
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37 °C
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37 °C

6.3.1.4 Minipréparation d'ADN plasmidique

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

Mode opératoire

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Centrifuger 1,5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 μl de S1

- Ajouter 300 µl de S2 et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement en retournant, incuber 10 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm) et récupérer le surnageant
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant
- Laver l'ADN, en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12500 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol
- Sécher le culot d'ADN
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile

Solutions

- * S1: - RNase A 100 µg/ ml
 - Tris-HCL 50 mM pH 8,0
 - EDTA 10mM, à conserver à 4 °C
- * S2: - NaOH 200 mM
 - SDS 1 %, à conserver à température ambiante
- * S3: - KAc 3.0 M pH 5.5, à conserver à 4°C

6.3.1.5 Restriction d'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences, souvent palindromiques, de 4 à 6 paires de bases.

Mode opératoire

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
- Ajouter 1/10^{ème} de tampon de restriction 10x, associé à l'enzyme
- l'enzyme de restriction doit constitué au maximum 1/10^{ème} du volume final càd entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)
- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber le mélange au minimum 1 heure 30 (pour l'ADN plasmidique) ou overnight (pour l'ADN génomique) à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

6.3.2 Amplification par PCR

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens".

Régulateurs	Amorce amont (F)	Amorce aval (R)
Crp1	5'-ATCTCTAGACCCTGCAATGTGTGCGAAGAT-3'	5'-ATCGTCGACCTAGCGCTCCATCAAACGCTCTAT-3'
Crp2	5'-ATCTCTAGACCAATCCTGGCCAAACTGGAA-3'	5'-ATCGTCGACCTACTGCCGCGAAAGAAGCTCAAT-3'
Crp3	5'-ATCTCTAGAGACGATCTGGGCACCCTGAAA-3'	5'-ATCGTCGACCTACGCCGTCAGTCCATGAATGT-3'
Crp4	5'-ATCTCTAGAGCGGTGGTGGATTGCAGCGTT-3'	5'-ATCGTCGACCTAGCTCTGCCATTGGCTGACGAT-3'
Crp5	5'-ATCTCTAGAGTCCCGCAGGGTGAATCCATT-3'	5'-ATCGTCGACCTACTCCACTTCCTCGGTCGACAT-3'
Crp6	5'-ATCTCTAGACGCCCAAGTTTCGTGCATCA-3'	5'-ATCGTCGACCTACTGCGCACAGCTTCGCAGTTT-3'

Tableau 1 : Liste des primers utilisés au cours de ce mémoire.

Une ADN polymérase thermostable, telle que la Taq (Biotools) qui ajoute une base A aux extrémités 3' ou la Pwo (enzyme proofreading) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes : dénaturation des brins d'ADN, hybridation des amorces et élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire). En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible.

Le T_m (température d'hybridation) se calcule de la façon suivante : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ (4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T).

Mode opératoire

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:

- ADN génomique (1-10 ng)	1 μl
- Tampon d'ADN polymérase 10X	5 μl
- dNTP (5 mM chacun)	2 μl
- Primer 1 (tableau 1)	0.1-0.6 μM
- Primer 2 (tableau 1)	0.1-0.6 μM
- Polymérase (2 U/ μl)	0.5-1 μl
- Porter à 50 μl avec de l'eau distillée stérile	

Programmer l'appareil comme suit :

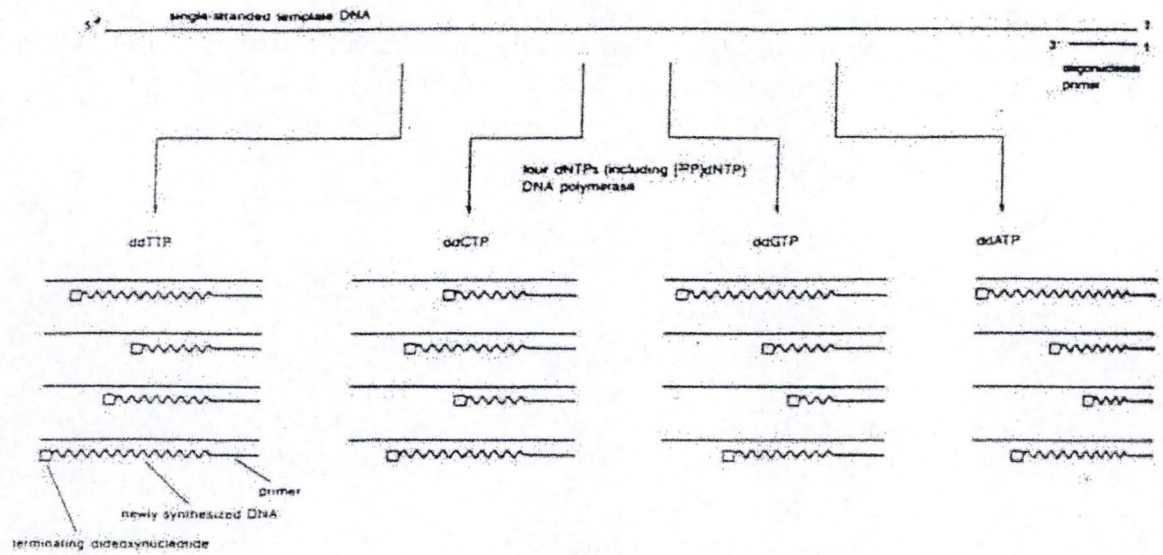
- Dénaturation de 2 minutes à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisé en 3 étapes:
 - * 30 sec. à 95°C pour la dénaturation.
 - * 30 sec. à $60-65^\circ\text{C}$ pour l'hybridation
 - * 30 sec. à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 6 minutes à 72°C

Après la PCR, les fragments d'ADN obtenus sont purifiés à l'aide du kit de purification : Rapid PCR purification system de GibcoBRL.

6.3.3 Extraction d'ADN génomique de *Brucella sp*

Mode opératoire

- En utilisant une anse, prélever des bactéries sur milieu solide et les resuspendre dans 567 μl de TENa (en eppendorf)
- Ajouter 30 μl de SDS 10% et 3 μl de protéinase K à 20 mg/ml
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure
- Ajouter 600 μl de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf
- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 13500 rpm
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface
- Ajouter 80 μl de NaClO_4 5M et 600 μl de chloroforme, agiter fortement
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C)
- Mélanger en inversant l'eppendorf
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm



The newly synthesized chains terminate when a ddNTP is incorporated in place of the normal dNTP

Denature and separate fragments of radiolabeled DNA by electrophoresis

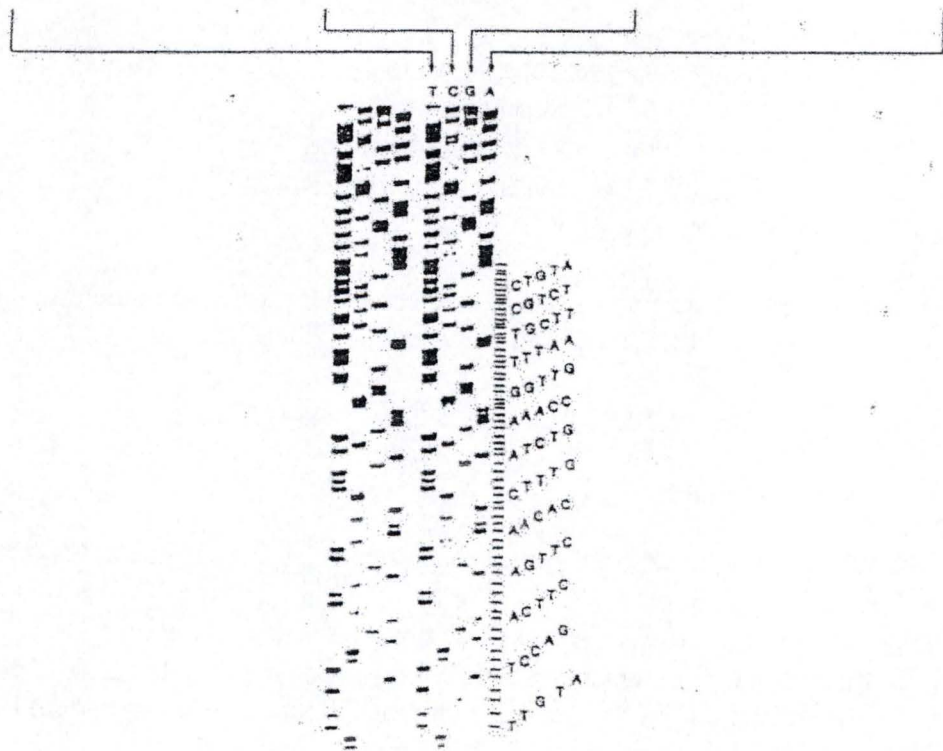


Fig. 31 : Réaction de séquençage.

- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C)
- Centrifuger 10 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant
- Sécher sous vide et resuspendre dans 100 µl d'eau distillée stérile
- Pour faciliter la resuspension, incuber l'appendorf à 37°C

Solutions et tampons

- TENA: - Tris 50 mM à pH 8
 - EDTA 50 mM
 - NaCl 0.1 M
- Protéinase K 20 mg/ml : - Tris pH 7.5, 1 mM
 - CaCl₂ 1 mM (conservé à 4°C)
- Phénol saturé en TENa : - un volume de TENa
 - un volume de phénol

6.3.4 Séquençage de l'ADN

Le principe (fig. 31) est une amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basé sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir un population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN

Une réaction de PCR est réalisée sur le fragment d'ADN .

La concentration en ADN matrice doit être de 1 à 100 ng pour un produit PCR et de 200 à 500 ng pour de l'ADN plasmidique. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage

La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM

Les produits PCR sont séparés suivant leurs tailles par électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur.

6.3.5 Analyse par southern blot

Le Southern blot est une technique d'identification et de localisation de séquences spécifiques d'ADN (fig. 32). Elle tire parti de la propriété qu'a l'ADN de former des structures en duplex stables, stabilité en relation directe avec la complémentarité des deux brins d'ADN. Le procédé utilise des sondes d'ADN marquées qui vont s'hybrider avec les séquences d'intérêts.

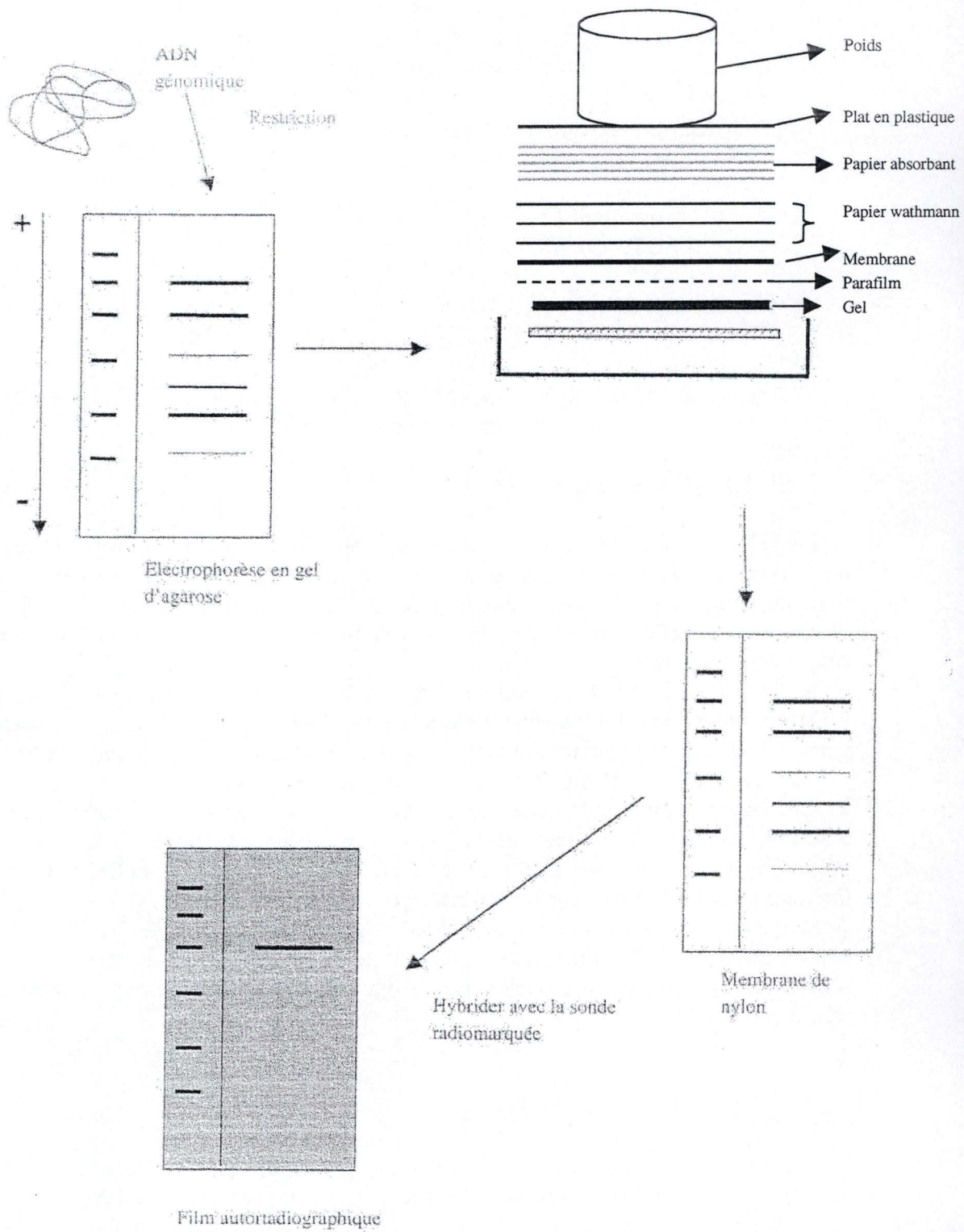


Fig. 32 : Principe de Southern blot

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon la taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxide de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon dans une solution de haute concentration alcaline grâce à un transfert effectué par capillarité, on obtient donc une réplique du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane de nylon par chaleur et par exposition aux UV.

L'hybridation de la sonde d'acide nucléique radiomarquée à l'ADN dénaturé et restreint fixé sur la membrane de nylon s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane.

La sonde hybridée au fragment d'ADN recherché est décelée par autoradiographie de la membrane. La position à laquelle s'est effectuée l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de taille

6.3.5.1 Restriction de l'ADN génomique

Les préparations d'ADN génomique sont complètement restreintes par l'endonucléase de restriction appropriée. Les enzymes utilisées ici sont *HindIII* (40 U/ μ l), *EcoRI* (40 U/ μ l) et *SspI* (10 U/ μ l) (Roche).

Mode opératoire

- Prendre 6 μ l d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée
- Ajouter 1.5 μ l d'enzyme concentré (*HindIII* et *EcoRI*), ou 3 μ l d'enzyme non concentré (*SspI*)
- Ajouter 3 μ l de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme
- Mettre à un volume de 30 μ l avec de l'eau distillée stérile
- Incuber une nuit à 37 °C

6.3.5.2 Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreints est réalisée dans un gel d'agarose de 0,8 %. Le marqueur de taille HyperLadder (Bioline) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction.

6.3.5.3 Transfert et immobilisation

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

Mode opératoire

- Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert
- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation
- Découper un morceau de membrane de nylon (Porablot NY membrane) chargée positivement de taille un peu supérieure à celle du gel
- Par un montage de transfert, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 20X overnight. (cfr schéma)
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM.
- Incuber la membrane à 80 °C pendant 120 min et immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

Solutions

- * Solution de dénaturation : - NaCl 1 M
- NaOH 0.5 M
- * Solution de neutralisation : - NaCl 1.5 M
- Tris HCl 0.5 M pH 7.2
- EDTA 1 mM
- * SSC 20X : - NaCl 3 M
- Na₃ citrate 0.3 M

6.3.5.4 Préhybridation

La membrane est immergée dans une solution de préhybridation pendant 30 minutes à 65°C. Ceci permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non-spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau.

Solution de préhybridation :

- Denhard 50X	5 ml
- SSC 20X	12.5 ml
- SDS 10 %	0.5 ml
- ADN de thymus 100 µg / ml	3.3 ml
- H ₂ O	28.7 ml

L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 min. et incubé sur glace.

6.3.5.5 Marquage de la sonde et hybridation

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence de primers aléatoires. Une synthèse d'ADN est initié par la polymérase Klenow, en incorporant des

nucléotides dont le dCTP est marqué radiactivement au P_{32} .

La sonde est réalisée en utilisant le kit Rad prime label system de Invitogen et les $\alpha^{32}P$ dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

Mode opératoire

- Porter environ 25 μ g d'ADN sonde à un volume finale de 10 μ l avec de l'eau stérile
- Faire bouillir pendant 5 min., faire un quick spin et ensuite conserver sur glace
- Ajouter 1 μ l de dATP, dGTP, dTTP et 20 μ l de random primers (solution 2.5x)
- Ajouter 5 μ l de dCTP marqué au P_{32} et ajouter 11 μ l d' H_2O_2 , mélanger
- Ajouter 1 μ l de klenow et faire un quick spin
- Incuber 10 min. à 37 °C

La membrane est incubée avec la sonde dans la solution de préhybridation, pendant une nuit, à 65 °C.

6.3.5.6 Détection et révélation

Après hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et conservé à -20 °C pour être réutilisé. La membrane est lavée deux fois, pendant 10 minutes, avec du SSC 20X SDS 0.1 %.

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette avec un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 10-15 secondes. Quand les bandes sont révélées, le film est rincé dans de l'eau, puis trempé dans une solution de fixation.

E. coli donneuses

B. melitensis receveuses

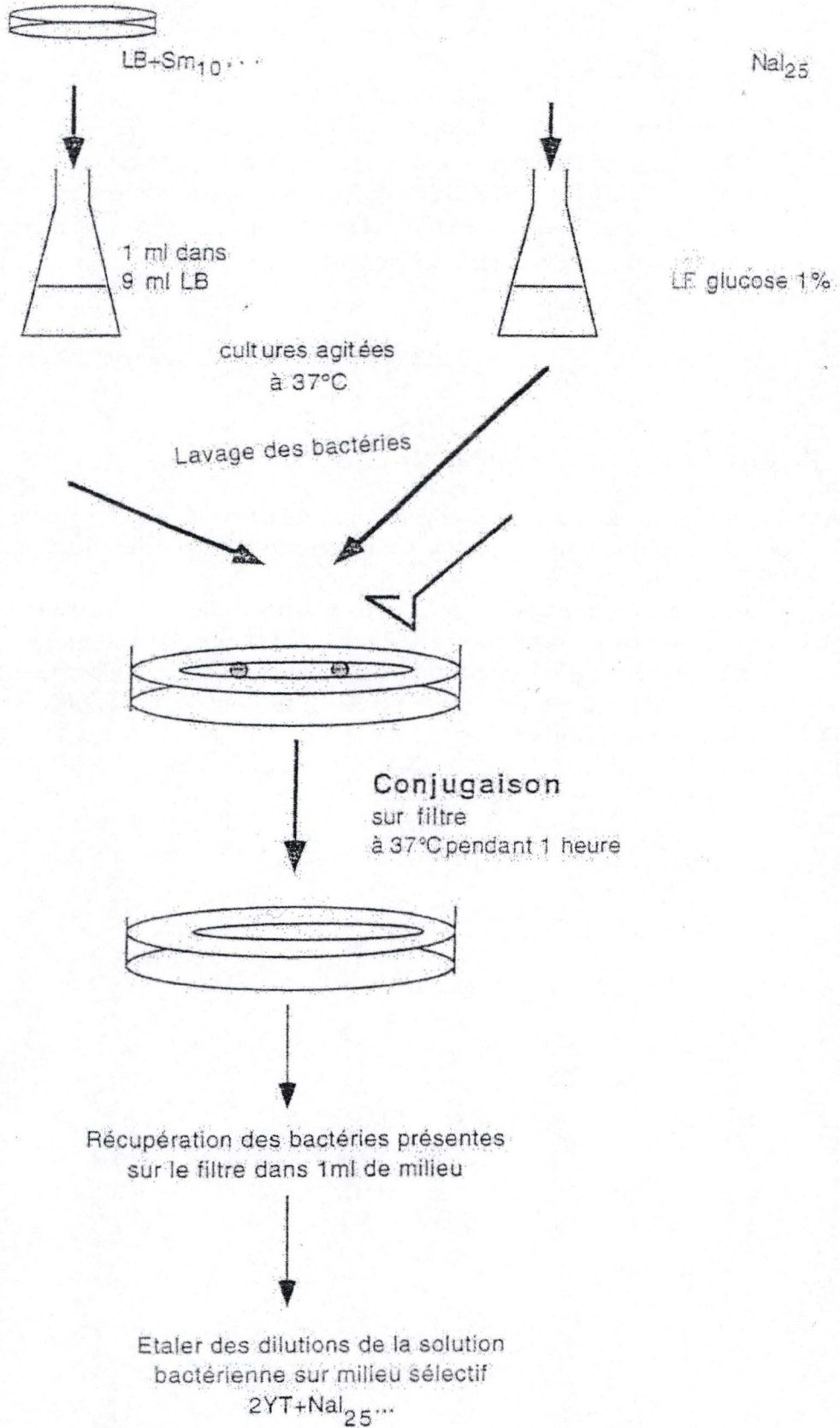


Fig. 33 : Conjugaison

6.4 Conjugaison bactérienne

La conjugaison est un transfert de matériel génétique où la bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries, via un pili sexuel. Le transfert conjugatif commence à un site d'origine de transfert reconnu par la machinerie de transfert sur le plasmide conjugatif.

Le plasmide transféré lors de ce travail est le pSKOriTKan. Les contrôles de résistance antibiotique utilisés sont les suivants : les bactéries donneuses (*E. coli*) sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique à laquelle résiste les *E. coli* donneuses (dans ce cas-ci, la kanamycine) (Fig. 33).

Mode opératoire

- Préparer une préculture d'*E. coli* S17-1 (RP4⁺) donneuses contenant le plasmide à transférer dans du LB + antibiotique, ainsi qu'une culture de *Brucella* receveuse (Nal^R)
- Après une croissance à 37°C durant une nuit, inoculer une culture de *E. coli* dans du LB + antibiotique avec 1/10 de la préculture. Laisser pousser à 37°C quelques heures
- Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotique du milieu de culture en centrifugeant 15 minutes à 4000 rpm et resuspendre dans du milieu sans antibiotique le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ
- Placer un filtre stérile 0,22 µm de 42 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues
- Mélanger et étaler les bactéries sur la totalité du filtre
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C
- Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1 ml de milieu 2YT
- Etaler sur un milieu 2YT sélectif
- Incuber 3-4 jours à 37°C et repiquer les clones obtenus sur milieu 2YT sélectif

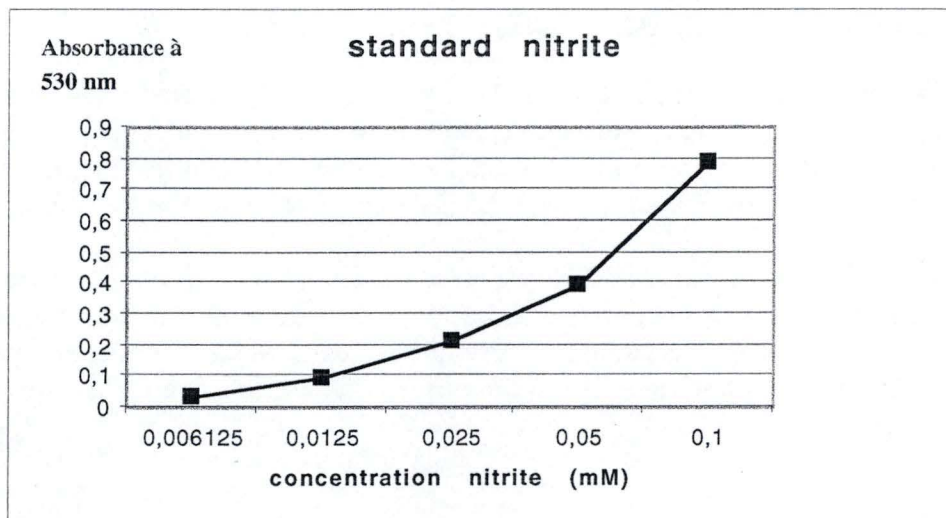


Fig. 34°: Standard nitrite

6.5 Tests de croissance sur milieu minimum

Les tests de croissance in vitro des mutants sont réalisés de la façon suivante :

- Des cultures liquides de chaque mutants à tester et des contrôles de croissance sont lancées dans 5 ml de 2YT avec antibiotique (overnight)
- Les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes à 4000 rpm ; le surnageant est éliminé et les culots bactériens sont resuspendus dans 5 ml de NaCl 0.9 % (ou de PBS 1X)
- La densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre (à 600 nm) et une dilution appropriée dans du NaCl 0.9 % (ou du PBS 1X) est réalisée pour obtenir une DO de 0.4
- Une goutte de 10-20 µl de culture diluée de chaque mutant et contrôle de croissance est déposée sur chacun des milieux à tester (milieu minimum, milieu contrôle 2YT)
- Incuber 10 jours à 37 °C (3-4 jours pour le contrôle positif)

6.6 Test au cristal violet

Cette technique permet de différencier visuellement les colonies bactériennes lisses ou rugueuse (White, 1951). Le cristal violet 1X est versé sur la boîte de milieu 2YT contenant les mutants à tester, la souche sauvage et un mutant rugueux comme contrôles ; et laisser agir 2 minutes. Les bactéries lisses se différencient des rugueuses par un anneau incolore bordant la goutte de bactéries.

6.7 Test d'activité de réduction de nitrate

Le nitrate est réduit en nitrite par la nitrate réductase ; la présence de nitrite peut être mise en évidence par deux réactifs : le naphthylamide et l'acide sulphanilique, qui forment un composé rouge en réagissant avec le nitrite.

Mode opératoire

(d'après (Weber, Fritz *et al.* 2000))

- Des précultures des bactéries à tester sont lancées dans du 2YT liquide et incubée à 37°C durant une nuit.
- 5 ml de 2YT enrichi en nitrate (NaNO₃ 10 mM) sont inoculés avec 1 x 10⁶ bactéries / ml en conditions aérobie et anaérobie, et incubés 72 heures à 37 °C. Les conditions d'anaérobie sont obtenues avec le système anaérobique AnaeroGen (Oxoid) dans une jarre anaérobique de 2.5 litres (Oxoid). Les conditions d'anaérobie sont confirmées par l'utilisation d'un indicateur d'anaérobiose.
- Après 72 heures, 100 µl d'acide sulfanilamique et 100 µl de N,N-diméthyl-1-naphtylamine (api 20 E system de bioMerieux) sont ajoutés à 1 ml de culture et centrifugé à 10 000 rpm pendant 15 min. à température ambiante.
- L'absorbance du surnageant est mesurée au spectrophotomètre à 530 nm et comparée à un standard de nitrite connu (2YT + NaNO₃ 10 mM + Na NO₂).

6.8 Infection en souris

Pour les tests de survie en souris de mutants *Brucella*, des souris BALB/c âgées de 7 semaines sont infectées avec 5×10^5 bactéries et mises en incubation pendant quatre semaines. Ensuite, les souris sont sacrifiées et les rates dans lesquelles se trouvent les bactéries sont récupérées et broyées. Des dilutions successives de broyat de rate sont étalées sur milieu 2 YT solide et après 3-4 jours d'incubation, les bactéries sont comptées.

6.8.1 Mode opératoire

6.8.1.1 Préparation des doses infectantes

- La veille des infections, des cultures des mutants à tester et de la souche parentale sont lancées dans 5 ml de 2YT + (antibiotique) et incubées une nuit à 37 °C.
- Les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 12 minutes à température ambiante.
- Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 5 ml de PBS 1X
- Les DO sont lues au spectrophotomètre à 600 nm, et des dilutions adéquates des cultures sont réalisées pour obtenir une concentration de 5×10^6 bactéries / ml.

6.8.1.2 Infection des souris

- Des seringues stériles de 1 ml sont remplies avec les cultures diluées (jusqu'à 0.6 ml).
- 0.1 ml de culture est injecté à chaque souris (4 souris sont infectées par mutants testés)
- Les souris sont isolées dans une étuve à 25 °C et mises en incubation pendant 4 semaines.

6.8.1.3 Dilutions sériées et comptage des doses infectantes

- Des dilutions successives de chaque culture sont effectuées à partir des doses infectantes.
- 20 µl de chaque dilution sont étalés sur milieu 2YT solide et incubés 3-4 jours à 37 °C.
- Le nombre de colonies (CFU) obtenues pour chaque dilution est dénombré, et le nombre de bactéries de la dose infectante est évalué.

6.8.1.4 Récupération des bactéries et évaluation de la survie en souris

- Après 4 semaines, les souris sont sacrifiées par dislocation de la colonne vertébrale, et les rates sont récupérées.
- Les rates sont broyées dans des sachets en plastique et les broyats sont resuspendus dans 2 ml de PBS triton 1X.
- Des dilutions sériées des broyats de rates sont effectuées, et 20 µl de chaque dilution sont étalés sur milieu 2YT solide et incubés 3-4 jours à 37°C.
- Le nombre de CFU obtenues pour chaque dilution est dénombré, et le nombre de bactéries par rate est évalué.

6.8.2 Solution

- PBS Triton-X 100 : - 50 ml de PBS
- 0.5 g de triton
- 450 ml d'eau distillée

(la solution est autoclavée)

7 Bibliographie

- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Anjum, M. F., J. Green, *et al.* (2000). "YeiL, the third member of the CRP-FNR family in *Escherichia coli*." Microbiology **146 Pt 12**: 3157-70.
- Anthamatten, D., B. Scherb, *et al.* (1992). "Characterization of a fixLJ-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli* fnr and *Rhizobium meliloti* fixK genes." J Bacteriol **174**(7): 2111-20.
- Anthamatten, D., P. Rossi, *et al.* (1998). "*Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels." J Bacteriol **180** (19): 5251-5255.
- Bannan, J. D., M. J. Moran, *et al.* (1993). "Cloning and characterization of *btr*, a *Bordetella pertussis* gene encoding an FNR-like transcriptional regulator." J Bacteriol **175** (22): 7228-7235.
- Bateman, A., E. Birney, *et al.* (2000). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **28**(1): 263-6.
- Bellefontaine, A. F., C. E. Pierreux, *et al.* (2002). "Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha- proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*." Mol Microbiol **43**(4): 945-60.
- Boschiroli, M. L., V. Foulongne, *et al.* (2001). "Brucellosis: a worldwide zoonosis." Curr Opin Microbiol **4**(1): 58-64.
- Contreras, I., C. S. Toro, *et al.* (1997). "*salmonella typhi* mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells." Microbiology **143** : 2665-2672.
- Cotter, P. A. and J. F. Miller (1998). "In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression." Curr Opin Microbiol **1**(1): 17-26.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, *et al.* (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 443-8.

Dorrell, N., P. Guigue-Talet, *et al.* (1999). "Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*." Microb Pathog **27**(1): 1-11.

Dorrell, N., S. Spencer, *et al.* (1998). "Identification, cloning and initial characterisation of FeuPQ in *Brucella suis*: a new sub-family of two-component regulatory systems." FEMS Microbiol Lett **162**(1): 143-50.

Egland, P. G. and C. S. Harwood (1999). "BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member." J Bacteriol **181**(7): 2102-9.

Egland, P. G. and C. S. Harwood (2000). "HbaR, a 4-hydroxybenzoate sensor and FNR-CRP superfamily member, regulates anaerobic 4-hydroxybenzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*." J Bacteriol **182**(1): 100-6.

Fischer (1994). "Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia." Microbiological reviews **58**(3): 352-386.

Fischer, H. M. (1996). "Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes." Trends Microbiol **4**(8): 317-20.

Fischer, H. M., L. Velasco, *et al.* (2001). "One of two hemN genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis." J Bacteriol **183**(4): 1300-11.

Fritz, C., S. Maass, *et al.* (2002) "Dependence of *mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific" Infect Immun **70** (1): 286-291.

Godfroid, F., A. Cloeckert, *et al.* (2000). "Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *brucella melitensis* 16M (wbk)." Res Microbiol **151**(8): 655-68.

Godfroid, F., B. Taminiau, *et al.* (1998). "Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella survival* in mice and in macrophages." Infect Immun **66**(11): 5485-93.

Gutierrez, D., Y. Hernando, *et al.* (1997). "FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae UPM791." J Bacteriol **179**(17): 5264-70.

- Householder, T. C., W. A. Belli, *et al.* (1999) "*cis*- and *trans*-acting elements involved in regulation of *aniA*, the gene encoding the major anaerobically induced outer membrane protein in *Neisseria gonorrhoeae*" J Bacteriol **181** (2): 541-551.
- Khoroshilova, N., H. Beinert, *et al.* (1995). "Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2499-503.
- Kiley, P. J. and H. Beinert (1998). "Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron- sulfur cluster." FEMS Microbiol Rev **22**(5): 341-52.
- Kim, J. A. and J. Mayfield (2000). "Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression." J Bacteriol **182**(19): 5631-3.
- Lengeler, J. W., G. Drews, *et al.* (1999). Gene expression and regulatory mechanisms. Biology of the prokaryotes. New York, Blackwell Science. **5**.
- Lopez, O., C. Morera, *et al.* (2001). "Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in fixNOQP expression and in symbiotic nitrogen fixation." J Bacteriol **183**(24): 6999-7006.
- Lynch, A. S. and E. C. C. Lin (1996). Responses to molecular oxygen. Escherichia coli and Salmonella. F. C. Neidhardt. Washington, ASM Press. **95**.
- Maeda, H., N. Fujita, *et al.* (2000). "Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase." Nucleic Acids Res **28**(18): 3497-503.
- Moore, L. J. and P. J. Kiley (2001). "Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor." J Biol Chem **276**(49): 45744-50.
- Moreno, E. and I. Moriyon (2002). "*Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 1-3.
- Moreno, E., E. Stackebrandt, *et al.* (1990). "*Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria." J Bacteriol **172**(7): 3569-76.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, *et al.* (1990). Regulation of gene expression: multigene systems and global regulation. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.

- O'Callaghan, D. and A. MacMillan (2001). *Brucella*. Animal and Ectoparasitic infections. A. Press. 94.
- Page, K. M. and M. L. Guerinot (1995). "Oxygen control of the *Bradyrhizobium japonicum* hemA gene." J Bacteriol **177**(14): 3979-84.
- Perez-Rueda, E. and J. Collado-Vides (2000). "The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12." Nucleic Acids Res **28**(8): 1838-47.
- Pessi, G. and D. Haas (2000). "Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*". J Bacteriol **182** (24): 6940-6949.
- Pizzaro-Cerdà, J., E. Moreno, *et al.* (1999). *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. Advances in cell and molecular biology of membranes and organelles. J. P. Inc. **6**: 201-232.
- Renzoni, A., A. Klarsfeld, *et al.* (1997). "Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive." Infect Immun **65**(4): 1515-8.
- Reyrat (1993). "Oxygen-regulated in vitro transcription of *Rhizobium meliloti* *nifA* and *fixK* genes." Journal of Bacteriology **175**(21): 6867-6872.
- Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, *et al.* (1997). "A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*." J Bacteriol **179**(5): 1533-40.
- Rodolfo (1999). "Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts." Microbes and Infection: 1211-1219.
- Sabaty, M., C. Schwintner, *et al.* (1999). "Nitrite and nitrous oxide reductase regulation by nitrogen oxides in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans IL106." J Bacteriol **181**(19): 6028-32.
- Saier, M. H., T. M. Ramseier, *et al.* (1996). Regulation of carbon utilization. *Escherichia coli* and *Salmonella*. F. C. Neidhardt. Washington, ASM Press. 85.
- Schmiel, D. H., G. M. Young, *et al.* (2000). "The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon." J Bacteriol **182**(8): 2314-20.

- Schultz, J., R. R. Copley, *et al.* (2000). "SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains." Nucleic Acids Res **28**(1): 231-4.
- Sheehan, B., A. Klarsfeld, *et al.* (1996). "A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence." Mol Microbiol **20**(4): 785-97.
- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, *et al.* (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, *et al.* (2000). "Two-component signal transduction." Annu Rev Biochem **69**: 183-215.
- Tosques, I. E., J. Shi, *et al.* (1996). "Cloning and characterization of nnrR, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3." J Bacteriol **178**(16): 4958-64.
- Van Spanning, R. J., A. P. De Boer, *et al.* (1997). "FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation." Mol Microbiol **23**(5): 893-907.
- Vicente, M., K. F. Chater, *et al.* (1999). "Bacterial transcription factors involved in global regulation." Mol Microbiol **33**(1): 8-17.
- Vollack, K. U., E. Hartig, *et al.* (1999). "Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes." Mol Microbiol **31**(6): 1681-94.
- Wang, M., N. Qureshi, *et al.* (2001). "High level of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages." Microb Pathog **31**: 221-230.
- Weber, I., C. Fritz, *et al.* (2000). "Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice." Mol Microbiol **35**(5): 1017-25.
- Wheeler, D. L., D. M. Church, *et al.* (2001). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic Acids Res **29**(1): 11-6.

Wood, N. J., T. Alizadeh, *et al.* (2001). "Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR." J Bacteriol **183**(12): 3606-13.

Wood, G. E., N. Khelef, *et al.* (1998) "Identification of Btr-regulated genes using a titration assay. Search for a role for this transcriptional regulator in the growth and virulence of *Bordetella pertussis*." Gene **209**: 51-58

Young, E. J. (1995). "An overview of human brucellosis." Clin Infect Dis **21**(2): 283-9; quiz 290.

Zeilstra-Ryalls, J. H., K. Gabbert, *et al.* (1997). "Analysis of the *fnrL* gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol **179**(23): 7264-73.

Zeilstra-Ryalls, J. H. and S. Kaplan (1995). "Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene." J Bacteriol **177**(22): 6422-31.

Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 533-616.

Annexe 1

Fonction des gènes se trouvant dans les environnements chromosomiques des gènes *crp4*, *crp5* et *crp6* :

1.) Voisinage de *crp6*

- gène encodant la protéine d'extrusion du nitrite (NO_2^-):
 - homologue : *narK* de *E. coli*
 - fonction présumée de la protéine : excrétion du nitrite produit par la nitrate réductase.

- opéron encodant les sous-unités de la nitrate réductase :
 - homologue : *narGHJI* de *E. coli*
 - fonction présumée de la protéine : complexe enzymatique formant la nitrate réductase qui permet à la bactérie d'utiliser le nitrate (NO_3^-) comme accepteur final d'électron durant la croissance anaérobie.
 - sous-unité α : site de réduction du nitrate
 - sous-unité β : unité de transfert d'électron contenant des centres 4Fe-4S. Transfère les électrons de la sous-unité γ au cofacteur de la sous-unité α
 - sous-unité δ : protéine nécessaire pour l'assemblage de la nitrate réductase
 - sous-unité γ : protéine ancrée en membrane, comprenant un groupement hème. Transfert les électrons à la sous-unité β

2.) Voisinage de *crp4*

- gène encodant la pseudoazurine :
 - homologue : gène encodant la pseudoazurine chez *A. faecalis*
 - fonction présumée de la protéine : donneur d'électrons pour la nitrite réductase. Nécessaire pour inactiver la nitrite réductase en présence d'oxygène.

- *nosX* :
 - homologue : *nosX* de *S. meliloti*
 - fonction présumée de la protéine : implication dans la réduction de l'oxyde nitreux (N_2O). Fonction précise inconnue.

- *nosL* :
 - homologue : *nosL* de *S. meliloti*
 - fonction présumée de la protéine : implication dans la réduction de l'oxyde nitreux. Fonction précise inconnue.

- *nosY* :
 - homologue : *nosY* de *P. stutzeri*
 - fonction présumée de la protéine : protéine de la membrane interne impliquée dans le processing du cuivre pour l'oxyde nitreux réductase.

- *nosF* :

- homologue : *nosF* de *P. stutzeri*
- fonction présumée de la protéine : liaison à l'ATP/GTP, et insertion du cuivre dans l'oxyde nitreux réductase.

- gène encodant la protéine périplasmique liant le cuivre :

- homologue : *nosD* de *P. stutzeri*
- fonction présumée de la protéine : implication dans le processing et le transport du cuivre, et insertion du cuivre dans l'oxyde nitreux réductase.

- gène encodant l'oxyde nitreux réductase :

- homologue : *nosZ* de *S. meliloti*
- fonction présumée de la protéine : réduction de l'oxyde nitreux impliquée dans un système respiratoire anaérobie.

- *nosR* :

- homologue : *nosR* de *P. aeruginosa*
- fonction présumée de la protéine : activateur transcriptionnel du gène encodant l'oxyde nitreux réductase.

3.) Voisinage de *crp5*

- *nirV* :

- homologue : *Pseudomonas* sp. G-179
- fonction présumée de la protéine : implication dans la réduction de nitrite, fonction précise inconnue.

- gène encodant la nitrite réductase contenant du cuivre :

- homologue : gène encodant la nitrite réductase chez *A. faecalis*
- fonction présumée de la protéine : réduction du nitrite impliquée dans un système respiratoire anaérobie.

- *norD* :

- homologue : gène *norD* de *P. aeruginosa*
- fonction présumée de la protéine : implication dans le processus de respiration anaérobie transformant le nitrate en azote moléculaire (dénitrification) Fonction précise inconnue.

- *norQ* :

- homologue : gène *norQ* de *P. denitrificans*
- fonction présumée de la protéine : implication dans la réduction de l'oxyde nitrique (NO). Fonction précise inconnue.

- gène encodant les sous-unités de l'oxyde nitrique réductase :

- homologues : *norB* et *norC* de *P. aeruginosa*
- fonction présumée des protéines : réduction de l'oxyde nitrique impliquée dans un système de réplication anaérobie.

- *norF* :

- homologue : *norF* de *A. faecalis*
- fonction présumée de la protéine : inconnue.

- *norE* :

- homologue : *norE* de *S. meliloti*
- fonction présumée de la protéine : implication dans la réduction de l'oxyde nitrique. Fonction précise inconnue.