



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation de protéines impliquées dans le contrôle post-traductionnel de CTRA chez *Brucella abortus*

Ferrari, Christophe

Award date:
2003

[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

**CARACTÉRISATION DE PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE
CONTRÔLE POST-TRADUCTIONNEL DE CTRA CHEZ *BRUCELLA*
*ABORTUS***

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

Christophe FERRARI
Août 2003

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>

Caractérisation de protéines impliquées dans le contrôle post-traductionnel de CtrA chez *Brucella abortus*

FERRARI Christophe

Résumé

CtrA est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des régulateurs de réponse des systèmes de transduction du signal à deux composants. Il exerce un contrôle direct ou indirect sur 25% des gènes régulés au cours du cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus*. Ce contrôle lui permet de réguler les processus de réplication et de méthylation de l'ADN, ainsi que la division cellulaire et la biogenèse du flagelle. Des gènes homologues de *ctrA* ont été caractérisés chez la plupart des α -protéobactéries, notamment le genre *Brucella* qui regroupe les agents pathogènes intracellulaires facultatifs responsables de la brucellose. Il a été montré chez *C. crescentus* que CtrA est contrôlé au moyen des processus de protéolyse et de phosphorylation. Des homologues aux Histidine Protéines Kinases et Régulateurs de Réponse impliqués dans son activation chez *C. crescentus* ont été détectés chez *Brucella*. Nous avons pu montrer que certaines des séquences homologues identifiées, en l'occurrence *pdhS*, *divK* et *cckA* sont exprimées par *Brucella* au cours d'une culture en milieu bactériologique. De plus, la caractérisation des phénotypes de souches de *Brucella* surexprimant les différentes séquences encodant les HPK et RR hypothétiques ainsi que la séquence encodant CtrA nous a permis de montrer qu'elles sont probablement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ce qui est en accord avec l'hypothèse suivant laquelle les protéines exprimées interviendraient dans l'activation de CtrA chez *Brucella*.

Mémoire de licence en Science biologiques
Août 2003

Promoteur: J.J. Letesson

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur J.-J. Letesson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (merci chef!).

Je remercie madame Bellefontaine A.F. et messieurs Arnould Th., Devos P. et Fretin D. pour leur lecture critique de ce mémoire.

En arrivant ici j'ai découvert un monde nouveau, un petit coin des facs où des virtuoses de la paillasse jouent avec les éléments d'un système complexe (dans l'esprit du mémorant, il s'agit de l'ordinateur épileptique qu'il utilise pour rédiger) qu'ils tripotent à loisir pour en percer les secrets. Une passion qui se partage. C'est gai d'avoir les mains hors des poches !

À tous au labo, Stéphanie, Garçon, Amé, Anne, Valérie, Marie, petite Marie, Rose-May, Zette, Etienne, Sandrine, Calou, Xavier, Chantal, Nico, les voisins de la GÉMO et surtout à mon tuteur Régis, pour votre patience, vos conseils, les discussions, la bonne humeur, pour tout ça, mais plus encore pour votre énergie et votre enthousiasme, un énoooooorme merci!

Et puis aux copains mémorants Del, Jon, Muriel, Fred, Céline, Matchoum, Vio et el Diego, les stagiaires, ainsi qu'à tous les autres baroudeurs de seconde licence, un grand merci, à bientôt (le monde est petit, non !? ;-).

Merci à Gonzague, Thierry, Fabrice, Olivier, Géraldine, Nico, Denis, Didier, JuJu, J-F, David, Damien, Flo, Ben, Bruno, Daniel, François, Gaby, Vimal, Eric,... pour votre amitié et pour tout ce qu'on a vécu d'extraordinaire (les délires "ciel étoilé", les voyages dans le temps, les bagarres de polochons, les expéditions...oh oui merci!)

Merci à tous les bios FUNDP, ceux qui sont restés, ceux qui sont partis...

Enfin, j'aimerais remercier mes parents, qui m'ont permis d'étudier à l'université, un cadeau inestimable.

Abbréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Di-phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CDS	Séquence codante
D	Aspartate
dNTP	déoxyribonucléotide quelconque
DO ^x	Densité optique à <i>x</i> nanomètre
F	Phénylalanine
G	Glycine
H	Histidine
HPK	Histidine Protéine Kinase
HPt	Histidine phosphotransférase
kDa	kiloDalton
N	Asparagine, base azotée quelconque quand dans une séquence d'ADN ou azote
P1	Promoteur P1
P2	Promoteur P2
PAGE	Électrophorèse en Gel de Polyacrylamide
pCDS	Séquence Codante prédite
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	rotation par minute
RR	Régulateur de Réponse
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium
T _m	Température de melting
Y	Tyrosine

Table des matières

I. Introduction	1
I.1. Généralités	1
I.1.1. Paradigme des voies de transduction du signal à deux composants	2
I.1.1.A. Mécanisme de la transduction du signal	2
I.1.1.A.1. Exemple de système à deux composants classique	5
I.1.1.A.2. Exemple d'un système à plusieurs composants	6
I.1.2. <i>Brucella</i>	7
I.2. CtrA chez les α-protéobactéries	8
I.2.1. Rôle de CtrA chez <i>Caulobacter crescentus</i>	9
I.2.1.A. Contrôle du taux d'activité de CtrA chez <i>caulobacter crescentus</i>	10
I.2.1.A.1. Le contrôle post-traductionnel de CtrA chez <i>Caulobacter crescentus</i>	10
I.2.1.A.2. Contrôle du taux d'activité de CtrA via sa protéolyse chez <i>Caulobacter crescentus</i>	11
I.2.2. CtrA chez <i>Brucella</i>	14
II. Objectif du travail	16
III. Résultats et discussion	17
III.1 Validation des outils disponibles (anticorps et plasmides)	17
III.1.1. Description des plasmides de surexpression et des anticorps	18
III.1.1.A. Les plasmides de surexpression	18
III.1.1.B. Les anticorps polyclonaux	18
III.1.2. Validation proprement dite	19
III.2. Mise en évidence de la production des protéines d'intérêt chez <i>Brucella</i>	21
III.3. Phénotype des mutants de surexpression	22
III.3.1. Morphotypes aberrants	23
III.3.1.A. Observation des mutants en microscopie optique après coloration de Gram	23
III.3.1.B. Observation des mutants en microscopie électronique à balayage (MEB)	25
III.3.1.B.1. Lien entre le phénotype des mutants et la perturbation du cycle cellulaire	25
III.4. Vérification de la surexpression des protéines par les souches de <i>Brucella</i> pBBR1-<i>cds</i>.	29
IV. Conclusions et perspectives	32
V. Matériels et méthodes	35
V.1. Matériels	35
V.1.1. Souches bactériennes et plasmides	35
V.1.1.A. Souches bactériennes	35
E.coli DH10B	35
<i>Brucella melitensis</i>	35
<i>B. abortus</i>	35
V.1.1.A. Plasmide	35
PBBR1mcs1	36
V.1.2. Antibiotiques et milieux de culture	36
V.1.2.A. Antibiotiques	36
Acide nalidixique (Nal)	36
Chloremphénicol (Cm)	36
V.1.2.B. Milieux de culture	36
Milieu riche pour <i>E. coli</i> :	36
Milieu LB (Luria Bertani) :	36
Milieux riches pour <i>Brucella</i>	37
Le milieu 2YT	37

V.2. Méthodes	37
V.2.1. Techniques relatives à l'ADN	37
V.2.1.A. Transformation bactérienne	37
Transformation par choc thermique	37
Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes :	37
Transformations de bactéries CaCl ₂ compétentes	38
V.2.1.B. Amplification d'ADN par PCR	38
V.2.1.C. Extraction d'ADN plasmidique	39
Tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez E. coli	39
V.2.2. Techniques relatives aux protéines	40
V.2.2.A. Analyse de l'expression d'une protéine par western blotting	40
Préparation d'extraits protéiques totaux	40
Disruption de cellules :	40
Dosage protéique	40
Western blotting (immunoblotting)	42
Électrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS PAGE)	42
Électrotransfert sur membrane de nitrocellulose	44
Immunodétection	45
V.2.3. Techniques relatives à la caractérisation phénotypique des bactéries	48
V.2.3.A Microscopie optique	48
Classique	48
Coloration de Gram	48
V.2.3.B. Microscopie électronique	48
Microscopie Électronique à Balayage	48
Préparation des échantillons	48

VI. Bibliographie	50
--------------------------	-----------

VI. Table des matières

I.Introduction	3
I.1. Généralités	3
I.1.1. Paradigme des voies de transduction du signal à deux composants	4
I.1.1.A. Mécanisme de la transduction du signal	4
I.1.1.A.1. Exemple de système à deux composants classique	8
I.1.1.A.2. Exemple d'un système à plusieurs composants	9
I.1.2. <i>Brucella</i>	10
I.2. CtrA chez les α-protéobactéries	11
I.2.1. Rôle de CtrA chez <i>Caulobacter crescentus</i>	12
I.2.1.A. Contrôle du taux d'activité de CtrA chez <i>Caulobacter crescentus</i>	13
I.2.1.A.1. Le contrôle post-traductionnel de CtrA chez <i>Caulobacter crescentus</i>	13
I.2.1.A.2. Contrôle du taux d'activité de CtrA via sa protéolyse chez <i>Caulobacter crescentus</i>	16
I.2.2. CtrA chez <i>Brucella</i>	18
II. Objectif du travail	21
III. Résultats et discussion	22
III.1 Validation des outils disponibles (anticorps et plasmides)	22
III.1.1. Description des plasmides de surexpression et des anticorps	23
III.1.1.A. Les plasmides de surexpression	23
III.1.1.B. Les anticorps polyclonaux	23
III.1.2. Validation proprement dite	25
III.2.Mise en évidence de la production des protéines d'intérêt chez <i>Brucella</i>	28
III.3.Phénotype des mutants de surexpression	29
III.3.1. Morphotypes aberrants	30
III.3.1.A.Observation des mutants en microscopie optique après coloration de Gram	30
III.3.1.B. Observation des mutants en microscopie électronique à balayage (MEB)	32
III.3.1.B.1. Lien entre le phénotype des mutants et la perturbation du cycle cellulaire	32
III.4.Vérification de la surexpression des protéines par les souches de <i>Brucella</i> pBBR1-<i>cds</i>. ..	36
IV. Conclusions et perspectives	39
V. Matériels et méthodes	42
V.1. Matériels	42
V.1.1. Souches bactériennes et plasmides	42
V.1.1.A. Souches bactériennes	42
<i>E.coli</i> DH10B	42
<i>Brucella melitensis</i>	42
<i>B. abortus</i>	42
V.1.1.B. Plasmide	42
PBBR1 <i>mcsI</i>	42
V.1.2. Antibiotiques et milieux de culture	43
V.1.2.A. Antibiotiques	43
Acide nalidixique (Nal) : 25 μ g / ml	43
Chloremphténicol (Cm) : 20 μ g / ml	43
V.1.2.B. Milieux de culture	43
Milieu riche pour <i>E. coli</i> :	43
Milieu LB (Luria Bertani) :	43
Milieu riche pour <i>Brucella</i>	44
Le milieu 2YT	44
V.2. Méthodes	44

V.2.1. Techniques relatives à l'ADN.....	44
V.2.1.A. Transformation bactérienne.....	44
<i>Transformation par choc thermique</i>	44
Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes :	44
Transformations de bactéries CaCl ₂ compétentes.....	45
V.2.1.B. Amplification d'ADN par PCR.....	45
V.2.1.C. Extraction d'ADN plasmidique.....	46
<i>Tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez E. coli</i>	46
V.2.2. Techniques relatives aux protéines	47
V.2.2.A. Analyse de l'expression d'une protéine par western blotting.....	47
<i>Préparation d'extraits protéiques totaux</i>	47
Disruption de cellules :.....	47
Dosage protéique	47
<i>Western blotting (immunoblotting)</i>	49
Électrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS PAGE)	49
Électrotransfert sur membrane de nitrocellulose	51
<u>Immunodétection</u>	52
V.2.3. Techniques relatives à la caractérisation phénotypique des bactéries	55
V.2.3.A Microscopie optique.....	55
<i>Classique</i>	55
Coloration de Gram.....	55
V.2.3.B. Microscopie électronique	55
<i>Microscopie Électronique à Balayage</i>	55
Préparation des échantillons.....	55
VI. Bibliographie	57

I.Introduction

I.1. Généralités

CtrA (Cell cycle transcriptional regulator A) est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des systèmes à deux composants ¹. On le trouve chez les α -protéobactéries parmi 6 espèces au moins : *Caulobacter crescentus* ¹, *Rickettsia prowazekii* (où il se nomme CzcR) ^{2,3}, *Rhodobacter capsulatus* ¹, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* ^{4,4}, et les bactéries du genre *Brucella* ⁵.

Ce système est particulièrement bien étudié chez *Caulobacter crescentus*. Chez cette espèce, CtrA intervient dans la synchronisation des événements liés à la division cellulaire par exemple le contrôle des processus de septation, de méthylation et de réplication de l'ADN ¹ ainsi que la biogenèse du flagelle et des pili.

En tant que régulateur central impliqué dans le contrôle de processus cellulaires importants, CtrA voit son activité et sa présence régulées à différents niveaux. Tout d'abord, l'expression du gène *ctrA* est régulée au cours du cycle cellulaire ⁶. Ensuite, la protéine CtrA est activée par phosphorylation ^{1,7}. Au moins une voie de transduction du signal médié par phosphotransfert abouti à son activation.

Enfin, la machinerie de protéolyse ClpX/ClpP dépendante engendre la dégradation de CtrA à des moments précis du cycle cellulaire ^{8,9,10}.

La première partie de cette introduction définit les voies de transduction du signal à deux composants et détaille ensuite leur mécanisme, ce qui amène à la considération des systèmes à deux composants classiques et des systèmes à plusieurs composants. Les bactéries du genre *Brucella* y sont enfin brièvement présentées.

La seconde partie de l'introduction traite du rôle de CtrA et des mécanismes qui gouvernent son taux d'activité chez les α -protéobactéries *Caulobacter crescentus* et *Brucella abortus*. Cette partie se termine avec les voies de contrôle post-traductionnel hypothétiques de CtrA chez *Brucella*.

I.1.1. Paradigme des voies de transduction du signal à deux composants

Les systèmes de transduction du signal permettent aux cellules de véhiculer l'information que représente un stimulus, qu'il soit environnemental ou interne, depuis le senseur qui l'a perçu jusqu'à un effecteur. Malgré la grande diversité de stimuli et de réponses, il existe un nombre relativement limité de stratégies moléculaires pour véhiculer l'information.

La phosphorylation de protéines est l'une de ces stratégies et c'est sur elle que reposent les voies de transduction du signal développées ici : les voies de transduction du signal à deux composants classique et ses variantes tels que les phosphorelais. Les systèmes de transduction du signal médiés par le transfert d'un groupement phosphate permettent aux cellules de réagir à des stimuli environnementaux ou internes en développant des réponses adaptatives spécifiques. Ces systèmes comportent le plus souvent deux acteurs : un senseur (appelé HPK¹), capable de détecter le stimulus et un effecteur (appelé RR²), par exemple un facteur de transcription qui, après activation, permet à la cellule de répondre de manière adaptée au signal perçu^{11, 12, 13, 14, 15}. Ainsi, la transduction du signal permet de convertir la reconnaissance d'un stimulus en une régulation transcriptionnelle¹¹.

Les systèmes de transduction du signal au sens large sont prépondérants chez les bactéries. Ils sont impliqués notamment dans la régulation de processus cellulaires variés tels que la chimotaxie, l'osmorégulation, la progression dans le cycle cellulaire, la sporulation, etc^{12, 16}.

I.1.1.A. Mécanisme de la transduction du signal

Le mécanisme de la transduction du signal médié par ce système est basé sur une réaction de phosphotransfert entre le résidu histidine d'une HPK et le résidu aspartate d'un RR. L'HPK est une protéine homodimérique qui dispose d'un domaine senseur aminoterminal, le plus souvent ancré en membrane et d'un domaine autokinase carboxyterminal cytoplasmique. Ce dernier comporte deux sous-domaines : un domaine de dimérisation qui comporte la boîte conservée H et un domaine catalytique comprenant les boîtes conservées N, G1, F et G2 impliquées dans la liaison de l'ATP^{14, 15}. Après perception d'un signal spécifique, le domaine senseur induit la dimérisation de l'HPK ainsi que l'activation du domaine autokinase¹¹. Après

¹ Histidine Protein Kinase

² Response Regulator

activation, le domaine autokinase catalyse une réaction de transfert de phosphate entre une molécule d'ATP et un résidu Histidine du domaine de dimérisation. Cette autophosphorylation s'effectue en trans puisqu'une sous-unité du dimère phosphoryle le résidu histidine du motif H de l'autre sous-unité (**figure 1 A**).

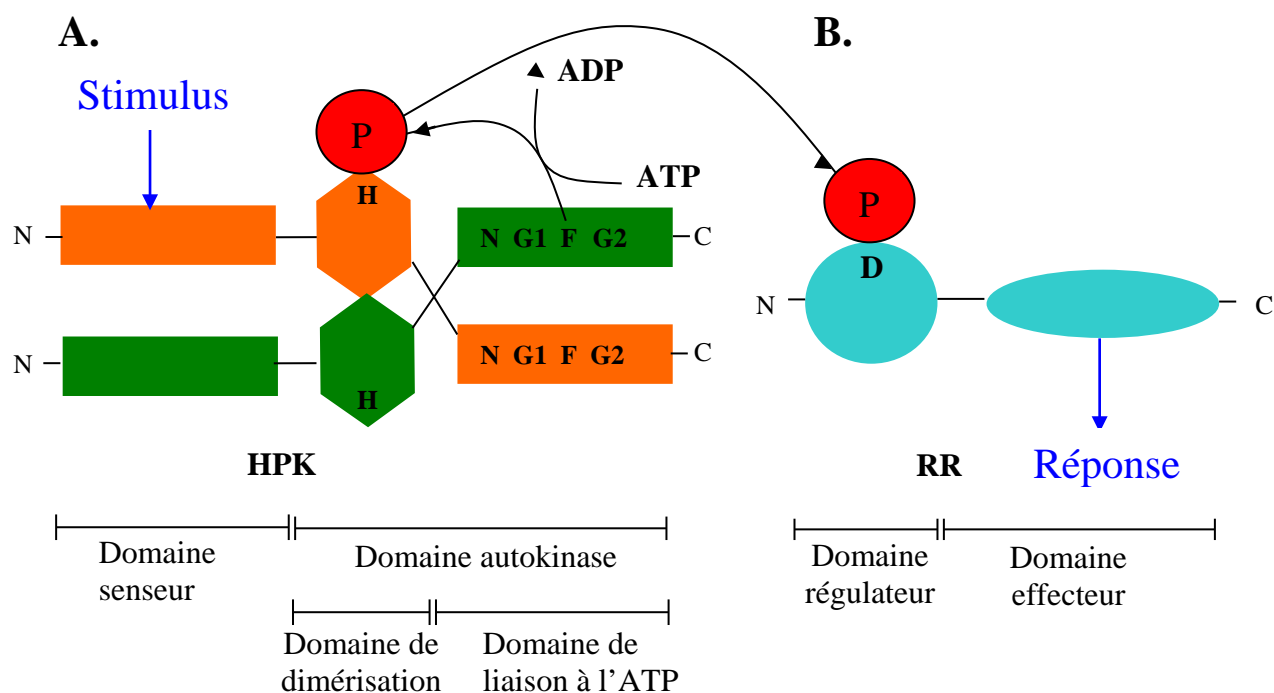


Figure 1. Le système de transduction du signal classique : acteurs et mécanisme. **A.** Autophosphorylation de l'HPK après perception d'un stimulus. **B.** Transfert du groupement phosphate au régulateur de réponse.

Le régulateur de réponse est une protéine qui comporte un domaine régulateur et un domaine effecteur (**figure 1 B**). Le RR catalyse le transfert du groupe phosphate de l'HPK à un résidu aspartate spécifique de son domaine régulateur (**figure 2**)^{11, 13}.

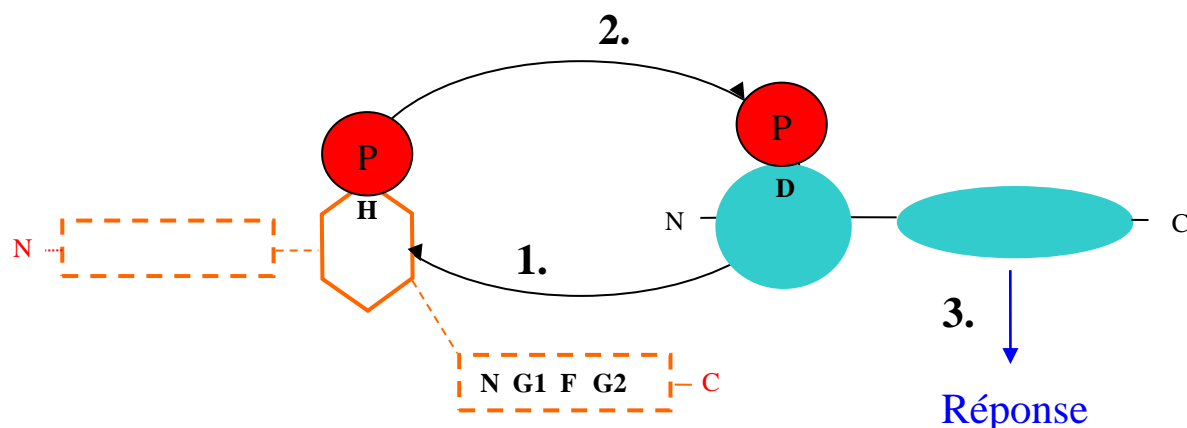


Figure 2. Transfert du groupement phosphate au RR. **1.** Le régulateur de réponse entre en contact avec l'HPK et **2.** catalyse le transfert du groupement phosphate sur son résidu aspartate depuis le résidu histidine de l'HPK. **3.** Ce transfert induit l'activation du RR qui via son domaine effecteur va réguler une réponse spécifique.

La phosphorylation du résidu aspartate, permet l'activation du domaine effecteur qui va réguler une réponse spécifique ¹¹ (**figure 1 B**). Le domaine régulateur du RR catalyse ensuite sa propre déphosphorylation ¹⁵. Ainsi, l'état phosphorylé du RR a un temps de demi-vie variable qui dépend d'une part de son activité autophosphatase, et d'autre part de la présence de phosphatases auxiliaires ou de protéines qui augmentent l'activité autophosphatase de son domaine régulateur.

Le système de transduction du signal classique est constitué d'une HPK et d'un RR. Les systèmes à plusieurs composants comportent des domaines régulateurs supplémentaires ainsi qu'un troisième type de domaine appelé HPt, ces nouveaux éléments rendent possible l'accomplissement de plusieurs transferts de phosphate.

Le domaine HPt présente un court motif consensus qui comporte une histidine invariante permettant le transfert du groupe phosphoryl d'un domaine régulateur à un autre, il n'exerce aucune activité kinase ni phosphatase ¹⁵. Les domaines régulateurs additifs sont quant à eux phosphorylés au niveau d'un résidu aspartate et permettent le transfert de groupe phosphoryl du résidu histidine d'une HPK à celui d'une HPt.

L'avantage du système à plusieurs composants sur le système classique est qu'il peut être contrôlé plus finement, des phosphatases peuvent par exemple intervenir et déphosphoryler spécifiquement un domaine intermédiaire de la chaîne et ainsi empêcher l'accomplissement du phosphorelais.

Les éléments du système à plusieurs composants peuvent s'associer suivant diverses modalités et il en résulte des protéines hybrides qui portent le nom d'HPKh (pour histidine protéine kinase hybride). La structure de ces protéines résulte de la fusion de domaines régulateurs et de domaines comportant une boîte H. La réalisation de trois transferts de phosphate (H1→D1→H2→D2) requiert 4 domaines : deux domaines régulateurs et deux domaines disposant des boîtes H ; en vertu de leurs modalités d'association, ces domaines peuvent s'organiser suivant 8 combinaisons, pour former 8 phosphorelais différents (**figure 3**).

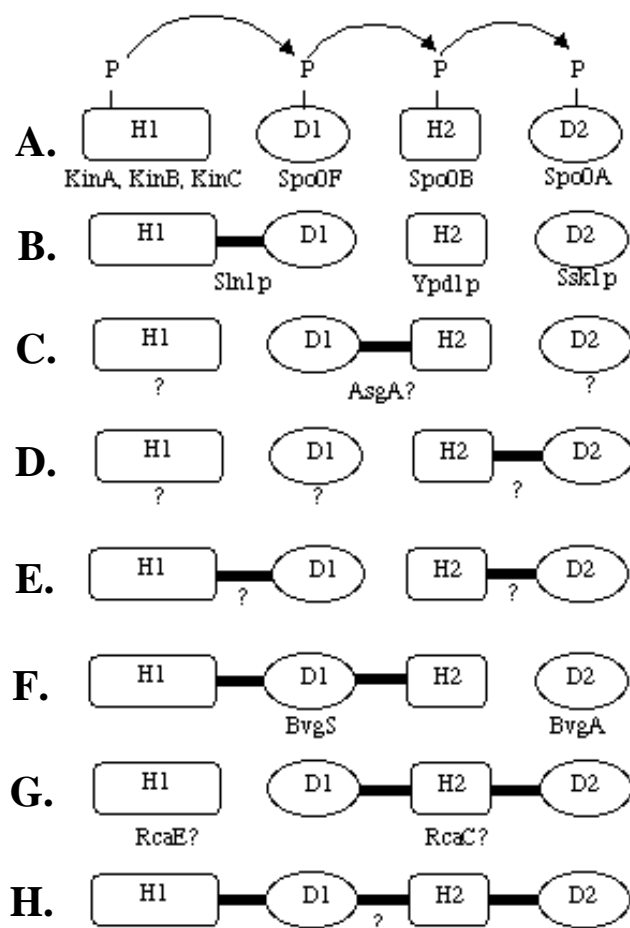


Figure 3. De A à H, représentation schématique des 8 combinaisons possibles en théorie pour réaliser 3 transferts de phosphate suivant la séquence H1→D1→H2→D2. Les systèmes naturels existants sont nommés et les points d'interrogation indiquent les formes encore non observées ou bien les protéines encore insuffisamment caractérisées.

I.1.1.A.1. Exemple de système à deux composants classique

Le modèle classique des systèmes à deux composants est composé d'une HPK et d'un RR qui médient un phosphotransfert en une étape (H1→D1). Le fonctionnement de ce système est illustré ici par le modèle EnvZ-OmpR (**figure 4**).

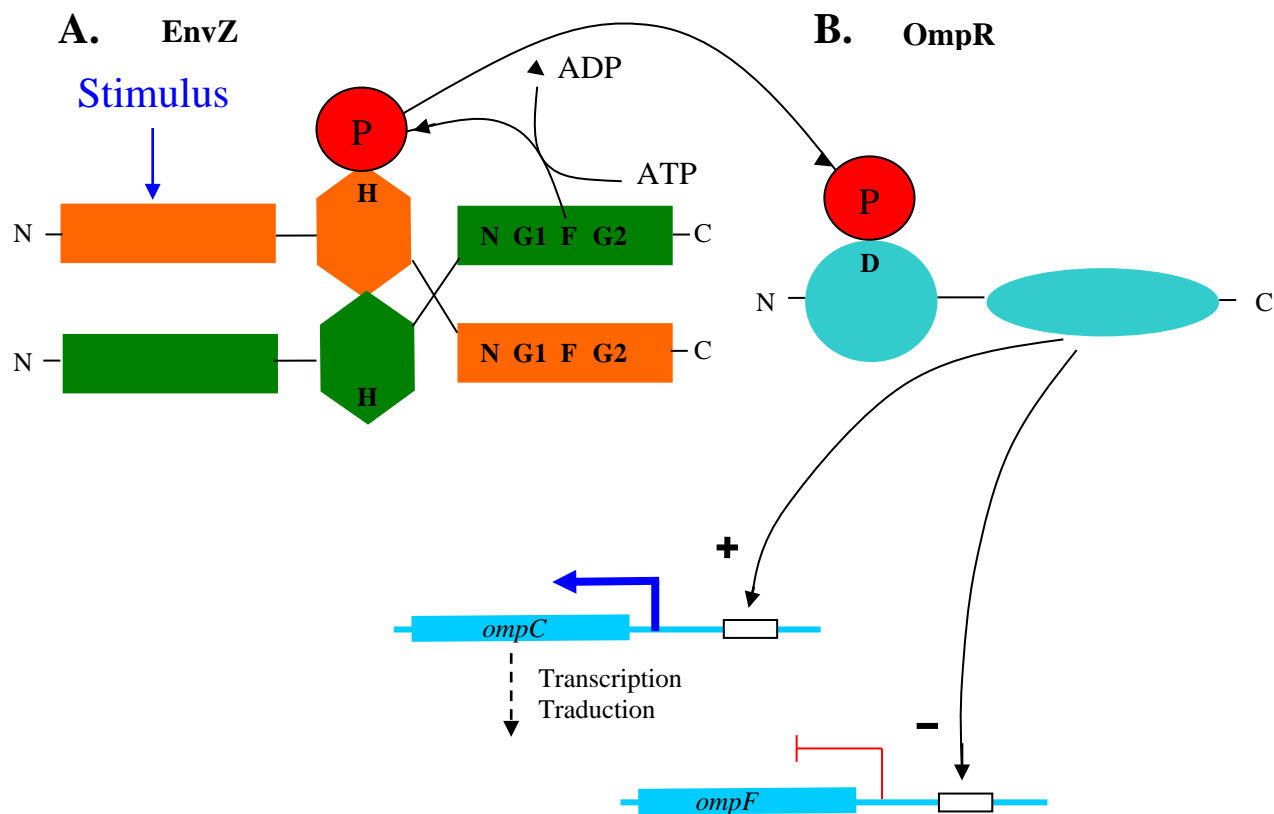


Figure 4. Exemple de système de transduction du signal classique : le modèle EnvZ/OmpR. **A.** Autophosphorylation de l'HPK EnvZ après perception d'un stimulus. **B.** Transfert du groupement phosphate au RR OmpR. **C.** OmpR active la transcription du gène *ompC* et inhibe la transcription de *ompF*.

EnvZ est un osmosenseur et le couple EnvZ-OmpR intervient dans la régulation de l'expression des porines OmpF et OmpC qui permettent à *E. coli* de s'adapter aux modifications d'osmolarité du milieu. Si l'osmolarité du milieu augmente, le rapport OmpC/OmpF augmente. Cette variation s'explique par le fait que les pores formés par les porines OmpC sont significativement moins perméables que ceux formés par les porines OmpF. Dès lors, l'expression préférentielle d'*ompC* en cas d'osmolarité élevée du milieu permet de diminuer la perméabilité membranaire ¹⁷.

Lorsque le domaine senseur N-terminal de l'HPK EnvZ perçoit une hausse de l'osmolarité du milieu, EnvZ dimérise et s'autophosphoryle. Puis le régulateur de réponse OmpR catalyse le

transfert du groupement phosphate au résidu aspartate (D) de son domaine régulateur. Une fois phosphorylé, OmpR peut activer l'expression de *ompC* et réprimer l'expression de *ompF*¹⁶.

I.1.1.A.2. Exemple d'un système à plusieurs composants

Comme nous l'avons déjà expliqué plus haut, ce système est caractérisé par un relais de groupe phosphoryl multi-étapes où alternent plusieurs résidus histidine et aspartate et où sont impliqués des domaines receveurs et HPT supplémentaires, ainsi que, dans certains cas, des HPK's hybrides^{13, 11, 15}.

Un système à plusieurs composants contrôle la sporulation chez *Bacillus subtilis*. Dans ce système, quatre éléments interviennent dans le transfert du groupement phosphate : une HPK via ses domaines senseur et autokinase, un domaine receveur indépendant, une HPT, et le RR via son domaine receveur (**figure 5**)¹⁸.

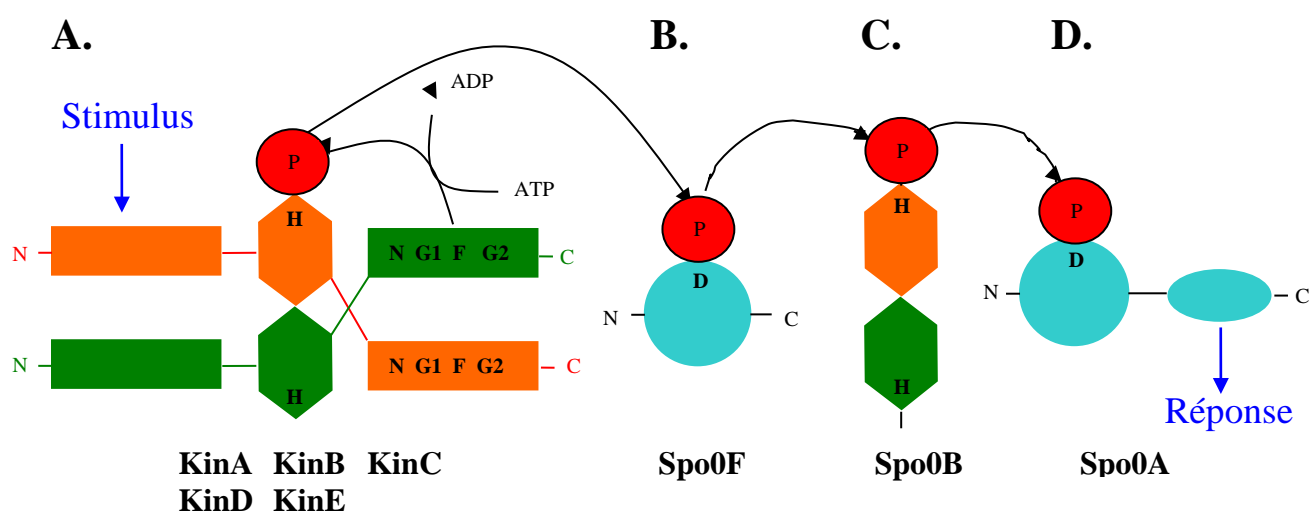


Figure 5. Illustration d'un système de transduction du signal à plusieurs composants : représentation du phosphorelais impliqué dans le processus de sporulation chez *Bacillus subtilis*. **A.** 5 HPKs, KinA, KinB, KinC, KinD et KinE peuvent introduire le groupement phosphate dans le phosphorelais. **B.** Le régulateur monodomaine Spo0F **C.** L'HPT dimérique Spo0B. **D.** Le RR Spo0A.

Cinq HPK différentes, KinA, KinB, KinC, KinD et KinE peuvent introduire le groupement phosphate dans le phosphorelais. Ces HPK s'autophosphorylent au niveau d'une Histidine puis cèdent leur groupement phosphate au résidu aspartate d'un régulateur monodomaine, Spo0F, qui catalyse ce transfert. Ensuite, Spo0F transmet ce groupement phosphate au résidu

histidine d'une HPT dimérique nommée Spo0B, celle-ci relaie le transfert de phosphate vers la protéine effectrice Spo0A qui, ainsi activée, se fixe à l'ADN et régule l'expression des gènes placés sous le contrôle de promoteurs qu'elle reconnaît^{19,20}.

I.1.2. *Brucella*

Les bactéries du genre *Brucella* sont des coccobacilles non mobiles à Gram négatif appartenant à classe des α_2 -protéobactéries (**figure 6**).

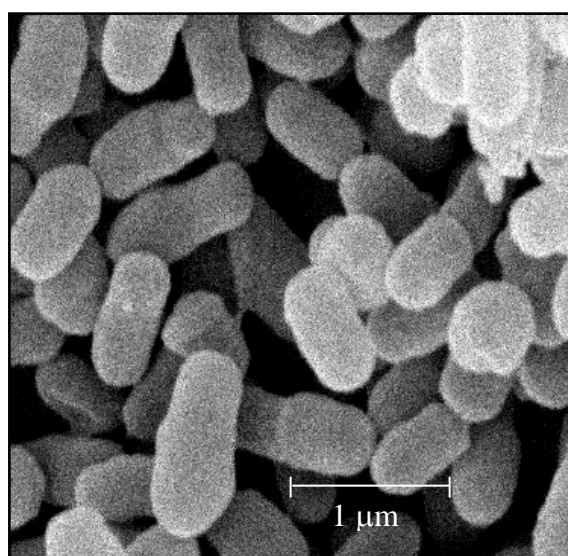


Figure 6. *Brucella abortus* observée en microscopie électronique à balayage (MEB).

Les Brucellae sont des parasites intracellulaires responsables d'une maladie infectieuse chronique appelée brucellose touchant la plupart des mammifères dont l'homme. La brucellose est une zoonose mondialement répandue et se contracte suite à l'ingestion de produits animaux contaminés tels les laitages non pasteurisés ou par contact direct avec des animaux infectés. Le genre *Brucella* est décrit comme comportant six espèces : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae*. Chaque espèce est naturellement pathogène pour un hôte animal préférentiel, mais non exclusif²¹. Les Brucellae colonisent principalement les organes reproducteurs, ce qui peut conduire à la stérilité chez les individus mâles et à des avortements chez les individus femelles. Chez l'humain, si la maladie n'est pas diagnostiquée et traitée à temps, des complications telles qu'endocardites infectieuses, spondylites ou encéphalites peuvent survenir et entraîner la mort²². Son diagnostic n'est

pas aisé. En effet, les individus malades peuvent présenter des symptômes très variables et non-spécifiques : perte de poids, fièvre, céphalée, douleurs articulaires, prostatite, épидидymite,... Un traitement efficace consiste en une antibiothérapie au moyen de fortes doses de doxycycline et de rifampicine. Deux vaccins sont d'usage courant chez l'animal alors qu'il n'en existe pas pour l'homme. Ces vaccins, les souches vivantes atténuées *B. abortus* B19 et *B. melitensis* Rev1, présentent toutefois trois inconvénients majeurs : 1) les tests sérologiques classiques basés sur la détection du lipopolysaccharide (LPS) des Brucellae ne permettent pas de différencier un animal malade d'un animal vacciné ; 2) ces vaccins provoquent l'avortement chez l'animal gestant ; 3) et ils restent infectieux pour l'homme²³.

I.2. CtrA chez les α -protéobactéries

CtrA fut identifié pour la première fois chez *Caulobacter crescentus*, la bactérie modèle pour l'étude des processus de différenciation cellulaire chez les procaryotes. *C. crescentus* est une α -protéobactérie aquatique mobile à Gram négatif. Cette bactérie a la particularité de présenter un cycle de division cellulaire asymétrique lors duquel une cellule mère génère deux cellules filles de morphologies différentes : une cellule pédonculée fixée au substrat qui est compétente pour la réplication et une cellule flagellée mobile incapable de répliquer son ADN et de se diviser (**figure 7**).

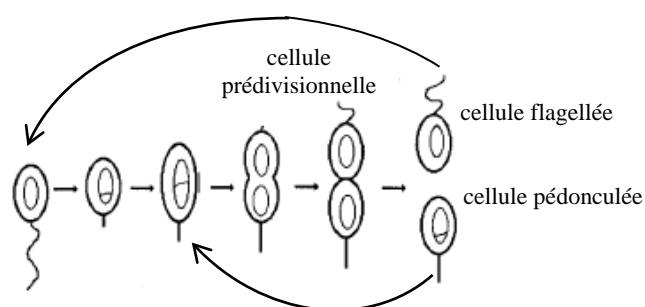


Figure 7. Cycle de division cellulaire de *C. crescentus*²⁴.

La cellule pédonculée peut générer indéfiniment les deux types cellulaires, la cellule flagellée doit quant à elle se différencier en cellule pédonculée avant de pouvoir initier la réplication de son ADN et la division cellulaire. Lorsque la cellule flagellée rencontre une niche écologique favorable à sa survie, elle se différencie. La cellule entre alors en phase S : elle subit la résorption du flagelle, la perte des pili et un pédoncule est formé au pôle précédemment

occupé par le flagelle. La cellule nouvellement pédonculée peut alors entrer dans le cycle de division cellulaire actif (**figure 8**).

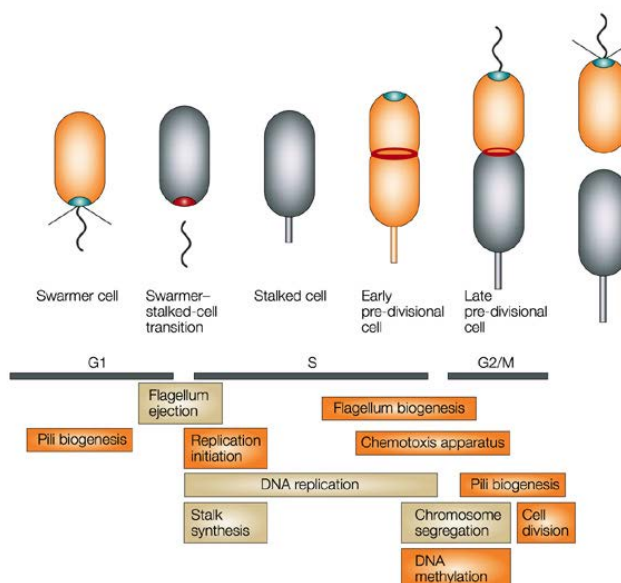


Figure 8. Évènements temporellement contrôlés lors du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* ²⁵.

I.2.1. Rôle de CtrA chez *Caulobacter crescentus*

L'analyse par microarrays du génome de *C. crescentus* révèle que 553 gènes sur les 3767 pCDS³ qui le composent montrent des fluctuations dans leur taux de transcription au cours du cycle cellulaire. 26 % de ces gènes (soit 144 gènes sur 553) sont contrôlés directement ou indirectement par CtrA ²⁶. CtrA chez *C. crescentus* régule directement au moins 55 opérons parmi lesquels ceux impliqués dans les processus de biogenèse du flagelle et des pili, de septation, de méthylation et de réplication de l'ADN ²⁶. Le motif nucléotidique reconnu par CtrA au niveau des promoteurs des gènes qu'il régule consiste en deux séquences TTAA espacées de 7 nucléotides quelconques et souvent terminés par une cytosine : TTAA-N7-TTAA(C). La présence de CtrA phosphorylé dans la cellule flagellée de *Caulobacter* l'empêche d'initier la réplication de son ADN en raison de la présence de cinq sites TTAA-N7-TTAA (C) au sein de l'origine de réplication ²⁷. Lors de la différenciation en cellule pédonculée, CtrA est spécifiquement dégradée par une protéase ClpX/ClpP dépendante, ce qui permet à la cellule d'initier la réplication de son ADN (la cellule amorce la phase S) ¹⁰.

³ predicted coding sequences (séquences codantes prédites)

Simultanément, le gène *ctrA* est transcrit, CtrA s'accumule dans la cellule prédivisionnelle et est progressivement phosphorylé, ce qui lui permet d'activer la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse du flagelle et des pili. Ensuite, CtrA est éliminée par protéolyse de la portion pédonculée de la cellule asymétrique prédivisionnelle de stade tardif, ce qui permet la libération d'une cellule pédonculée prête pour un nouveau cycle de division (**figure 9 A**). De plus, CtrA active l'expression du gène *ccrM*. Ce gène encode une ADN méthyltransférase qui reconnaît et méthyle de façon spécifique des sites de séquence GAnTC. CcrM permet de convertir le chromosome néosynthétisé de la forme hémiméthylée à la forme totalement méthylée requise pour reprendre un nouveau cycle de réplication de l'ADN ²⁸.

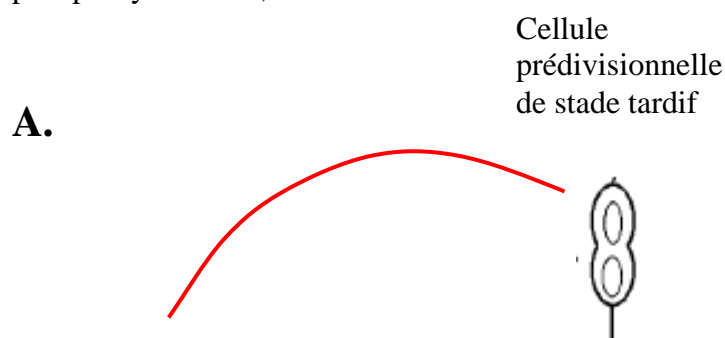
I.2.1.A. Contrôle du taux d'activité de CtrA chez *Caulobacter crescentus*

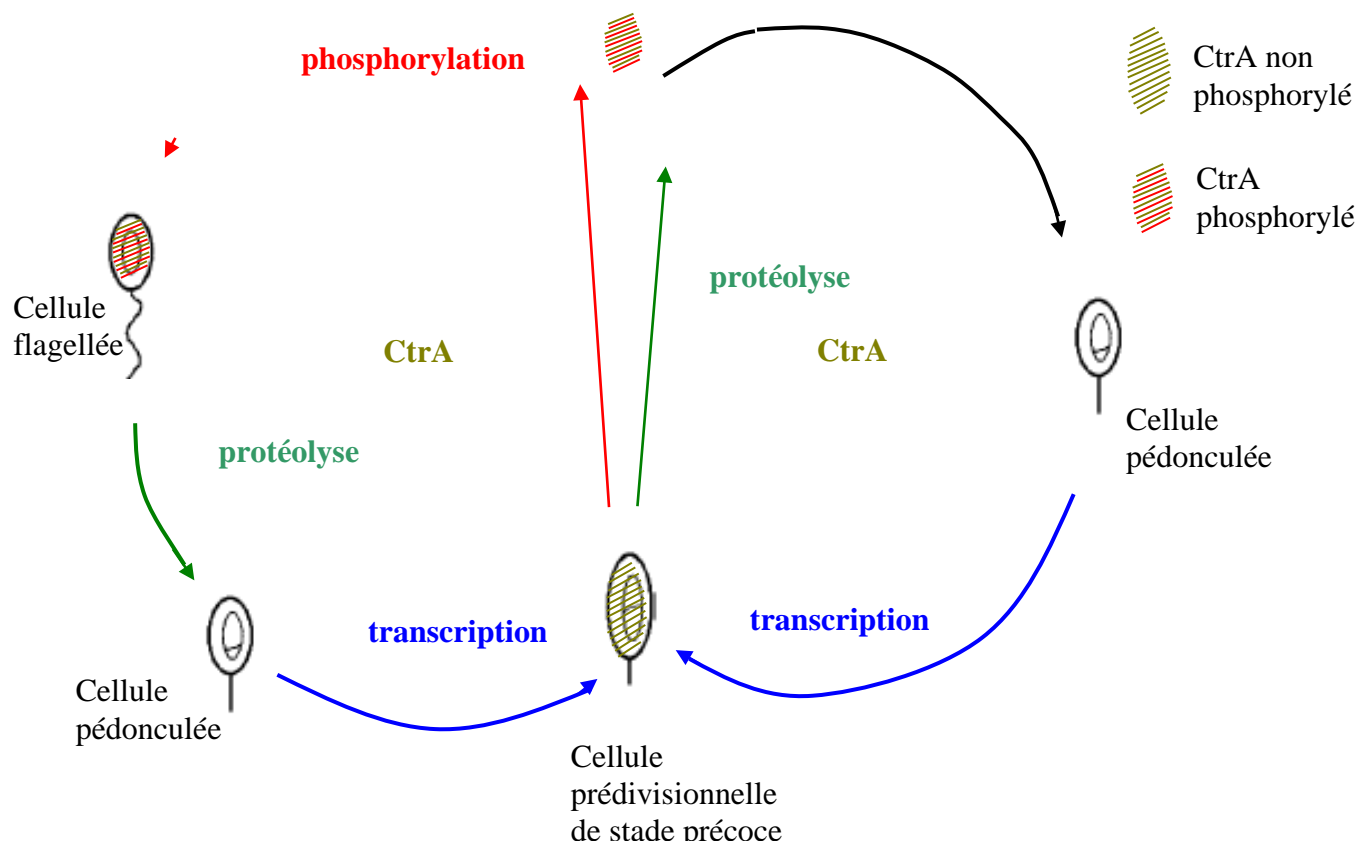
Outre un contrôle transcriptionnel sur sa propre expression (**figure 9 B**) ⁶, CtrA est soumis à une régulation spatio-temporelle au moyen des processus de phosphorylation et de protéolyse ^{8,10}. En effet, CtrA est activé par la phosphorylation d'un résidu aspartate spécifique et est protéolysé juste avant le début de la phase S ainsi qu'au niveau de la partie pédonculée de la cellule asymétrique prédivisionnelle, cette dégradation permettant la réplication de l'ADN.

I.2.1.A.1. Le contrôle post-traductionnel de CtrA chez *Caulobacter crescentus*

Un système de transduction du signal complexe à plusieurs composants régule le taux de phosphorylation de CtrA. À ce jour, au moins trois voies de phosphorylation pourraient être impliquées dans l'activation de CtrA. La première comprend les HPK's DivJ et PleC ainsi que le RR monodomaine DivK ^{29,30}, la seconde comprend l'HPK DivL qui a la particularité de présenter un résidu tyrosine plutôt qu'histidine comme site d'autophosphorylation ³¹ et la dernière est constituée de l'HPK hybride CckA ⁷ (**figure 10**). À ce jour, seule l'activation de CtrA par CckA a pu être confirmée.

DivJ et PleC possèdent chacune une région N-terminale très hydrophobe qui permet leur ancrage en membrane. DivJ et PleC phosphorylent tout deux DivK *in vitro* mais PleC phosphoryle DivK avec une efficacité inférieure à celle de DivJ ³¹. *In vivo*, seul DivJ semble phosphoryler DivK, l'intervention de PleC ne consistant qu'à inhiber cette phosphorylation ³².





B.

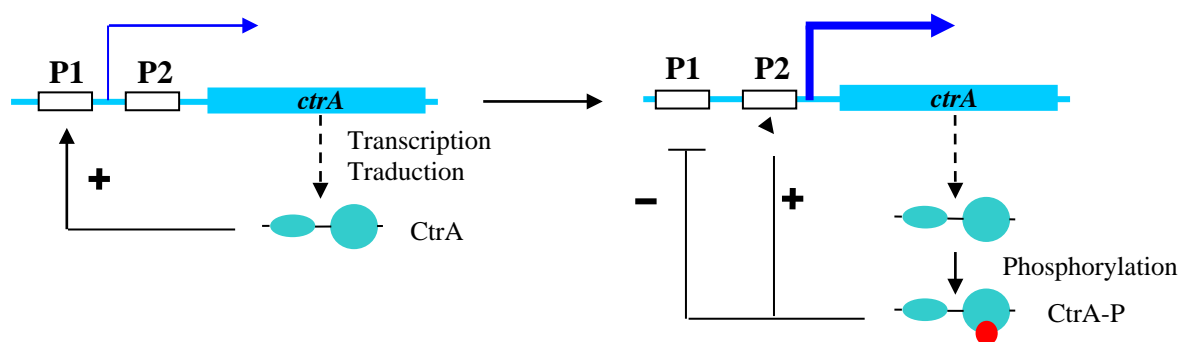


Figure 9. A. Schéma du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* avec représentation des évènements affectant CtrA. B. CtrA exerce un contrôle transcriptionnel sur sa propre expression : le gène *ctrA* est sous le contrôle des promoteurs P1 et P2. P1 n'entraîne qu'une faible expression de *ctrA* tandis que P2 entraîne une forte expression de *ctrA*. La forme non phosphorylée de CtrA active le promoteur P1 alors que sous son état phosphorylé, CtrA inhibe P1 et active P2 ⁶.

Enfin, le transfert de phosphate entre DivK et CtrA, s'il a lieu, devrait faire intervenir une HPt encore non identifiée, qui jouerait le rôle d'intermédiaire entre ces deux protéines.

La seconde voie de phosphorylation repose sur une HPK particulière, DivL qui s'autophosphoryle sur un résidu tyrosine (Y) plutôt que histidine (H). Il a été montré *in vitro* que DivL pouvait phosphoryler CtrA³¹.

La troisième voie de phosphorylation de CtrA qui a été caractérisées dépend d'une HPK hybride appelée CckA⁷. CckA phosphoryle CtrA *in vivo* mais on ignore encore s'il s'agit d'un transfert direct de phosphate depuis l'histidine de son domaine autokinase ou si ce transfert est médié par un domaine intermédiaire HPt³³.

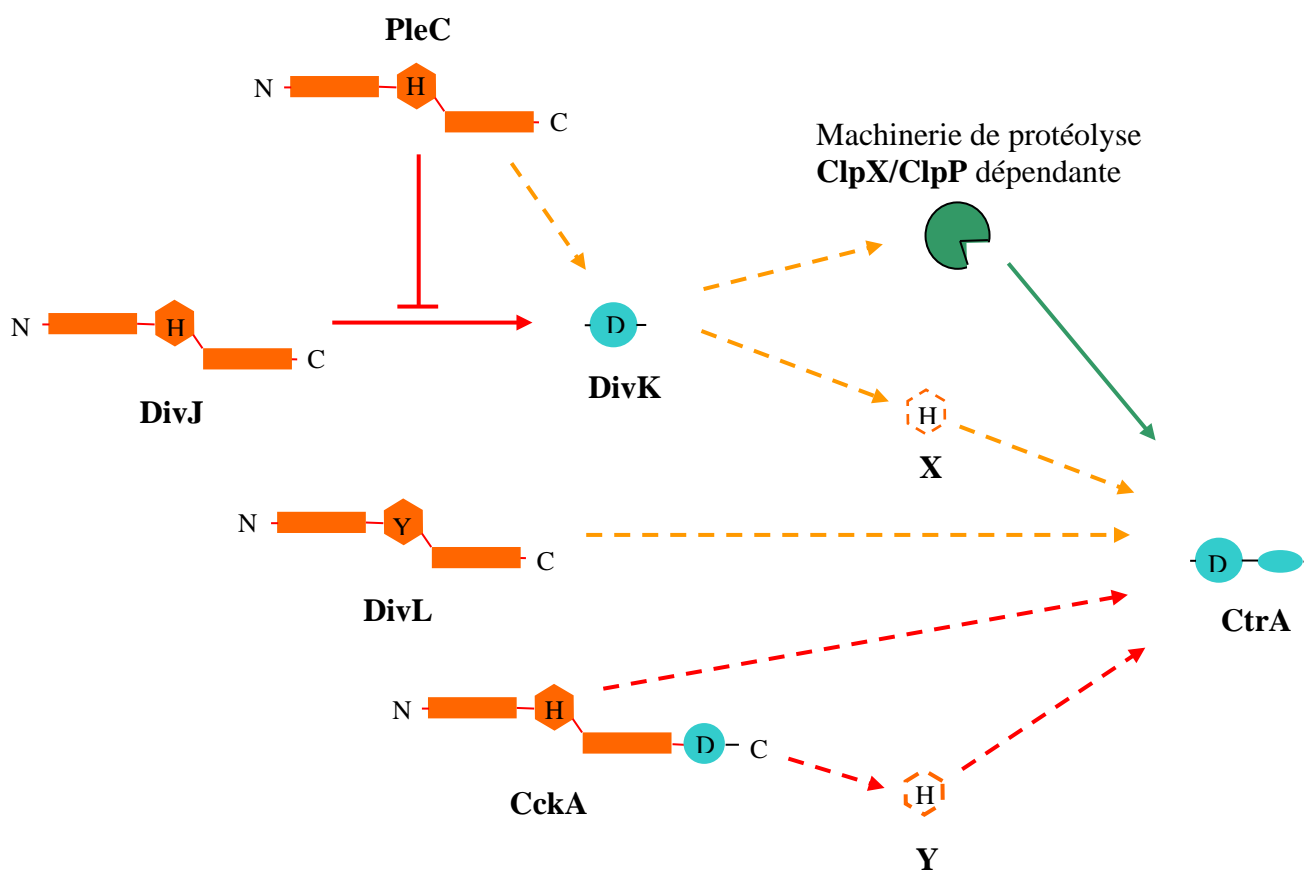


Figure 10. Voies aboutissant à la phosphorylation de CtrA proposée chez *Caulobacter crescentus*. Les flèches rouges relient les acteurs entre lesquels un transfert de phosphate a été avéré *in vivo* les flèches oranges relient les acteurs entre lesquels le transfert de phosphate *in vivo* n'est encore qu'hypothétique. Les flèches discontinues représentent un transfert de groupement phosphate possible. Remarquons que, bien que le transfert de phosphate soit établi entre CckA et CtrA, on ne sait pas encore s'il s'agit d'un transfert direct ou indirect (d'où les flèches discontinues) ; la flèche verte représente l'action protéolytique du complexe ClpX/ClpP.

Toutes ces protéines sont localisées de manière spécifique à l'une ou l'autre des extrémités des cellules et ces localisations évoluent tout au long du cycle (**figure 11**).

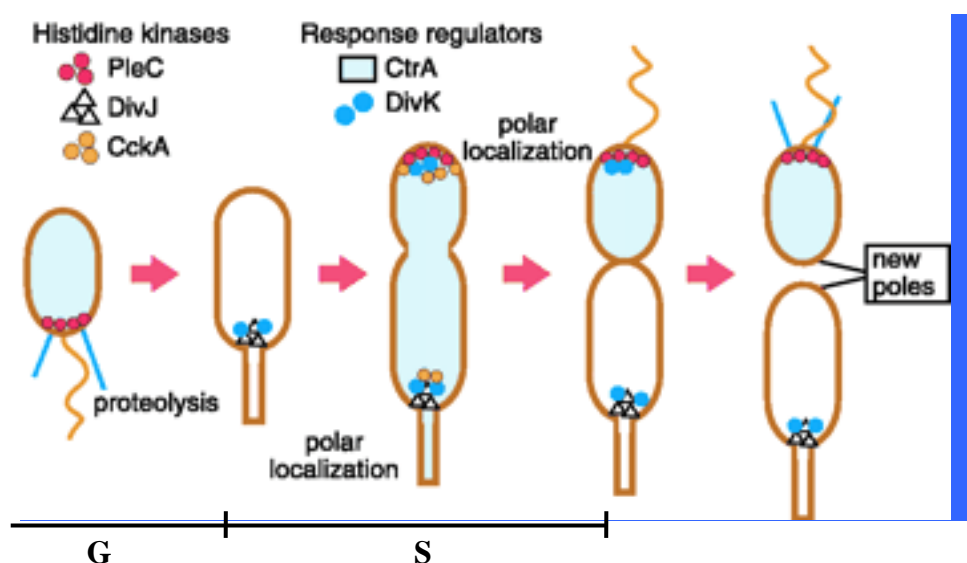


Figure 11. Localisations polaires des protéines de transduction du signal au cours du cycle cellulaire de *Caulobacter*³². PleC (●) est concentré au niveau du pôle portant le flagelle. PleC est ensuite dégradé et la cellule passe de l'état flagellé à l'état pédonculé. Simultanément, DivJ (triangle) et DivK (●) prennent place à la base du pédoncule. CckA (●) se localise ensuite provisoirement aux pôles cellulaires de la cellule prédivisionnelle de stade précoce, ce qui coïncide avec la phase de phosphorylation de CtrA. Le régulateur de réponse DivK est dispersé dans les cellules flagellées, mais pas au cours des autres moments du cycle lors desquels il se localise aux pôles cellulaires.

I.2.1.A.2. Contrôle du taux d'activité de CtrA via sa protéolyse chez *Caulobacter crescentus*

La protéolyse de CtrA permet à la cellule pédonculée d'initier les processus de réplication de l'ADN comme expliqué précédemment, cette protéolyse a été mise en évidence par Western blotting sur des échantillons de souches sauvages synchronisées : CtrA est détecté au cours du stade flagellé mais pas lors du stade de transition entre la forme flagellée et la forme pédonculée de *Caulobacter* ; CtrA ne réapparaît qu'en milieu de phase S. La dégradation de CtrA requiert la machinerie de protéolyse dépendante du complexe protéasique ClpX/ClpP. La protéase ClpX/ClpP est constituée de deux sous-unités, les protéines ClpX et ClpP.

À l'heure actuelle les mécanismes qui contrôlent la protéolyse de CtrA demeurent inconnus. Toutefois, très récemment, la comparaison du niveau de CtrA entre des souches *divK* cryosensible (*cs*) et sauvage, toutes deux maintenues à température restrictive, ont révélé que les souches *divK-cs* étaient incapables de protéolyser CtrA. DivK interviendrait donc, via le

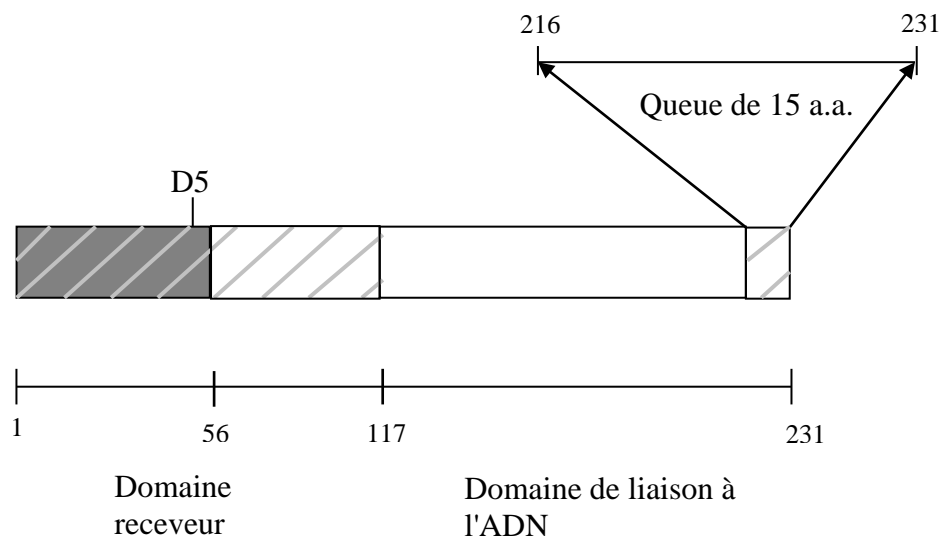


Figure 13. Représentation schématique du régulateur de réponse CtrA avec mise en évidence (hachures) des régions comportant les signaux requis pour sa protéolyse. En gris : identification plus précise de la portion du domaine receveur qui comporte le signal permettant la protéolyse de CtrA.

Des analyses de mutants ont montré que la protéolyse de CtrA était insensible à son état de phosphorylation, bien que le résidu aspartate ciblé (D51) fasse partie des 56 premiers résidus de son domaine receveur¹⁰. Cette même équipe a montré que les homologues de CtrA présents chez les autres α -protéobactéries sont aussi protéolysés. Cependant la mise en évidence de cette protéolyse chez *Rickettsia prowazekii* n'a pas encore été faite.

1.2.2. CtrA chez *Brucella*

Un homologue au régulateur transcriptionnel CtrA de *C. crescentus* a été identifié chez *Brucella*. Comme son homologue chez *C. crescentus*, CtrA chez *Brucella* serait soumis à régulation via les processus de transcription, de protéolyse et de phosphorylation, déjà décrits. Des recherches par homologie de séquences ont permis d'identifier chez *Brucella melitensis* des homologues aux phosphotransférases DivJ, PleC, DivL, CckA et DivK ainsi qu'une protéine de 1035 acides aminés homologue à PleC et DivJ, nommée PdhS (PleC/DivJ homolog Sensor)⁵. Cette nouvelle HPK en tant que membre de la famille DivJ/PleC pourrait contrôler l'état de phosphorylation de DivK chez *Brucella*.

Il est à remarquer que l'homologie entre ces phosphotransférases n'est hautement significative d'une parenté fonctionnelle qu'au niveau des domaines impliqués dans les processus

d'autophosphorylation et de transfert de phosphate. En effet, les domaines N-terminaux sont très divergents entre orthologues et ce en raison des différences radicales qui distinguent les modes de vie de *Brucella* et *Caulobacter*. Ces domaines perçoivent des stimuli propres au milieu intracellulaire chez *Brucella* et propres au milieu aquatique chez *Caulobacter*, les divergences au niveau des domaines senseurs N-terminaux reflètent les différences caractérisées par la nature des stimuli perçus. La comparaison des domaines N-terminaux de DivJ et PleC avec ceux de leurs homologues permet d'illustrer la persistance de structures fonctionnellement comparables au sein de ces protéines ; par exemple, du côté N-terminal, PleC de *Caulobacter* et son homologue chez *Brucella* présentent chacun deux régions hydrophobes séparées par un long linker.

Les différences entre les diverses phosphotransférases et leurs homologues seraient dûes à des différences dans la nature des signaux qui régulent la cascade d'activation de CtrA entre *Caulobacter* et *Brucella* ⁵ (**figure 14**).

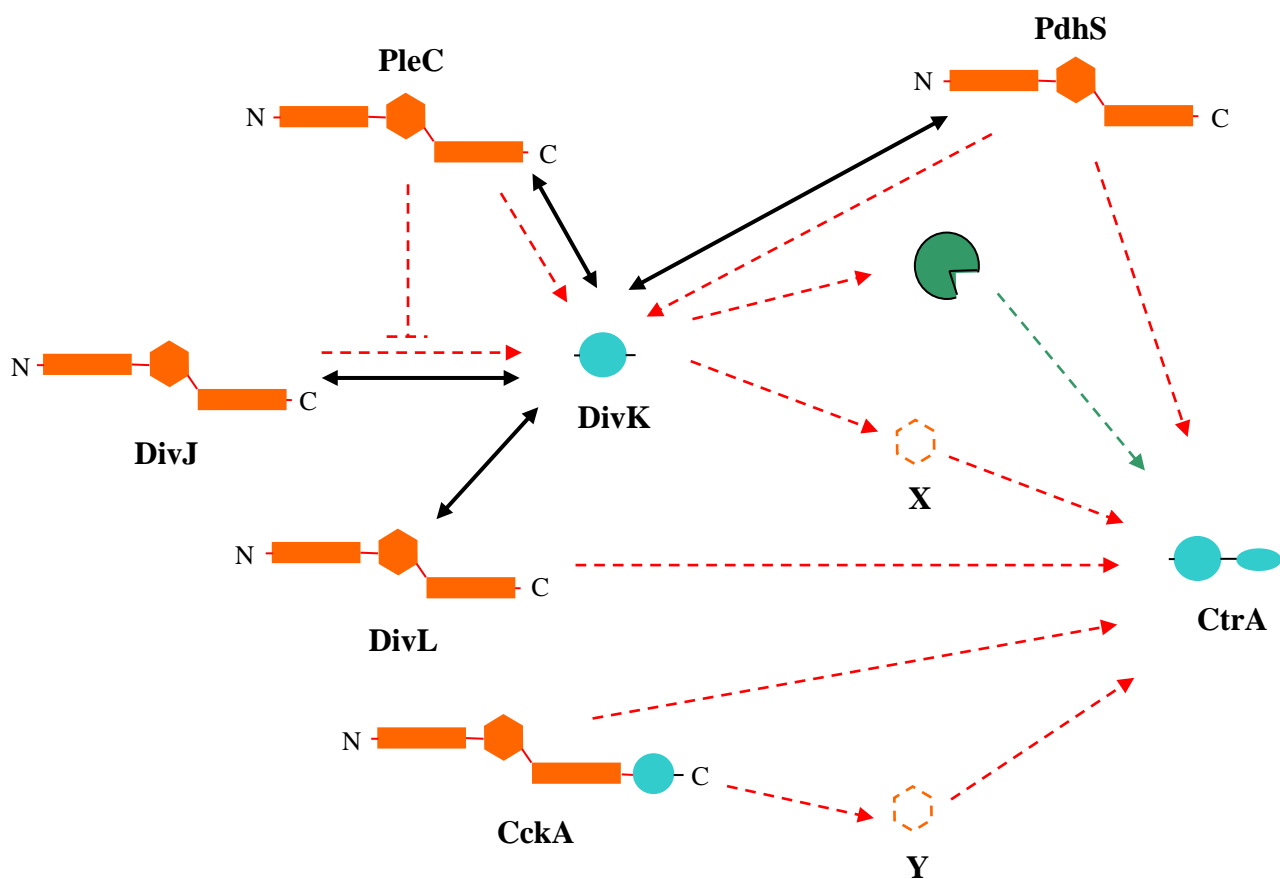


Figure 15. Pathway de phosphorylation hypothétique de CtrA *in vivo* chez *Brucella abortus*. Les flèches discontinues représentent un transfert de groupement phosphate hypothétique, la flèche verte représente l'action protéolytique supposée du complexe ClpX/ClpP sur CtrA chez *Brucella*, quant aux doubles flèches, elles relient les acteurs du phosphorelais pour lesquels une interaction a été détectée par test double-hybride.

II. Objectif du travail

Chez *C. crescentus*, cinq protéines impliquées dans trois voies de phosphorylation distinctes contrôlent l'activité du régulateur transcriptionnel CtrA. Ces protéines sont les HPK DivJ, PleC, DivL et CckA et le RR DivK. La recherche d'HPK et RR homologues de ces acteurs au sein des génomes récemment séquencés de *Brucella melitensis* et de *Brucella suis* a permis l'identification⁵ de séquences homologues pour chacune des quatre HPK et pour le RR DivK. En outre, une pCDS partageant une forte similarité avec les séquences *divJ* et *pleC* appelée *pdhS* a été détectée chez *Brucella*⁵. Un homologue à cette pCDS a été détecté dans le génome de plusieurs α -protéobactéries mais pas chez *C. crescentus*. Au cours de ce travail, nous tenterons tout d'abord de déterminer si les séquences homologues identifiées constituent des gènes exprimés chez *Brucella*. Si ces gènes sont exprimés, nous essaierons de relier les différentes protéines qu'ils encodent au régulateur CtrA. Pour cela, nous comparerons et caractériserons les phénotypes des souches de *Brucella* surexprimant chacune des 6 séquences codantes à ceux observés pour la souche surexprimant *ctrA*. Nous avons également créé une souche surproduisant l'ADN méthyltransférase CcrM, celle-ci représentant un bon contrôle positif pour la perturbation du cycle cellulaire.

III. Résultats et discussion

Le laboratoire disposait, avant que ne débute ce travail, de plusieurs outils permettant la caractérisation des voies (pathway) de phosphorylation en amont de CtrA chez *Brucella*.

Ces outils, des vecteurs plasmidiques et des anticorps avaient été élaborés par Christophe Naomé dans le cadre de son stage au laboratoire. Trois types de vecteurs furent utilisés lors de ce stage, les plasmides pBBR1 (**figure 22** du matériel et méthodes), pMR10, et pET-15b. Les 8 séquences *ctrA*, *divJ*, *pleC*, *divK*, *pdhS*, *divL*, *cckA* et *ccrM* ont été clonées au moyen de la technique Gateway™ dans chacun de ces vecteurs, générant au total 24 vecteurs d'expression. Les vecteurs d'expression pBBR1 et pMR10 diffèrent par leur nombre de copies au sein de *Brucella*, pBBR1 est un plasmide medium copy tandis que pMR10 est un plasmide low copy. Le vecteur pBBR1 sera employé afin de surproduire les phosphotransférases et l'ADN méthyltransférase chez *Brucella abortus*. Le promoteur *Plac* qui contrôle nos séquences d'intérêt dans ces vecteurs est non régulable chez *Brucella*. Le troisième type de vecteur utilisé, le plasmide pET-15b a été employé pour obtenir les protéines purifiées requises pour l'immunisation de lapins. En effet, ce vecteur génère des protéines couplées à une queue aminoterminal de six histidines qui va permettre leur purification par chromatographie d'affinité. L'injection des protéines purifiées, à raison d'un type protéique par lapin, a permis de générer 7 sera polyclonaux. Le sera dirigé contre CtrA était déjà disponible au laboratoire⁵.

III.1 Validation des outils disponibles (anticorps et plasmides)

Une façon de vérifier si les plasmides sont fonctionnels et si les anticorps reconnaissent de façon spécifique nos protéines d'intérêt est d'exprimer la séquence d'intérêt dans *Escherichia coli*, puis d'effectuer un Western blotting sur le lysat d'une culture de la souche transformée avec le plasmide de surexpression. *E. coli* ne possède pas de séquences très proches de celles des HPK, RR et méthyltransférase étudiées, son emploi en tant qu'organisme de validation est donc indiqué. La présence de la protéine encodée par cette séquence pourra être démontrée au moyen d'une analyse par SDS-PAGE et Western blotting utilisant l'anticorps adéquat. Cette procédure permet de vérifier la fonctionnalité des plasmides en même temps que la spécificité des polysera issus des immunisations.

III.1.1. Description des plasmides de surexpression et des anticorps

III.1.1.A. Les plasmides de surexpression

Nous n'avons purifié que les fragments C-terminaux, notamment pour éviter de prendre des régions transmembranaires. Ainsi, Les protéines DivJ, PleC, PdhS, DivL et CckA produites à partir des plasmides pET15b sont en général plus petites que leurs équivalents à l'état natif (**figure 15**).

Il est à remarquer que l'absence de domaines transmembranaires rend aussi possible la réalisation de tests double hybride sur ces protéines en levure.

III.1.1.B. Les anticorps polyclonaux

Le titre des différents sera produits a été déterminé par la technique ELISA (Enzyme linked immuno-specific assay). Cette technique permet de mesurer l'affinité d'un sérum pour une protéine, autrement dit le test ELISA donne une idée à la fois sur la concentration en anticorps spécifique de cette protéine dans le sérum et sur l'affinité de ces anticorps pour la protéine d'intérêt. Le titre d'un sérum a été défini comme étant la dilution du sérum pour laquelle une densité optique à 630-450 nm égale à 1 ($DO^{630-450} = 1$) est obtenue lors de l'ELISA.

Le titre de chaque sérum est repris dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Titres de chaque sérum. Ces titres ont été définis par ELISA (Enzyme linked immuno-specific assay) sur leurs antigènes cibles respectifs.

Sera	Titres définis en ELISA
anti-CtrA	2000X
anti-DivJ	5000X
anti-PleC	12800X
anti-DivK	800X
anti-PdhS	3200X
anti-DivL	3200X
anti-CckA	10000X
anti-CcrM	400X

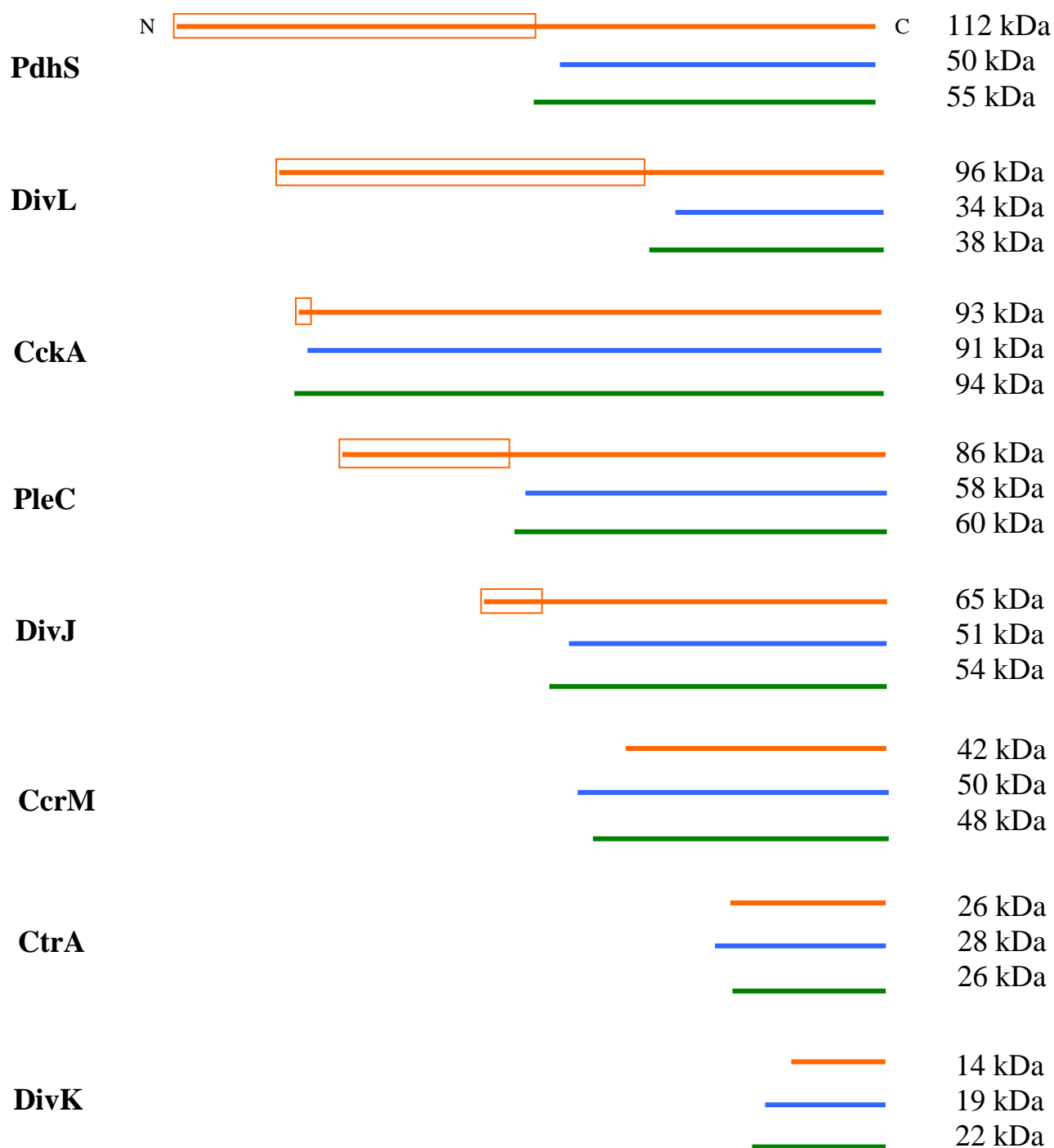


Figure 15. Représentation schématique et approximation des tailles des différentes protéines étudiées. Les barres oranges représentent les protéines natives, les barres bleues, les protéines purifiées et les barres vertes les protéines produites à partir de pBBR1-*cds*. Le poids estimé pour les trois variantes de chacune des protéines est indiqué en vis-à-vis à droite. Les portions de protéines qui ont été éliminées pour la purification sont encadrées.

III.1.2. Validation proprement dite

Pour valider les plasmides et les anticorps disponibles, nous avons généré 9 souches d'*E.coli* pourvues chacune d'un plasmide spécifique. Huit des 9 plasmides employés comportent les pCDS d'intérêt à savoir *ctrA*, *divJ*, *pleC*, *divK*, *pdhS*, *divL*, *cckA* et *ccrM*, tandis que le dernier est un plasmide vide qui servira de contrôle négatif lors des Western blottings.

Les transformants obtenus ont été mis en culture liquide dans du milieu riche (L.B.) contenant du chloramphénicol. Nous avons ensuite uniformisé les concentrations de bactéries en culture en fonction des densités optiques à 600 nm (DO^{600}). Nous avons amené toutes les cultures à une valeur de DO^{600} égale à 0,2 ce qui correspond approximativement à une concentration de 2×10^7 bactéries par millilitre. Ces cultures furent ensuite placées en incubation à 37°C pendant 3 heures. Une fois cette période d'incubation écoulée, les cultures ont été centrifugées afin de récupérer le matériel bactérien des culots. Après élimination des surnageants les 9 culots furent chacun resuspendus dans un volume identique de tampon PBS. Les DO^{600} des suspensions furent ensuite ajustées afin d'uniformiser les concentrations bactériennes, et ce, pour permettre le chargement ultérieur de quantités équivalentes de protéines sur gel de polyacrylamide. Nous avons réalisé 8 gels de 4 puits. Les deux premiers puits de chaque gel ont été chargés avec des lysats d'*E. coli* pourvues d'un plasmide vide à raison de 10 et 15 μ l alors que les deux puits suivants comportaient 10 et 15 μ l du lysat d'une souche d'*E. coli* pBBR1-*cds*. Il faut remarquer que pour le gel comportant le chargement d'*E. coli* pBBR1-*pdhS*, les quantités d'extraits protéiques chargées sont de 10 et 20 μ l. Après migration des protéines des lysats dans les 8 gels, celles-ci furent transférées sur 8 membranes de nitrocellulose (une membrane par gel). Une fois ce transfert accompli, chacune des membranes fut incubée avec un des 8 sera, précisément celui susceptible de reconnaître la protéine exprimée par la souche de *E. coli* pBBR1-*cds* chargée dans les troisième et quatrième puits de chaque gel.

Après révélation des membranes (**figure 16 A à F**), des bandes sont visibles au niveau de 6 pistes. Celles-ci correspondent aux puits qui ont recueilli les extraits des souches de *E.coli* portant pBBR1-*ctrA*, *divJ*, *pdhS*, *divK*, *cckA* et *divL*. Le niveau des bandes, en référence au marqueur de poids moléculaire, nous donne une bonne approximation de la taille des protéines reconnues par les anticorps. Les Western bottings effectués sur les souches pBBR1-*ccrM* et pBBR1-*pleC* devront être refaits nous en expliquerons les raisons plus loin. Pour 5

des 6 pistes où des bandes sont visibles (**Tableau III.2.**), les tailles des protéines reconnues correspondent bien à celles que l'on attendait, seule DivK pose problème (cfr **figure 15H**).

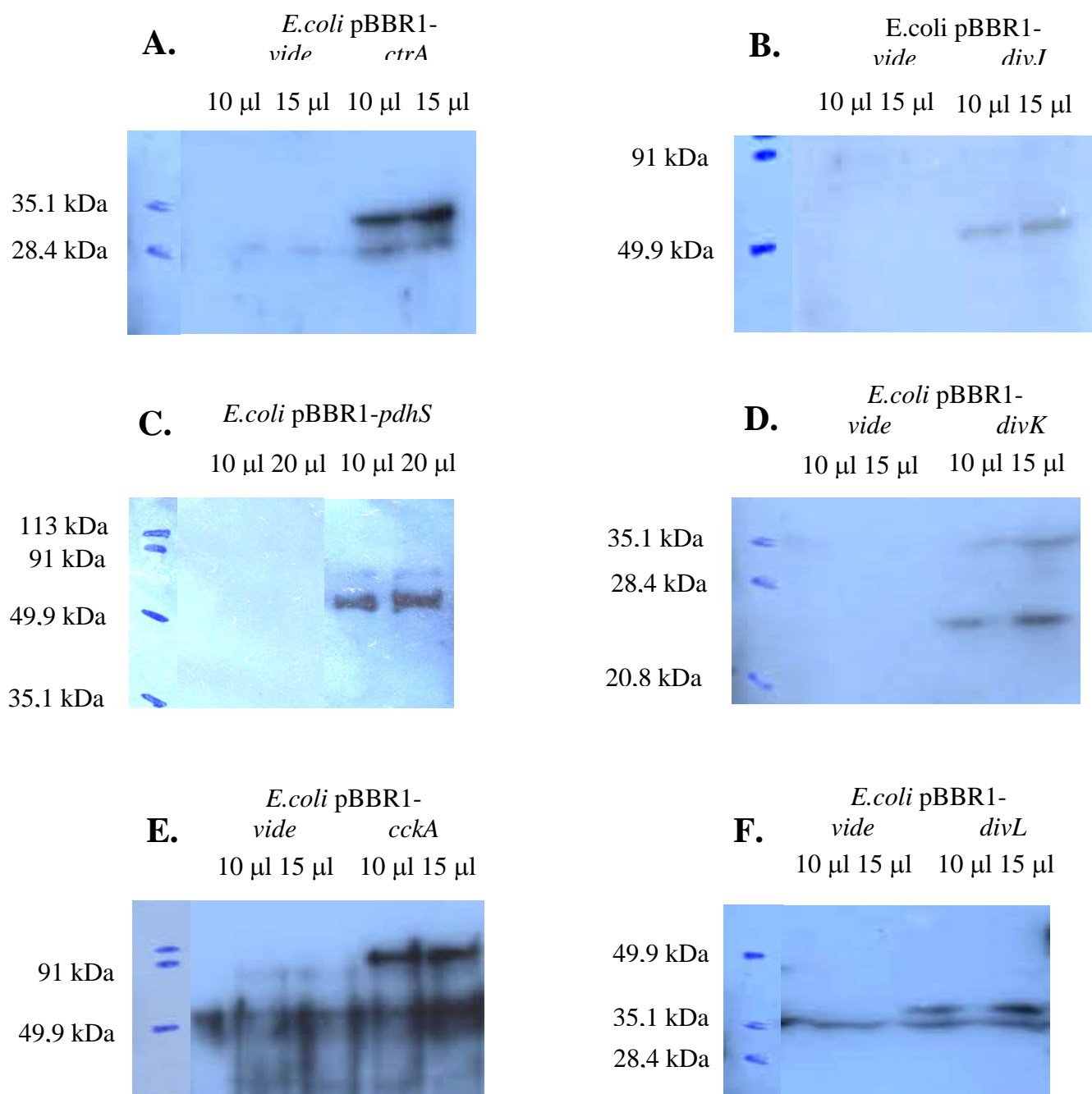


Figure 16. Western blottings sur souches d'*E. coli* pBBR1-*cds*. Ces Westerns ont permis d'avérer l'expression des gènes *ctrA*, *divJ*, *PdhS*, *divK*, *divL* et *cckA* depuis les pBBR1-*cds*.

Tableau III.2. Poids moléculaires de chaque protéine exprimés en kDa après estimation *in silico* (2^{ème} colonne) et estimation sur base de Western blottings (3^{ème} colonne).

Protéine	Taille prédite de la partie surexprimée (en kDa)	Taille de la partie surexprimée observée en Western blotting (en kDa)
CtrA	34	34
DivK	22	27
PdhS	55	55
PleC	60	nul
DivJ	54	54
DivL	38	38
CckA	94	94
CcrM	48	nul

La protéine DivK produite à partir du pBBR1 semble plus grande que prévu, sa masse serait de 4 à 5 kDa plus importante que celle prévue par le programme ProtParam disponible sur le serveur EXpaSY (27kDa observé au lieu des 22kDa prédits sur base de la séquence en acides aminés) (**figure 16 D**). Au vu de ces résultats nous pouvons dire que les séquences *ctrA*, *divJ*, *pdhS*, *divK*, *cckA* et *divL* sont exprimées par les pBBR1 et que les anticorps eux-même, de par cette reconnaissance, sont fonctionnels.

Nous l'avons mentionné plus haut, les Western blottings réalisés sur les souches *E.coli* pBBR1-*pleC* et pBBR1-*ccrM* ne nous ont pas permis d'avérer la fonctionnalité des constructions plasmidiques ni la spécificité des sera dirigés contre les protéines CcrM et PleC. En effet, le western blotting effectué sur la souche pBBR1-*ccrM* présente un bruit de fond beaucoup trop intense que pour détecter la présence de CcrM dont la taille attendue est de 48 kDa, tandis qu'à l'inverse le même test sur les transformants pBBR1-*pleC* ne donne aucun signal (données non montrées).

La validité des différents pBBR1-*cds* a été authentifiée par séquençage y compris pour pBBR1-*ccrM* et pBBR1-*pleC*, l'absence de détection des protéines CcrM et PleC serait donc due à des problèmes de sera : le sérum dirigé contre CcrM est trop peu spécifique tandis que le sérum dirigé contre PleC ne permet pas la détection de cette protéine en Western blotting.

Pour PleC, des essais de chargements avec des quantités croissantes de protéines furent effectués, mais ils ne permirent jamais de révéler sa présence.

N'ayant pu démontrer la fonctionnalité des sera anti-CcrM et anti-PleC, ceux-ci seront laissés de côté pour la suite du travail.

III.2.Mise en évidence de la production des protéines d'intérêt chez *Brucella*

Nous avons effectué des Western blottings pour déterminer si les séquences identifiées chez *Brucella* sont exprimées par ces bactéries. Nous avons obtenu 6 membranes et celles-ci ont été incubées chacune avec un sera spécifique parmi les 6 opérationnels. Les pistes de ces membranes correspondaient à trois puits dans lesquels nous avons chargé des quantités croissantes d'extraits protéiques d'une souche de *Brucella* sauvage (en fait des *Brucella* contenant le plasmide pBBR1-*vide*). Ainsi, en augmentant la quantité d'extraits protéiques chargés d'un puit à l'autre, nous augmentons de la même façon, d'une piste à l'autre, l'intensité du signal témoignant de la présence des protéines d'intérêt. Les quantités en extraits protéiques chargés pour ce test sont de 7 µg, 14 µg et 28 µg.

Cette expérience a permis de déterminer les quantités minimales d'extraits à charger pour détecter nos protéines favorites, soit l'équivalent de 7 µg pour CtrA et 28 µg pour DivK, PdhS et CckA (**figure 17**), les protéines natives DivJ et DivL n'ont jamais été détectées même après chargement de 70 µg d'extraits lors de tests ultérieurs.

La non-détection des protéines natives DivJ et DivL peut s'expliquer de deux manières : soit les gènes encodant ces deux protéines ne sont pas exprimés dans les conditions étudiées soit ces gènes sont exprimés mais trop faiblement pour que les protéines produites soient détectables après analyse par SDS-PAGE et Western blotting.

Nous concluons de cette expérience que les gènes *ctrA*, *divK*, *pdhS* et *cckA* sont exprimés par *Brucella* au cours de culture en milieu bactériologique. Reste à savoir si ces gènes ainsi que *divJ* et *divL* sont impliqués de quelque manière que ce soit dans le contrôle de *ctrA*. C'est ce qui fera l'objet du chapitre suivant.

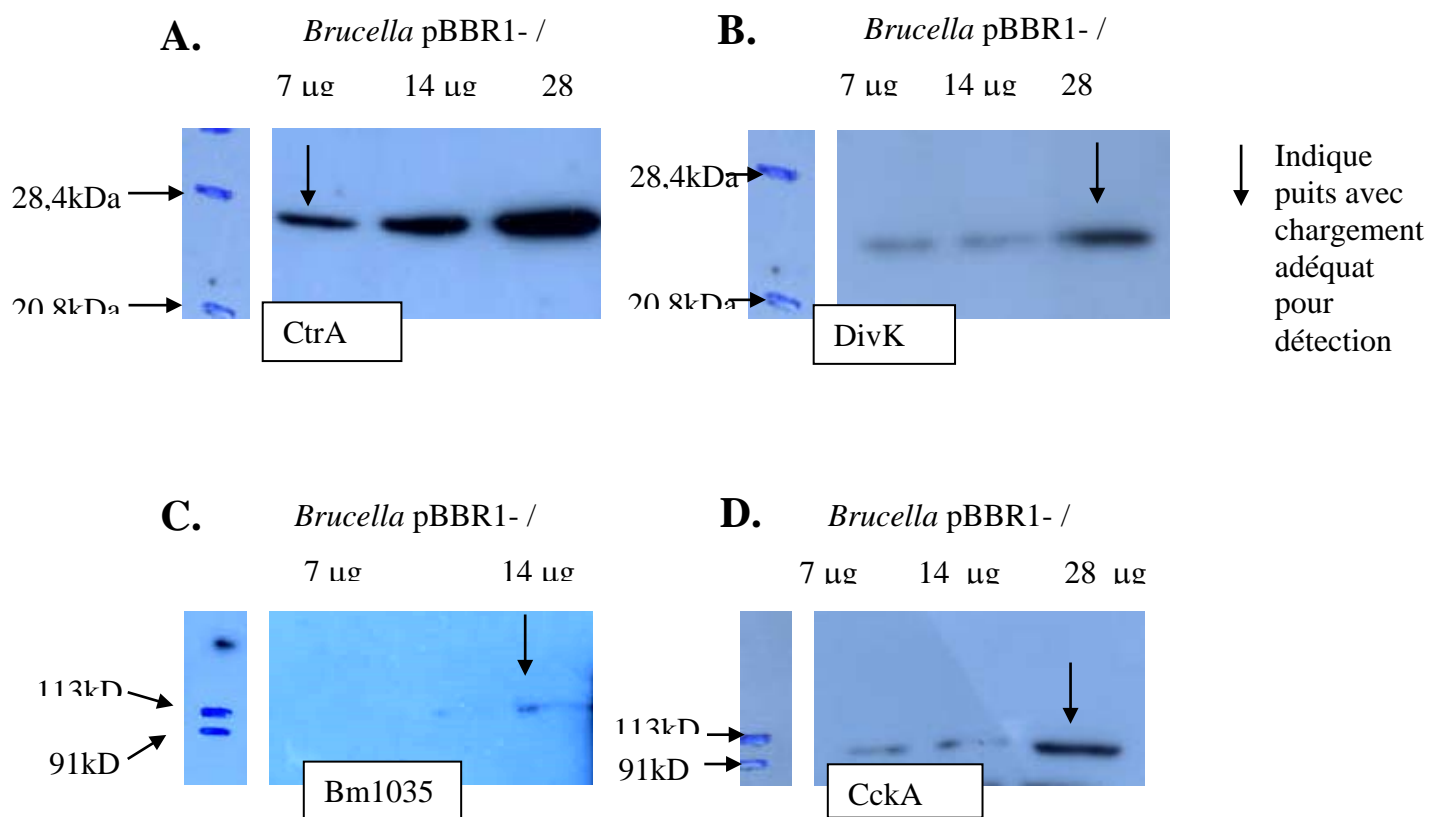


Figure 17. Western blotting sur des quantités croissantes d'extraits protéiques de *Brucella* pBBR1-*vide*. Ce test a pour but la détermination du chargement minimal requis pour la détection des protéines natives. Les flèches verticales indiquent les pistes où un signal significatif est observé. Les résultats des Westerns concernant DivJ et DivL ne sont pas présentés : leur présence n'a jamais été détectée.

III.3. Phénotype des mutants de surexpression

La surproduction de CtrA chez *Brucella* entraîne la perturbation du processus de division cellulaire : les cellules perdent leur aspect coccique pour devenir allongées, épaissies et branchées (en forme de X ou de Y)⁵. Ce phénotype particulier est semblable à celui obtenu chez *Rhizobium meliloti*, une autre α -protéobactérie, après traitement à la Céphalexine qui est une drogue inhibitrice du processus de septation³⁶.

Une façon de démontrer si le RR et les HPK étudiés au cours de ce travail jouent un rôle dans le contrôle de l'activité de CtrA est d'observer le phénotype associé à leur surproduction chez

Brucella et de le comparer à celui obtenu après surproduction de CtrA lui-même. Nous supposons que si une phosphotransférase intervient dans l'activation de CtrA, la surexpression de cette phosphotransférase aura pour effet d'activer CtrA tout au long du cycle, ce qui engendrerait chez le transformant un phénotype d'inhibition de septation comparable à celui observé pour la souche surexprimant *ctrA*. Prenons par exemple l'HPK CckA, si cette protéine active CtrA par phosphorylation comme c'est le cas chez *Caulobacter crescentus*⁷, alors la surexpression du gène encodant cette HPK pourrait entraîner l'activation constitutive du régulateur CtrA et engendrer un phénotype comparable à celui observé pour la souche surproduisant CtrA.

III.3.1. Morphotypes aberrants

Comme nous venons de l'expliquer, la surproduction de CtrA chez *Brucella* conduit à un phénotype tout à fait particulier : les cellules perdent leur aspect coccique pour devenir allongées, épaissies et branchées (en forme de X ou de Y). Nous avons donc vérifié si la surexpression des séquences encodant des régulateurs potentiels de l'activité de CtrA engendraient le même phénotype. Pour cela, nous avons tout d'abord observé chacune des souches transformantes de *Brucella* en microscopie optique après coloration de Gram (**figure 18**). Nous avons ensuite observé ces mêmes souches en microscopie électronique à balayage (MEB) afin de caractériser plus finement leurs morphotypes (**figure 19**).

III.3.1.A. Observation des mutants en microscopie optique après coloration de Gram

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif : après coloration, les bactéries à Gram négatif apparaissent en rouges alors que les bactéries à Gram positif apparaissent en bleu. Les bactéries du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles à Gram négatif d'environ 1,2 μm sur 0,8 μm . Nous avons utilisé cette technique de coloration pour détecter le phénotype anormal attendu parmi les *Brucella* pBBR1-*cds* cultivées sur milieu bactériologique. L'observation des mutants de surexpression en microscopie optique après coloration de Gram (**figure 18**) révèle que ceux-ci ont un aspect différent (**figure 18 B à G**) de celui de la souche contenant le plasmide vide (**figure 18 A**) : une large proportion de cellules dans chaque échantillon de *Brucella* pBBR1-*cds* est constituée d'individus plus allongés, ramifiés, en forme de X et de Y.

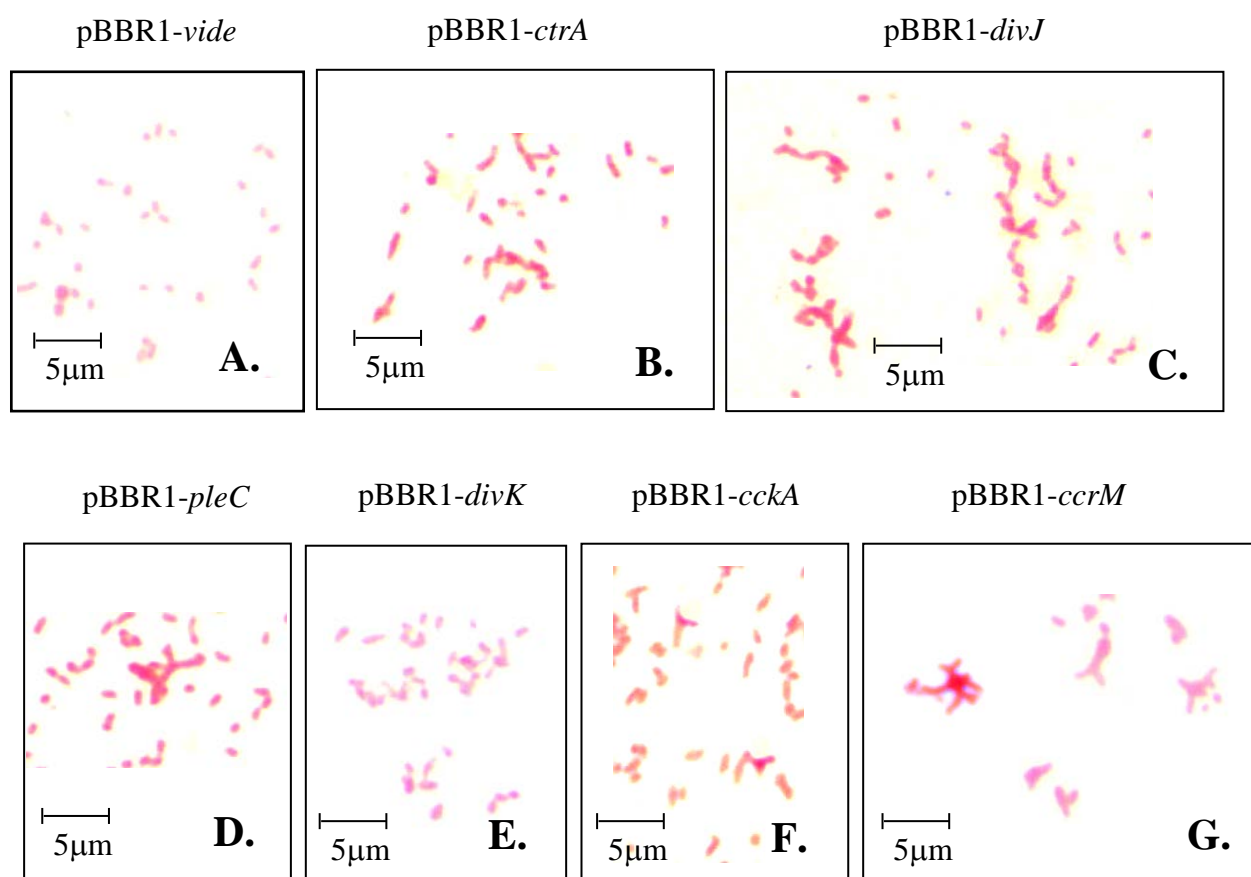


Figure 18. Images des mutants de surexpression obtenues en microscopie optique après coloration de Gram. **A.** Morphotype sauvage présenté par une souche comportant le plasmide vide. De **B à G**, Morphotypes présentés par les mutants de surexpression de *ctrA*, *divJ*, *pleC*, *divK*, *cckA* et *ccrM* (*pdhS* et *divL* non disponibles). Les cellules des *Brucella* pBBR1-*cds* sont plus allongées que les *Brucella* pBBR1-*vide*, de plus, ces cellules sont ramifiées, en forme de X et de Y.

Ce phénotype a déjà été caractérisé chez des souches de *Brucella* surproduisant CtrA ou l'ADN méthyltransférase CcrM^{5,35}, ainsi que chez les α protéobactéries *Rhizobium* et *Agrobacterium* après surproduction de FtsZ, un acteur central de la division cellulaire, ou suite à un traitement par des drogues inhibitrices de la septation telle la Céphalexine³⁴. Remarquons que jusqu'à l'établissement d'un lien entre l'inhibition de la septation et ce phénotype particulier par Latch et Margolin, les phénotypes typiques d'une inhibition de division cellulaire observés chez des bactéries modèles telles que *E. coli* étaient des filaments. Ces constatations justifient la poursuite de nos investigations par l'emploi de techniques plus sophistiquées comme la microscopie électronique à balayage. Une observation des mutants de

surexpression au moyen du microscope électronique à balayage permettra de caractériser plus finement leurs morphotypes.

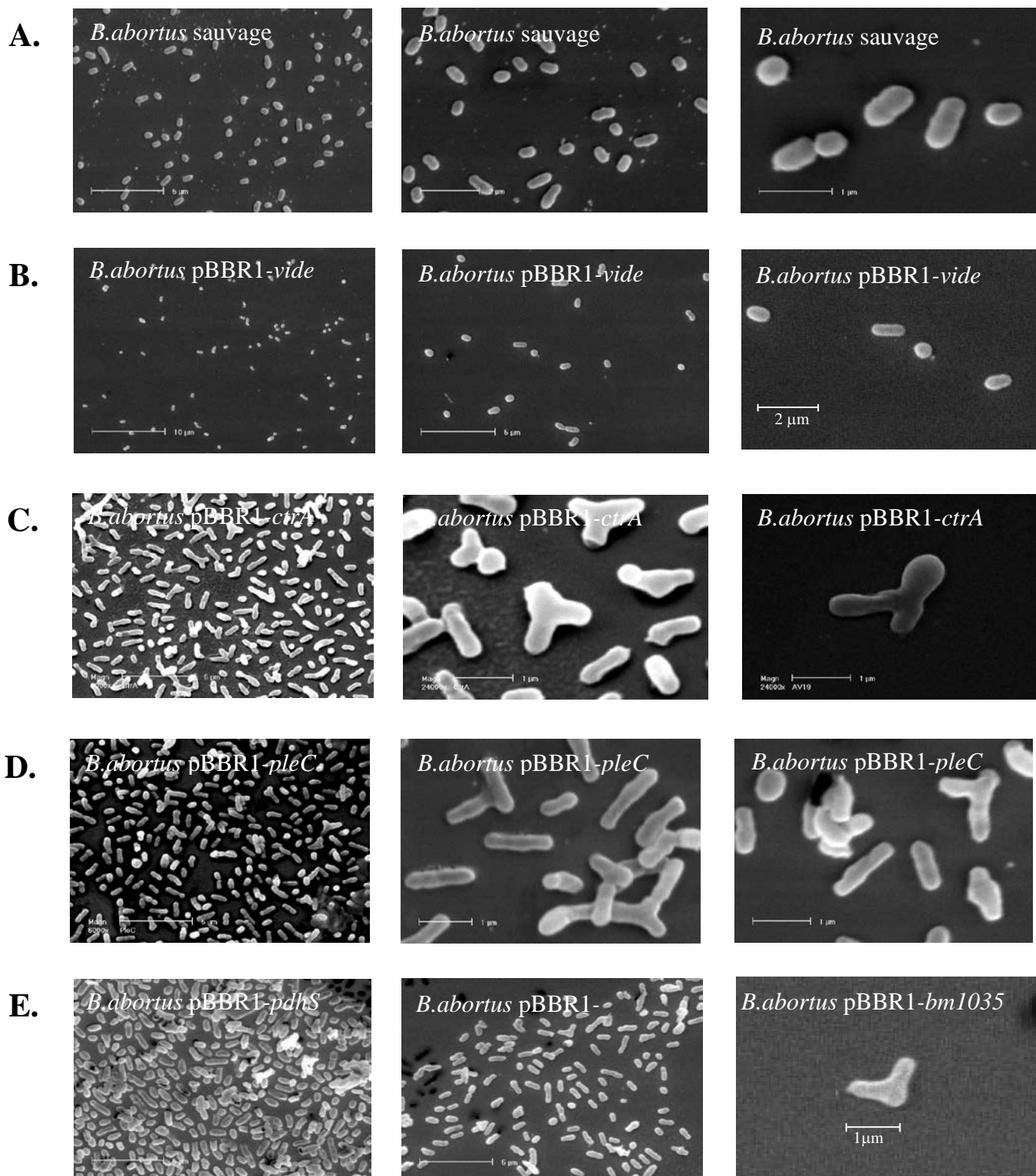
III.3.1.B. Observation des mutants en microscopie électronique à balayage (MEB)

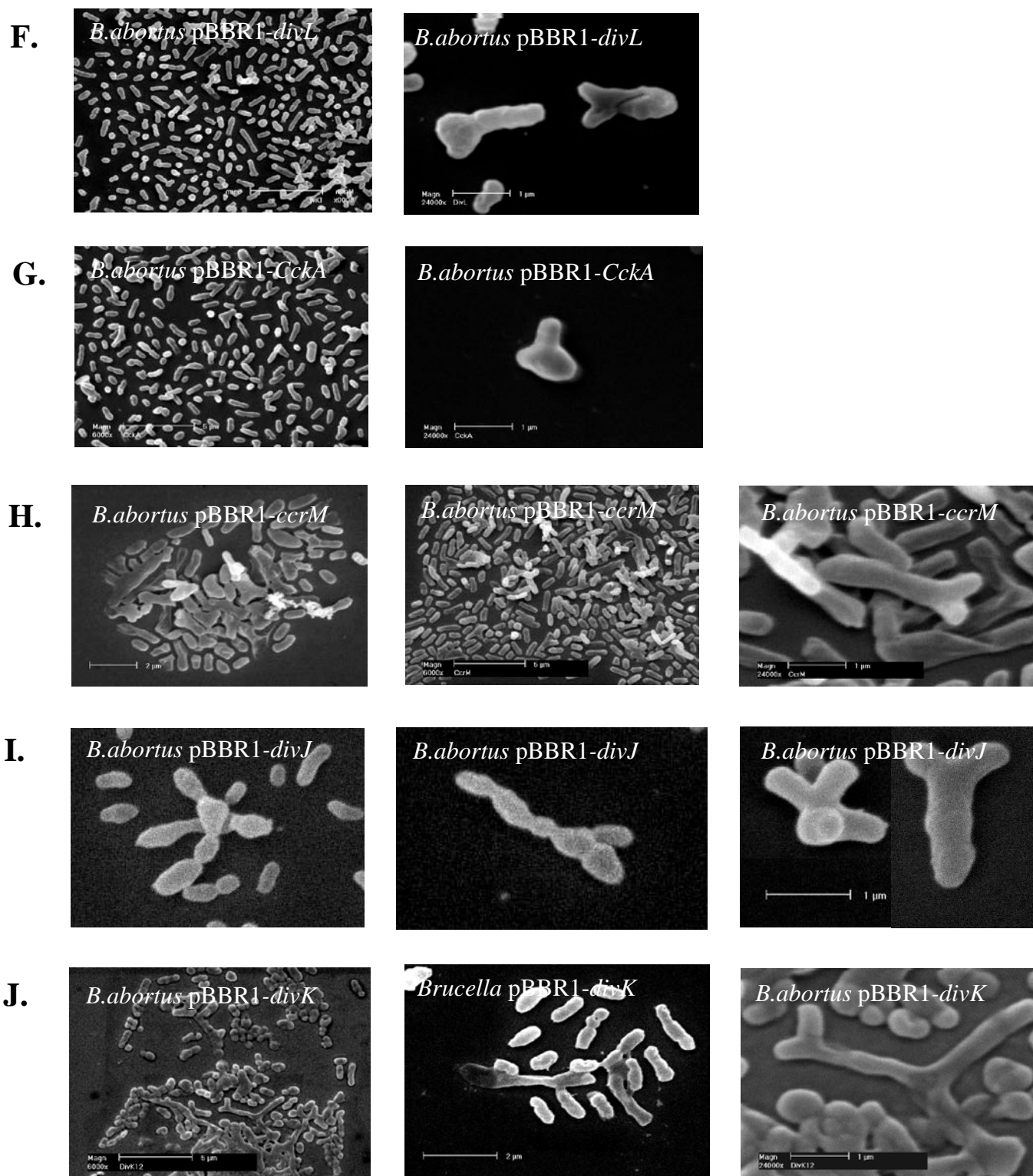
III.3.1.B.1. Lien entre le phénotype des mutants et la perturbation du cycle cellulaire

Les morphotypes observés pour les mutants de surexpression des gènes encodant les HPK DivJ, PleC, PdhS, DivL, CckA, les RR DivK et CtrA ainsi que celui de l'ADN méthyltransférase CcrM sont différents du morphotype sauvage. Les *Brucella* pBBR1-*cds* ont en commun de présenter un morphotype aberrant, qui suggère une implication des protéines surproduites dans le processus de division cellulaire. La similarité phénotypique partagée par les mutants de surexpression des différentes phosphotransférases et le régulateur transcriptionnel CtrA suggère l'existence d'un lien génétique entre ces protéines (**figure 19 C à 19 I**).

Toutefois, alors que les morphotypes des *Brucella* pBBR1-*pleC*, *pdhS*, *divL*, *cckA* et *ccrM* sont comparables entre eux ainsi qu'avec celui du mutant de surexpression de *ctrA*, les souches *Brucella* pBBR1-*divJ* et *Brucella* pBBR1-*divK* présentent un morphotype singulier. La surexpression des gènes *divJ* et *divK* engendre des populations de mutants principalement constituées de chapelets de cellules jointes, avec de nombreux anneaux de septation avortés (**figures 19 I et 19 J**). Ce phénotype singulier parmi les mutants de surexpression est surtout l'apanage de *Brucella* pBBR1-*divJ* (**figures 19 I**), en effet la proportion de cellules allongées en chapelets est moins marquée chez *Brucella* pBBR1-*divK* (**figures 19 J**). Des cellules branchées en forme de X ou de Y sont aussi présentes mais en de plus faibles proportions par rapport aux autres mutants de surexpression.

Figure 19. Images prises en MEB des différentes souches de *Brucella* et présentées sous divers grossissements. Le morphotype sauvage de *Brucella* est typique des coccobacilles (A), la transformation de *Brucella* par un pBBR1-*vide* ne modifie pas ce phénotype de façon visible (B). Par contre, la surproduction des phosphotransférases et ADN méthyltransférases étudiées a un impact significatif sur le morphotype de *Brucella* (C à J). La surexpression des gènes *ctrA*, *pleC*, *pdhS*, *divL*, *cckA* et *ccrM* (C à H) entraîne l'apparition de cellules plus allongées, ramifiées, en forme de X et de Y, la surexpression des gènes *divJ* et *divK* quant à elle aboutit à l'apparition de cellules très allongées le long desquelles sont régulièrement espacés des anneaux de septation n'ayant pas abouti (I et J).





La perturbation du processus de septation chez les α -protéobactéries *Rhizobium* et *Agrobacterium* entraîne la formation de cellules branchées ³⁶ d'aspect semblable à celui des *Brucella* pBBR1-*cds*.

De façon à s'assurer que les morphotypes de nos mutants sont en relation avec un problème de septation nous avons décidé de traiter la souche sauvage de *Brucella* ainsi que celle comportant le plasmide pBBR1-*vide* à la Céphalexine, une substance qui inhibe une protéine impliquée dans la synthèse du peptidoglycan du septum, la "penicillin binding protein 3" (PBP3, connue aussi sous le nom de FtsI).

Nous avons lancé en préculture une souche sauvage de *Brucella* que nous avons porté le lendemain à D.O.⁶⁰⁰ de 0,3. Nous avons laissé croître les cellules dans du milieu LB liquide à 30 μ g de Céphalexine par ml et ce pendant 3 heures. L'observation de cette souche en MEB révèle que les cellules traitées à la Céphalexine présentent un renflement central, ce qui les démarque des mutants de surexpression déjà observés (**figure 20**). Le traitement engendre aussi la formation de cellules en forme de X ou de Y comparables avec celles qui sont observées chez les *Brucellae* pBBR1-*cds* mais leurs branchements sont moins longs et leur nombre moins élevé que chez la plupart des mutants de surexpression (en étant exceptées les souches *Brucella* pBBR1-*divJ* et pBBR1-*divK*, qui présentent peu de cellules ayant cet aspect). Du reste, cette similitude mise à part, les bactéries traitées à la Céphalexine restent très différentes des souches pBBR1-*divJ* et pBBR1-*divK*. Les différences de morphotype entre les mutants de surexpression et les cellules traitées à la Céphalexine suggèrent que les morphotypes aberrant des *Brucella* pBBR1-*cds* ne sont pas dû qu'à une perturbation du processus de septation semblable à celle induite par la Céphalexine dans ces conditions.

Il faut toutefois remarquer que le traitement à la Céphalexine n'a duré que trois heures, un laps de temps qui ne permet pas à la cellule d'accomplir plus d'un cycle cellulaire complet. Il est possible qu'un traitement plus long aboutisse à un phénotype comparable à celui des mutants de surexpression. En effet, il n'est pas impossible que les renflements observés soient des amorces de branchement.

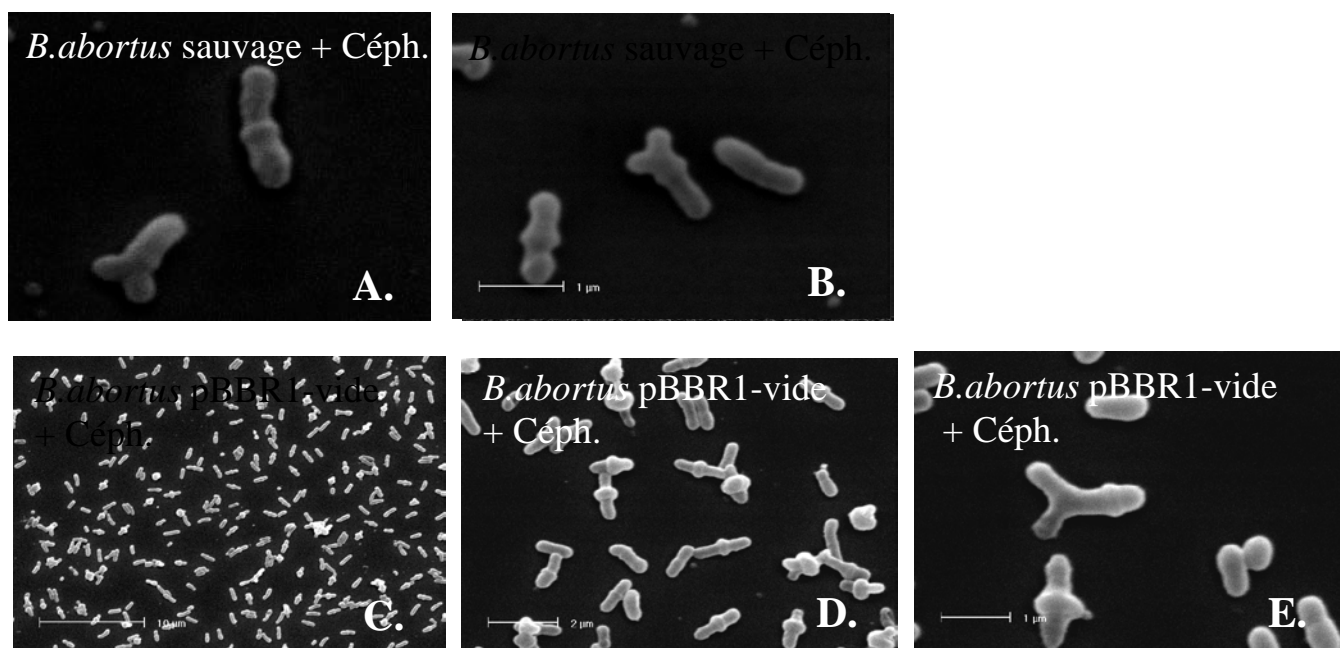


Figure 20. *Brucella* sauvages (A et B) et pBBR1-vide (C, D et E) observées en microscopie électronique à balayage (MEB) après 3 heures de croissance en milieu LB contenant 30 µg de Céphalexine par ml.

III.4. Vérification de la surexpression des protéines par les souches de *Brucella* pBBR1-*cds*.

La **figure 21** illustre le résultat du Western blotting effectué dans le but de vérifier la surexpression de chacune des séquences étudiées. Pour chacune des protéines, trois chargements ont été effectués, à savoir la protéine purifiée (à raison de 10 ng) et les extraits bruts issus des souches de *Brucella* contenant le plasmide pBBR1 vide et le plasmide pBBR1-*cds* en quantités équivalentes.

Tableau III.3. Chargements effectués sur gel de polyacrylamide pour la réalisation du Western blotting visant à vérifier la surexpression des protéines d'intérêt par les souches de *Brucella* pBBR1-*cds*

Puits 1 : protéine purifiée	Puits 2 : extrait <i>Brucella</i> pBBR1-/-	Puits 3 : extrait <i>Brucella</i> pBBR1- <i>cds</i>
-----------------------------	--	---

Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, celles-ci ont été incubées avec l'anticorps dirigé contre la protéine correspondante ainsi qu'avec l'anticorps dirigé contre l'Omp10. Ce dernier sert de contrôle de chargement puisqu'il nous permet de vérifier si nous avons chargé une quantité équivalente en extraits protéiques.

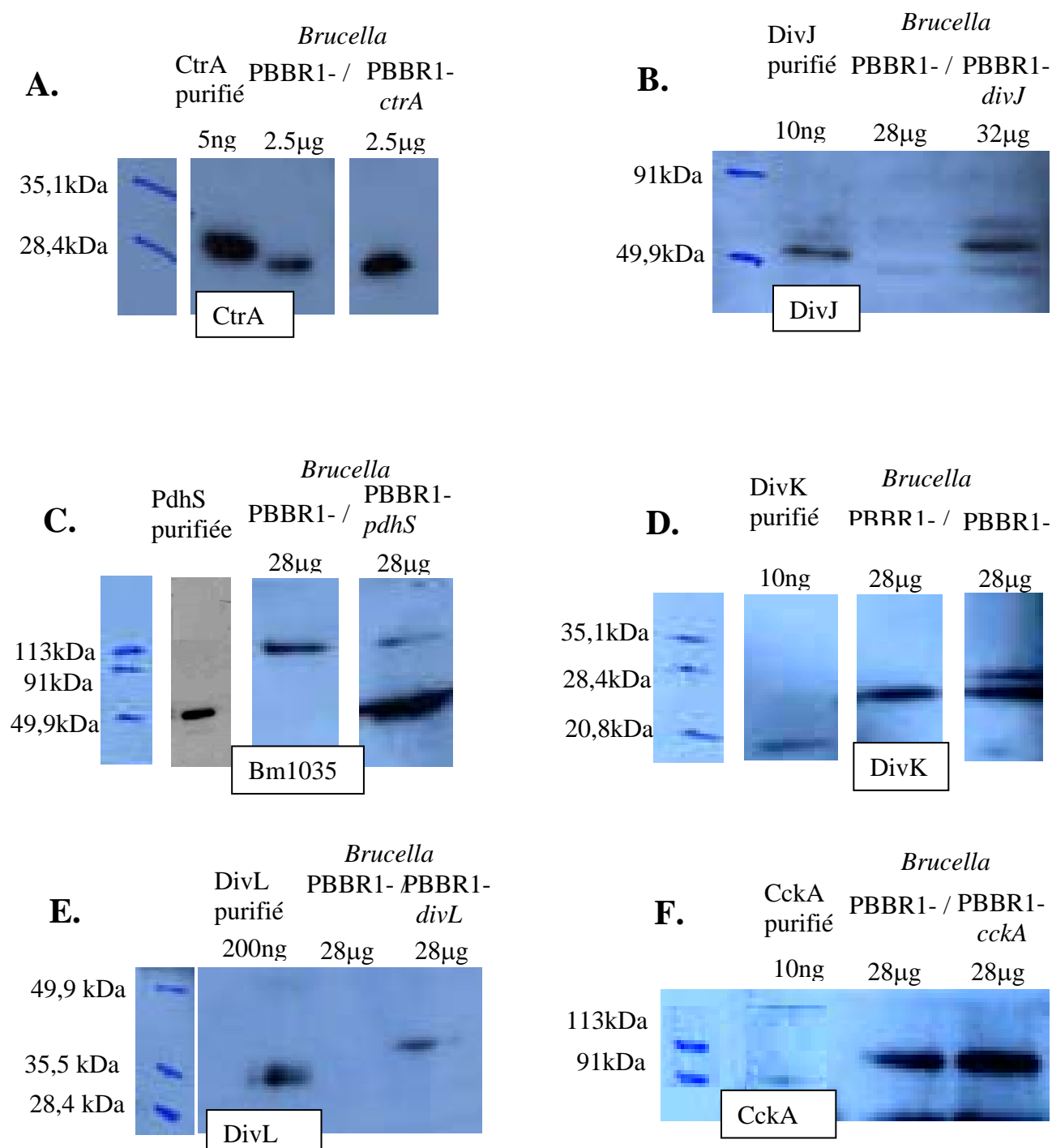


Figure 21. Western blottings effectués dans le but de vérifier la surexpression de chacune des séquences étudiées. CtrA, DivJ, PdhS, CckA et DivL sont nettement surproduites (figures A, B, C, E et F), tandis que la surproduction de DivK est moins importante (D).

Les Westerns nous ont révélé que CtrA, DivJ, PdhS, DivK, CckA et DivL sont bien surproduites. Toutefois, bien qu'au vu du contrôle de chargement Omp10 la surexpression des gènes *divJ*, *pdhS*, *cckA* et *divL* soit manifeste, la surexpression de *divK* paraît faible. Quant à la surexpression de *ctrA*, il est à remarquer que l'intensité du signal perçu contraste avec la faible quantité d'extraits protéiques chargés, et ce, tant pour la souche comportant le plasmide vide que pour la souche surexprimant *ctrA*. Ce signal fort est peut-être dû à une expression constitutive importante à la base ou à un problème de dilution.

Autre remarque importante, pour DivK, les protéines purifiées, native et surexprimée semblent être de 3,11 et 5 kDa respectivement, plus grandes que prévu.

Tableau III.4. Comparaisons entre les tailles prédites *in silico* et en western blotting pour les protéines purifiées, natives, et leurs portions surexprimées. **En gras :** pour DivK, on constate des différences entre les tailles prédites et les tailles obtenues en Western blotting, les protéines purifiées, natives et surexprimées y apparaissant plus grandes de 3, 11 et 5 kDa respectivement.

Protéine	Taille prédite de la protéine purifiée (en kDa)	Taille de la protéine purifiée estimée après Western blotting (en kDa)	Taille prédite pour la protéine native (en kDa)	Taille de la protéine native estimée après Western blotting (en kDa)	Taille prédite pour la partie surexprimée (en kDa)	Taille de la partie surexprimée estimée après Western blotting (en kDa)
CtrA	28	28	26	26	26	26
DivJ	51	51	65	nul	54	54
DivK	19	22	14	25	22	27
PdhS	50	50	112	112	55	55
DivL	34	34	96	nul	38	38
CckA	91	91	93	93	94	94

IV. Conclusions et perspectives

Des recherches par homologies de séquences ont avéré la présence des gènes *ctrA*, *divJ*, *pleC*, *divL*, *cckA*, *divK* et *ccrM* dans le génome de *Brucella*. Ces recherches ont, en outre, permis la détection d'une séquence homologue à *divJ* et *pleC* encodant une nouvelle HPK appelée *pdhS*. La première partie de ce travail a consisté en la validation des plasmides et anticorps mis à notre disposition. Les plasmides ont été validés par séquençage et les sera polyclonaux par Western blotting. Des Western blotting sur des *E. coli* transformées avec les différents plasmides pBBR1-*cds* ont révélé que 6 des 8 sera permettent de reconnaître des protéines après transfert en membrane. Les deux sera non opérationnels en Western blotting sont ceux dirigés contre PleC et CcrM. De nouveaux anticorps dirigés contre les protéines PleC et CcrM devront être préparés.

Nous avons donc poursuivi le travail en n'utilisant que les 6 sera fonctionnels. Ces sera nous ont permis de montrer via Western blotting que les gènes *ctrA*, *pdhS*, *divK* et *cckA* étaient exprimés par des *Brucella* sauvages (en fait porteuses du pBBR1-*vide*) au cours d'une culture en milieu bactériologique. Le fait que nous n'ayons pas pu détecter l'expression de *divJ* et de *divL* peut signifier plusieurs choses : soit ces gènes ne sont jamais exprimés soit ces gènes sont exprimés dans d'autres conditions de culture, lors d'infection par exemple. Il se peut aussi que leur expression soit si faible que nous ne sommes pas parvenu à la détecter. Nous avons surexprimé chacun de ces gènes chez *Brucella*, puis observé leurs morphotypes en MEB. Et nous avons constaté dans chaque cas y compris lors de la surexpression de *divJ* et de *divL* une modification du morphotype cellulaire de *Brucella*. Cette constatation est pour *divJ* et *divL* un argument en faveur de l'hypothèse suivant laquelle il ne s'agirait pas de pseudogènes mais plutôt de gènes non exprimés dans les conditions étudiées. Rappelons que *Brucella* est un pathogène intracellulaire facultatif et qu'il n'est pas rare de trouver des gènes spécifiquement induits lors d'une infection³⁷. Il serait dès lors intéressant d'analyser au moyen d'un gène rapporteur si les régions promotrices des gènes étudiés sont induites lors de l'infection d'une cellule eukaryote. Les résultats de ce type d'expérience nous révéleraient par exemple ce qu'il en est de l'expression de *divJ* et de *divL*.

L'observation au MEB des différentes souches de *Brucella* pBBR1-*cds* permet de suggérer un lien fonctionnel entre CtrA et les différentes protéines étudiées.

Les phénotypes des *Brucella* pBBR1-*cds* à l'exclusion des *Brucella*.pBBR1-*divJ* et pBBR1-*divK* sont comparables entre eux ainsi qu'avec le mutant de surexpression de *ctrA*. Les morphotypes des α -protéobactéries *Rhizobium* et *Agrobacterium* quand leur processus de septation est perturbé au moyen de Céphalexine ³⁶ sont comparables avec ceux qui ont été caractérisés pour les mutants de surexpression de nos protéines d'intérêt, ce qui indique que ces protéines pourraient intervenir bien dans la régulation de CtrA qui lui-même régulerait les phénomènes de réplication de l'ADN et/ou de septation chez *Brucella*. Pour conforter davantage cette hypothèse chez *Brucella*, nous avons inhibé spécifiquement le processus de septation chez des souches sauvages, l'une étant dépourvue de plasmide et l'autre ayant été transformée par un plasmide vide. Ces souches ont été traitées pour cela pendant trois heures à la Céphalexine. Les bactéries traitées présentaient bien des cellules en forme de X et de Y comparables à celles rencontrées chez les mutants de surexpression mais en nombre réduit, en fait la majeure partie des cellules observées sont allongées et pourvues d'un renflement central. Il est possible qu'un traitement plus long aboutisse à un morphotype identique à celui des mutants, si les renflements observés sont le stade précoce de la formation d'un branchement. Il serait intéressant de traiter les cellules à la Céphalexine pendant 6 heures au moins, ce laps de temps permettant aux cellules d'effectuer plus d'un cycle cellulaire.

Chez *C. crescentus*, la réplication de l'ADN est couplée à la septation qui débute une fois la réplication de l'ADN initiée. Une inhibition de la réplication de l'ADN abouti à la formation de cellules présentant un phénotype comparable à celui qui résulte d'une inhibition de septation. DivK intervient dans la protéolyse de CtrA ⁹. Les bactéries mutantes *divKcs* placées sous conditions restrictives présentent un aspect de filamenteux. Une quantification du contenu en ADN de cette souche sous conditions restrictives révèle que les bactéries sont en majorité pourvues d'un chromosome en exemplaire unique. Par contre, la même analyse sur une souche *ctrA 40Its* qui présente également un phénotype filamenteux en condition restrictive révèle la présence par cellule de plusieurs exemplaires du chromosome ¹, cette augmentation de nombre de Chromosome peut s'expliquer par le fait que CtrA, qui n'est plus fonctionnel en condition restrictive, ne peut plus inhiber la réplication de l'ADN. Une combinaison des techniques de quantification du contenu en ADN et de marquage des septa nous permettrait de déterminer si le phénotype particulier observé est dû à un problème de septation ou de réplication.

L'observation au MEB de *Brucella* traitées à la Céphalexine révèle une grande homogénéité dans l'aspect global des cellules (**figure 20** du résultats et discussion), un effet qui suggère la possibilité d'utiliser la Céphalexine pour synchroniser des *Brucella* en culture, ce qui nous permettrait via Western blotting de déterminer les moments du cycle aux cours desquels CtrA est protéolysé mais aussi à quel moment *clpP* est produit.

Pour poursuivre avec l'étude de la protéolyse de CtrA, nous pourrions tenter d'élaborer un mutant conditionnel ClpX qui nous permettrait de savoir si cette protéine intervient comme c'est le cas chez *C. crescentus* dans la protéolyse de CtrA. Un mutant conditionnel DivK nous permettrait quant à lui d'établir si DivK est lié à la protéolyse de CtrA chez *Brucella*.

Nous pourrions tester la viabilité des mutants de surexpression par l'emploi du kit live/dead (Bac light viability kit). Ce test permet de distinguer de manière quantitative les bactéries mortes des bactéries vivantes au sein d'un même échantillon. Le principe de ce test repose sur la différence d'incorporation par les cellules bactériennes mortes ou vivantes, entre deux fluorochromes, le SYTO 9 green et l'iodure de propidium.

Enfin, pour s'assurer de façon définitive que le sérum dirigé contre DivK ne l'est pas pour une autre protéine, nous pourrions élaborer un plasmide comportant la séquence encodant DivK fusionnée avec une séquence encodant une autre protéine. Deux tests par SDS-PAGE et Western blotting, l'un en utilisant le sérum anti-DivK, l'autre en utilisant le sérum dirigé contre la protéine fusionnée à DivK, permettraient de vérifier la spécificité du sérum dirigé contre DivK.

V. Matériels et méthodes

V.1. Matériels

V.1.1. Souches bactériennes et plasmides

V.1.1.A. Souches bactériennes

E.coli DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation, dans les différentes étapes de clonage. Son génotype est le suivant : F^- , $mcrA \Delta \square mrr-hsdRMS-mcrBC$, $\square 80dlacZ \square lacX74$, $endA1$, $recA1$, $deoR \square (ara, leu) 7697$, $araD139$, $galU$, $galK$, $nupG$, $rpsL \lambda$.

Brucella melitensis

La souche de *B. melitensis* 16M Nal^R est représentative de l'espèce *B. melitensis* 16M est une souche de phénotype lisse, l'agglutination se produit avec un anti-sérum M. Cette souche est résistante à l'acide nalidixique (Nal^R). Elle a été reçue de A. MacMillan et a été isolée sur le terrain en 1955.

B. abortus

La souche de *Brucella abortus* 544, CO_2 indépendante et résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) a été reçue du Dr. J.-M. Verger, INRA, Nouzilly, France.

V.1.1.B. Plasmide

PBBR1mcs1

Ce plasmide de 4707 pb, possède le gène *cat* permettant la résistance au chloramphénicol et une région appelée *oriT* correspondant à la région requise pour le transfert du plasmide. Il contient également l'origine de réplication REP, qui est compatible avec la machinerie de réplication de *Brucella*. Il peut également se trouver en présence de plasmides contenant d'autres origines de réplication comme ColE1 et p15A. Un site multiple de clonage (*mcs*) est inclus dans le gène *lacZ'*, ce qui permet de cribler rapidement les plasmides recombinants via un test blanc/bleu en présence de X-Gal. Ce plasmide a un faible taux de réplication (10 à 15 copies par cellules) (Kovach, *et al.*, 1994) (**figure 23**).

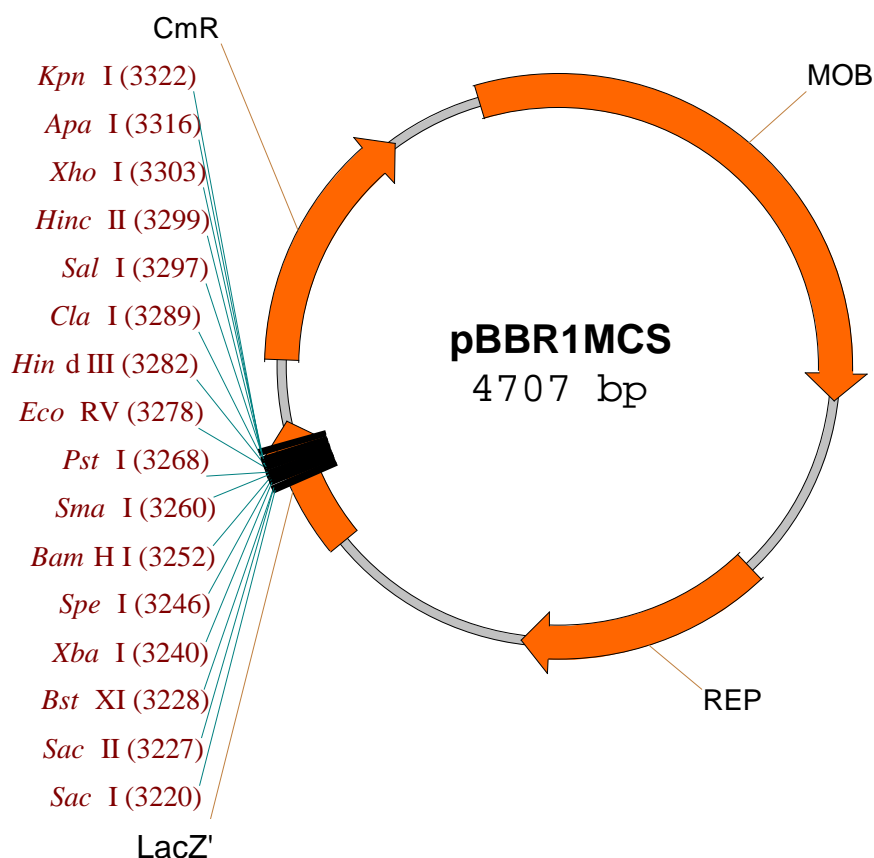


Figure 22. Représentation du plasmide pBBR1-MCS

V.1.2. Antibiotiques et milieux de culture

V.1.2.A. Antibiotiques

Acide nalidixique (Nal) : 25 µg / ml

Chloremphénicol (Cm) : 20 µg / ml

V.1.2.B. Milieux de culture

Milieu riche pour E. coli :

Milieu LB (Luria Bertani) :

- pour 100ml : -1 g d'hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL)

-0,5 g de NaCl

-0,5 g de Yeast extract

-Pour obtenir du LB solide, mettre de l'agar 1,5%

-Autoclaver 20 minutes à 120°C.

-Refroidir le milieu à une température inférieure à 55°C puis additionner des antibiotiques ou autres additifs avant coulage sur boîtes de Pétri.

Milieux riches pour Brucella

Le milieu 2YT

- pour 100 ml:
- 0,5g NaCl
 - 1g Yeast Extract (2x plus que pour Luria Betani)
 - 1g Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL)
 - Pour du 2YT solide, ajouter 2g d'agar.
 - Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C.

V.2. Méthodes

V.2.1. Techniques relatives à l'ADN

V.2.1.A. Transformation bactérienne

Transformation par choc thermique

Préparation de cellules CaCl₂ compétentes :

- Les cellules DH10B sont rendues compétentes par un traitement avec une solution de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid afin de rendre la membrane plasmique perméable à l'ADN.
- Lancer une préculture: ensemencer 20 ml de LB avec une colonie de cellules DH10B et laisser incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin, inoculer 400 ml de LB avec 20 ml de la préculture et incuber à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,3 à 0,4.
- Laisser la culture 20 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 4000 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les bactéries culotées dans 50 ml final de CaCl₂ 50 mM + glycérol 15% stérile et froid.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 80 ml final de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid.
- Laisser 20 minutes sur glace.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 rpm.
- Resuspendre dans 12 ml final de CaCl₂ + glycérol 15%.
- Aliquoter en 0,4 ml et stocker à -80°C.

Transformations de bactéries CaCl₂ compétentes

Le but de l'opération est de faire pénétrer un plasmide à l'intérieur d'une bactérie dont la membrane a été rendue perméable à l'ADN par le traitement au CaCl₂. La souche utilisée pour cette manipulation est *E. coli* DH10B.

- Ajouter 1 à 10 µl de la solution contenant le plasmide (mélange de ligation, ADN préparé, etc.) à 100 µl de cellules compétentes de la souche désirée.
- Laisser sur glace pendant environ 30 à 45 minutes.
- Réaliser un choc thermique : incuber les cellules à 42°C pendant 2 minutes.
- Ajouter 1 ml de milieu LB.
- Incuber 30 à 60 minutes à 37°C, pour permettre aux bactéries de régénérer leurs membranes.
- Etaler de 50 à 100 µl de cellules sur LB Agar contenant un milieu sélectif.
- Placer à 37°C pour la nuit.

V.2.1.B. Amplification d'ADN par PCR

La PCR (Polymerase Chain Réaction) permet l'amplification de fragments d'ADN.

L'ADN doit être dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 bases complémentaires des séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable est alors utilisée pour synthétiser un brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce. Les différentes enzymes disponibles au laboratoire sont la Taq (Biotools), Pwo (Roche) et l'Expand (mélange de Taq et de Pwo) (Roche). Les deux dernières sont des enzymes proof-reading. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation correspond à la température de melting (T_m) des amorces. La T_m se calcule de la façon suivante : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. De plus, les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter l'amplification non spécifique, que l'amorce contienne un excès de G/C à l'extrémité 5' et au centre et que les 2 ou 3 dernières bases de l'extrémité soient A/T.

Protocole :

- Réaliser dans un microtube le mélange de réaction suivant:
 - 5 µl de tampon d'ADN polymérase (spécifique de l'enzyme utilisée) 10X concentré
 - 2 µl de dNTP 10 mM
 - 10 à 100 µl d'ADN génomique
 - 1 µl de primer A à 100 pmol/µl
 - 1 µl de primer B à 100 pmol/µl
 - 1 µl d'enzyme (2 U/µl) (Taq polymérase / Expand ou Pwo pour une amplification proof-reading)
 - Porter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile
- Programmer l'appareil à PCR comme suit:
 - Dénaturation de 5' à 95°C.
 - 30 cycles d'amplification présentés comme suit:
 - 1 min. à 95°C pour la dénaturation

1 min. à X°C pour l'hybridation (X est inférieur ou égal à la température d'hybridation des oligonucléotides)
Y sec. à 72°C pour la polymérisation (68°C pour l'Expand) (Y=1minute / kb à amplifier)

- Elongation finale de 10 minutes à 72°C.

- Déposer 1/10^e du volume sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C.

- Afin de purifier les produits d'amplification, le kit Gibco-BRL (rapid PCR purification system) fut utilisé.

V.2.1.C. Extraction d'ADN plasmidique

Ces techniques permettent d'isoler et de purifier les plasmides produits par des bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

Tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez E. coli

S1 Tampon de resuspension : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNase A 100 µg /ml, pH8,0. Se conserve à 4°C.

S2 tampon de lyse : 200 mM NaOH, 1% SDS . Se conserve à t° ambiante.

S3 stoppe la lyse : 2,8M Kac, pH5,2. S3 se conserve à 4°C.

Préparation d'ADN en petite quantité (minipréparation d'ADN plasmidique)

Chez E.coli

-Lancer une préculture :ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.

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

-Centrifuger 1,5 ml de la culture liquide dans un eppendorf à une vitesse de 5000 rpm pendant 5 minutes. Ensuite éliminer le surnageant.

-Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de S1.

-Ajouter 300 µl de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement par inversion (retournement), incuber 5 minutes maximum à température ambiante.

-Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement par inversion, incuber 10 minutes sur glace.

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

-Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Agiter activement.

-Centrifuger 15 minutes à 4°C à 12500 rpm. Eliminer le surnageant.

-Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid (4°C) pour le lavage.

-Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm. Eliminer prudemment le surnageant

-Sécher le culot.

-Resuspendre dans 20µl d'H₂O distillée stérile.

-Stocker à -20°C.

V.2.2. Techniques relatives aux protéines

V.2.2.A. Analyse de l'expression d'une protéine par western blotting

Préparation d'extraits protéiques totaux

- La veille, ensemencer 10 ml de 2YT contenant les antibiotiques appropriés avec les souches de *Brucella* d'intérêt. Incuber 24 heures à 37°C sous agitation.
- Inactiver les *Brucellae* 2 heures à 80°C.
- Centrifuger les cultures 10 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
- Laver 2X les cellules dans 5 ml de PBS.

Disruption de cellules :

le disrupteur de cellules utilisé est le Cell Disruption, one shot, Constant Systems LTD. Il produit l'éclatement des bactéries par changement rapide de pression et permet ainsi l'obtention d'une solution contenant toutes les protéines qui constituaient la bactérie.

Fonctionnement du cell disruptor :

la pression utilisée pour l'éclatement d'une cellule de *Brucella* est de 1 kilobars. Environ 6 ml d'échantillon sont introduits à l'intérieur du cylindre à haute pression. Lorsque la haute pression désirée est atteinte par l'appareil, le piston descend. Ce piston va comprimer l'échantillon et l'éjecter à une très grande vitesse à travers un orifice étroit. Le transfert rapide de l'échantillon du compartiment sous haute pression vers le compartiment à basse pression entraîne l'éclatement des cellules de l'échantillon (disruption). Lorsque l'échantillon sort de l'orifice, il heurte la tête du disrupteur et redescend de manière radiale le long des parois qui constituent alors une large surface de refroidissement ce qui permet la condensation du produit de la disruption.

En pratique :

- Laver une fois le disrupteur à l'alcool puis 3 fois à l'eau.
- Déposer l'échantillon dans la chambre inférieure, appliquer la pression et récupérer l'échantillon disrupté.
- Rincer le disrupteur 3 fois à l'eau puis 1 fois à l'alcool (laisser l'alcool dans l'appareil jusqu'à la prochaine utilisation).

Dosage protéique

Méthode Bradford

- Solution : - 0,1 g de coomassie Brilliant Blue G-250
- 50 ml d'éthanol 96%

- 100 ml d'H₃PO₄ 85% (acide orthophosphorique liquide)
- 50 ml H₂O.

- Filtrer et diluer 5X la solution avant utilisation.

- Prendre le BSA (Bovine Serum Albumin) à 10 mg/ml et le diluer 100X.
- Réaliser différentes dilutions du BSA :

$$1 \text{ } \square \text{ l} + 99 \text{ } \square \text{ l H}_2\text{O} = 100 \text{ ng}$$

$$2 \text{ } \square \text{ l} + 98 \text{ } \square \text{ l H}_2\text{O} = 200 \text{ ng}$$

5 μ l + 95 μ l H₂O = 500 ng

10 μ l + 90 μ l H₂O = 1 μ g

20 μ l + 80 μ l H₂O = 2 μ g

50 μ l + 50 μ l H₂O = 5 μ g

100 μ l + 0 μ l H₂O = 10 μ g

-Réaliser une dilution des échantillons.

-Ajouter 900 μ l de Bradford 1X filtré. Incuber 10 min à T° ambiante.

-Lire la D.O. à 595 nm contre Blanc. Pour l'échantillon, réaliser au moins deux mesures.

-Réaliser un graphique avec l'échelle de calibration et calculer la concentration de l'échantillon.

Méthode BCA

La méthode de dosage à l'acide bicinchoninique dite méthode BCA (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA) est utilisée pour évaluer la quantité de protéines dans les extraits totaux réalisés.

Protocole :

- Réaliser une courbe étalon.

- Diluer la BSA (Bovine Serum Albumine) de concentration stock connue (10 mg/ml) afin d'obtenir les concentrations suivantes :

- 1mg/ml
- 0,8 mg/ml
- 0,6 mg/ml
- 0,4 mg/ml
- 0,2 mg/ml
- 0,1 mg/ml
- 0 mg/ml (blanc)

- Diluer nos échantillons protéiques 2X, 4X, 8X et non-dilué.

- Ajouter à chaque dilution 200 μ l du mélange de réactifs A/B suivant le rapport 50 :1

- Incuber 30 minutes à 37°C

- Mesurer la densité optique à 550 nm.

- Tracer la droite étalon en plaçant sur l'axe des ordonnées les concentrations protéiques de la BSA et sur l'axe des abscisses les DO correspondantes.

- Connaissant la DO de chaque échantillon, calculer leur concentration sur base de la droite étalon.

Solutions et matériels :

- BSA : Solution stock 10X

- Réactif BCA :

- 1 volume de réactif B : CuSO₄ (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA)
- 50 volumes de réactif A : BCA protein assay reagent A (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA)

Western blotting (immunoblotting)

Le Western blotting permet de détecter une protéine particulière au sein d'une solution constituée d'un mélange hétérogène de matériel protéique. Cette méthode combine l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps.

- Dans un premier temps, les protéines de la solution sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS qui dénature les protéines.
- Ensuite, les protéines sont fixées sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert depuis le gel.

Électrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) ou "SDS-PAGE" est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire dans un réseau tridimensionnel formé par la des chaînes de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysées par du TEMED (tétraméthylhydramide). Les gels de polyacrylamide ont l'avantage d'avoir une taille de pores sélectionnable, puisque la concentration totale en acrylamide est inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à séparer permet la rupture des ponts disulfures, formant des chaînes polypeptidiques constitutives complètement dépliées.

Le SDS est un détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, il leur confère une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin (**figure 23**).

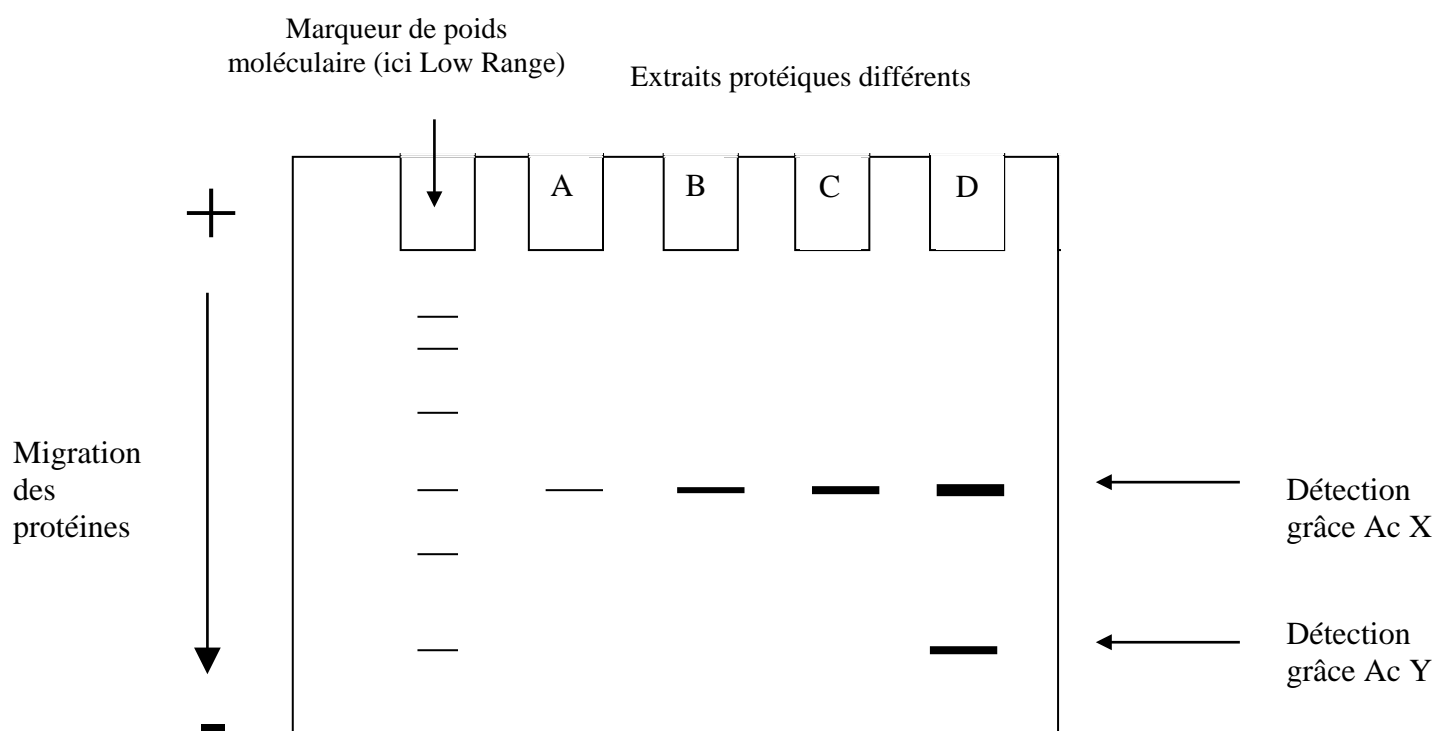


Figure 23. Gel de polyacrylamide et migration de protéines

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation, et le running gel ou gel de séparation.

Préparation du gel.

Solution :

- Polyacrylamide 30% : - Acrylamide : 29,2%
- Bisacrylamide : 0,8%
- Ajouter H₂O
- *Cette solution est filtrée et stockée à 4°C*

Préparation de Running Gel à 12% de polyacrylamide :

- Pour 30 ml : 9,9ml d'eau
- 12 ml de polyacrylamide 30%
- 7,5 ml de Tris 1,5M (pH8,8)
- 0,3 ml de SDS 10%
- 0,3 ml d'APS 10%
- 12 µl de TEMED
- *Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support.*
- *Déposer 1ml d'isopropanol sur le gel pour permettre sa polymérisation, en effet l'oxygène de l'air inhibe la polymérisation.*
- *Lorsque le gel est polymérisé, enlever l'isopropanol par inversion du montage.*

Préparation du Stacking Gel :

- Pour 10 ml : 3,3 ml d'eau
- 1 ml d'acrylamide
- 1,5 ml de Tris 0,5 M pH6,8
- 0,06 ml de SDS 10%
- 0,06 ml d'APS 10%
- 6 µl de TEMED
- *Le Stacking Gel est coulé une fois que le Running Gel est polymérisé.*

Après avoir coulé le Stacking Gel, insérer le peigne entre les deux plaques de verre du montage. Laisser polymériser puis retirer délicatement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1X), puis déposer les échantillons.

Composition du SDS PAGE buffer 10X : 30,35gr de Tris base
144gr de Glycine
10gr de SDS
Amener le volume à 1 litre

Préparation des échantillons :

Le volume correspondant à la quantité de protéines à charger est fonction de la concentration en protéines de chacun des extraits. Il faut ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont la concentration-stock est 5x. On veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes.

Faire bouillir les échantillons 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines.

Tampon de chargement protéique 5X (pour 20 ml) :

10 ml de Glycérol 50%

5 ml de β -mercapto-éthanol 5%

2 g de SDS 10%

13 ml de Tris 1,5M pH6,8

0,0005 g de Bleu de Bromophénol 0,005%

Chargement des échantillons :

Un puits est utilisé par un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad low range Polypeptide Standart) dont les différentes bandes correspondent au PM.

Migration :

L'appareil est fixé sur 40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts.

La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la distance de séparation entre les différentes protéines du marqueur protéique.

Électrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose formant ainsi une réplique du gel (**figure 24**).

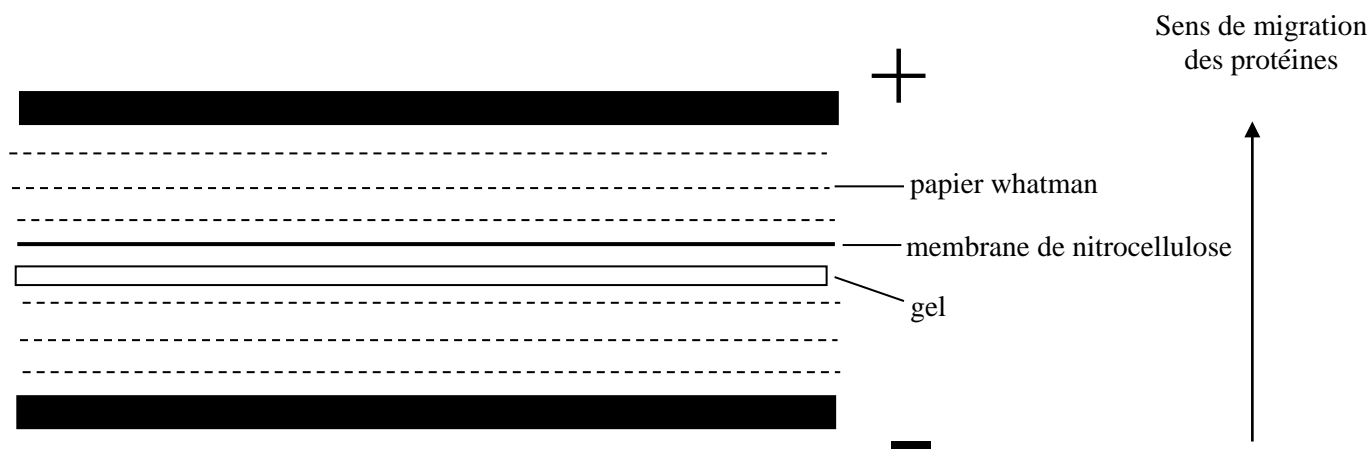


Figure 24. Technique de transfert « semi-sec » basée sur le champ électrique produit entre deux électrodes.

Protocole :

- Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman (1 mm d'épaisseur) aux dimensions du gel.
- Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert.
- L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (semi dry).
- Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être environ égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V.
- La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent) et cette durée doit tenir compte de la thermorésistance des protéines.

Solutions et matériels :

Tampon de transfert (pour 1000 ml) :

Tris	48mM
Glycine	39mM
SDS	0,037%
Méthanol	200 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée

- Membrane de nitrocellulose : Hybond ECL
- Appareil de transfert : Trans-Blot SD Semi Dry Transfer@
- Whatman Chromatography paper

Ponceau

La qualité du transfert ainsi que celle du chargement en protéines dans les différentes pistes peut être visualisée par une coloration aspécifique des protéines au rouge ponceau. Celui-ci colore les protéines sur la membrane de nitrocellulose. Cette coloration s'effectue par simple immersion de la membrane dans le colorant, suivie immédiatement par des rinçages à l'eau distillée afin d'ôter l'excédent de colorant. Cette coloration est ensuite éliminée par un rinçage au PBS 1X.

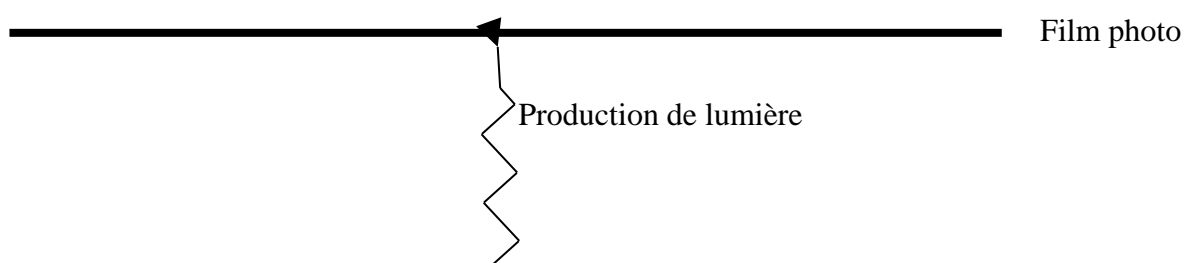
Solution :

- Ponceau 1X : Dissoudre 0,5g de Ponceau S dans 1 ml d'acide acétique glacial, amener à 100 ml avec de l'eau.

Immunodétection

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe.

Un anticorps secondaire, qui reconnaît l'anticorps primaire permet de détecter la protéine d'intérêt étant donné qu'il est conjugué à la peroxydase, enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière (**figure 25**).



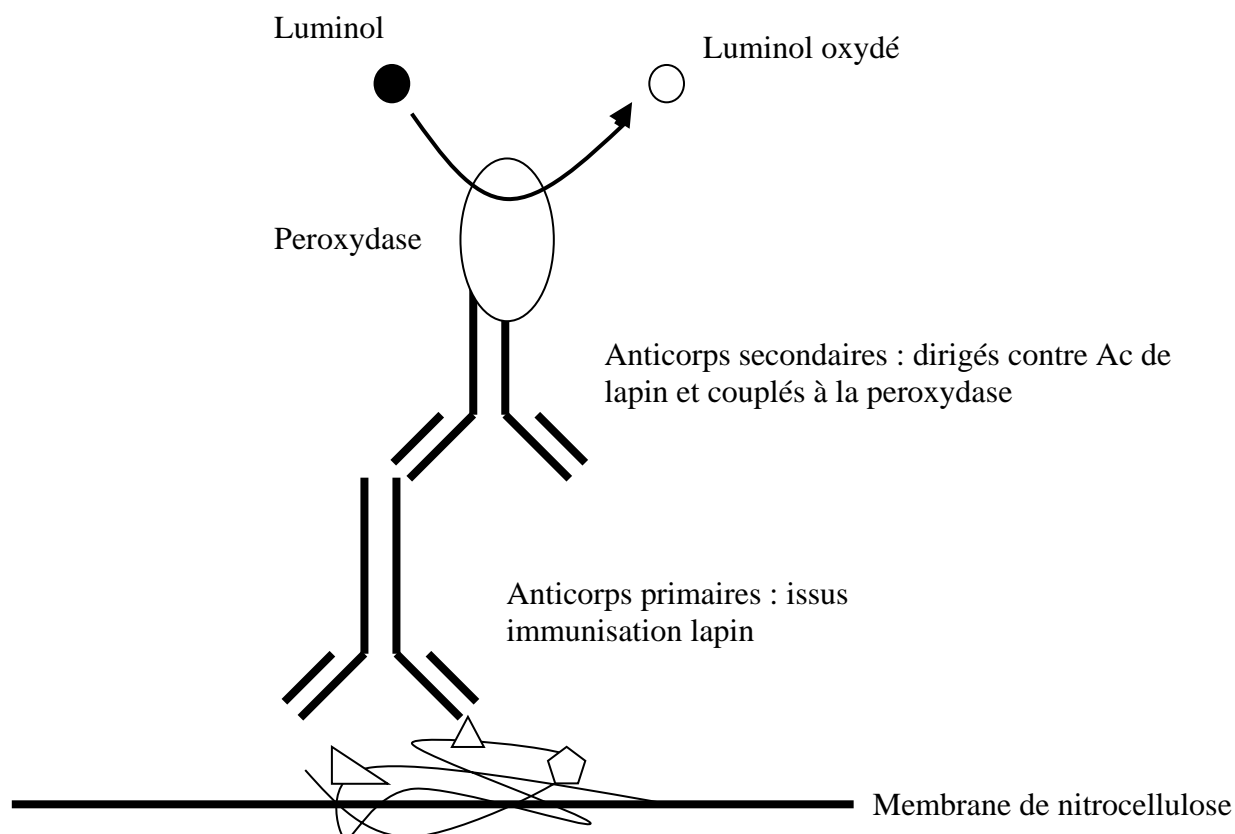


Figure 25. Méthode de détection en deux étapes: un anticorps primaire spécifique à un épitope est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui produit de la lumière.

Etape de " blocking " :

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Pour cela, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans une solution de Blocking contenant des protéines de lait (5%). Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope.

Solution de Blocking : PBS 1X
Lait en poudre 5%
Tween 0,05%

PBS 20X (solution stock 20X) : KH_2PO_4 14 mM
 Na_2HPO_4 80 mM

NaCl	1,38 M
KCl	27 mM

Enlever la solution de blocking rincer 1X 5min avec du PBS-Tween 0,05%.

PBS tween 0.05% (500 ml) : 50 ml de PBS stock 10X
 450 ml d'eau H₂O
 250µl de Tween

Mise en présence de l'anticorps primaire :

- La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS contenant un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt, pendant une heure sous agitation.

Les dilutions de ces anticorps primaires correspondent au titre défini pour chacun d'eux.

- faire 5 lavages de 5 minutes avec du PBS-Tween 0,05%.

Mise en présence de l'anticorps secondaire :

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine F(c) de l'anticorps primaire. Ils est conjugué à la peroxydase, enzyme permettant l'émission de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols.

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de singe anti-souris HRP (Amersham)

- Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par la firme le commercialisant, sous agitation pendant une heure.

- Faire deux rinçages puis laver 5 X 3 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL S1 et S2 (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

- La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal des deux solutions ECL: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en cm² x 0.125 ml.

Mélanger S1 et S2 et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées.

-Incuber durant une minute.

- Eliminer la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique pendant différentes temps en fonction de l'intensité du signal: 10 secondes, 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes.

- Les bandes d'intérêt sont révélées par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes.

- Passer le film une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour renseigner de l'échelle de taille.

V.2.3. Techniques relatives à la caractérisation phénotypique des bactéries

V.2.3.A Microscopie optique

Classique

Coloration de Gram

Cette coloration permet de distinguer deux types de bactéries sur base de la structure de leurs parois : les bactéries dites à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. Les bactéries sont d'abord colorées au violet de gentiane. Ce colorant s'accumule chez les deux bactéries, mais après traitement au lugol, seules les bactéries à Gram positif gardent le colorant retenu par la couche de muréine. Une contre-coloration permet de colorer les bactéries à Gram négatif en rouge.

Protocole:

- Déposer une goutte d'H₂O sur une lame porte-objet
- Prélever quelques bactéries de la colonie à examiner
- Déposer ces bactéries dans la goutte et étaler sur la lame
- Laisser sécher
- Couvrir la lame d'alcool et flamber, laisser refroidir
- Couvrir de violet de gentiane (1minute)
- Eliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (30 secondes)
- Rincer à l'eau, décolorer prudemment à l'éthanol, rincer de nouveau à l'eau
- Contre colorer à la safranine (1 minute)
- Sécher et observer au microscope à immersion.

V.2.3.B. Microscopie électronique

Le pouvoir de résolution d'un microscope est au mieux égal à la longueur d'onde du rayonnement qu'il utilise. Un microscope photonique permet de distinguer des points distants d'environ un micromètre. Si on utilise des électrons accélérés comme rayonnement, le pouvoir de résolution devient jusqu'à mille fois plus grand.

Microscopie Électronique à Balayage

Le microscope électronique à balayage permet d'examiner les détails du relief d'un échantillon. Son pouvoir de résolution est de l'ordre de 10 nm.

Préparation des échantillons

Pendant son examen au microscope à balayage, l'échantillon est soumis à deux contraintes : le vide et le bombardement par des électrons.

Les échantillons qui ne sont pas parfaitement secs tels les échantillons constitués de matériel biologique (bactéries par exemple) supportent mal ces contraintes, le liquide qu'il contient s'évapore lors du passage sous vide ce qui entraîne une déformation importante de l'échantillon.

Pour éviter cette déformation lors du séchage, l'échantillon est déshydraté par passage dans des bains d'alcool (éthanol) :

- 2 fois 5 minutes dans de l'éthanol 25%
- 2 fois 5 minutes dans de l'éthanol 50%
- 2 fois 10 minutes dans de l'éthanol 70%
- 2 fois 10 minutes dans de l'éthanol 90%
- Puis, les échantillons sont laissés dans de l'éthanol 100%.

L'éthanol sera ensuite remplacé par du CO₂ liquide dans une cuve sous pression. La température de la cuve est amenée à 38°C pour dépasser le point critique du CO₂. Le CO₂ liquide se gazéifie dans sa masse, c'est à dire sans interface liquide/gaz. Il n'y a pas de tension sur l'échantillon lors de la disparition du liquide et donc pas de déformation.

Pendant qu'on l'examine, l'échantillon subit un bombardement de charges électriques. S'il est isolant électrique, il va se charger négativement et repousser le faisceau d'électrons. Pour éviter cela, on dépose sur l'échantillon une fine couche d'or qui va éliminer les charges négatives en les conduisant vers la masse du microscope.

Fixation des Brucellae sur coverslips et inactivation.

Préparer les coverslips pour la fixation des bactéries :

- Mettre les coverslips dans les puits d'une plaque adaptée (boite falcon).
- Ajouter dans chacun des puits 500 μ l d'une solution de poly-L ou D-lysine 0,05 mg/ml en eau et incuber une heure à température ambiante.
- Aspirer le surnageant et, sous hotte, prélever des *Brucella* depuis les milieux de cultures solides au moyen de cure-dents stériles et les resuspendre dans du PBS 1X en eppendorf.
- Centrifuger 10 min à 1500 rpm.
- Aspirer le surnageant et resuspendre à nouveau dans du PBS 1X à raison de 500 μ l par culot.
- Placer la suspension de bactéries dans les puits, sur les coverslips.
- Centrifuger 10 min à 1000 rpm.
- Éliminer le surnageant et ajouter 600 μ l de paraformaldéhyde (PFA) 4%, laisser agir pendant 20 minutes.
- Éliminer le surnageant et le remplacer par 600 μ l de PBS 1X.
- Conserver la boîte à 4°C.

VI. Bibliographie

1. Quon, K. C., Marczyński, G. T. & Shapiro, L. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83-93 (1996).
2. Andersson, S. G. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-40 (1998).
3. Barnett, M. J., Hung, D. Y., Reisenauer, A., Shapiro, L. & Long, S. R. A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**, 3204-10 (2001).
4. Lang, A. S. & Beatty, J. T. Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 859-64 (2000).
5. Bellefontaine, A. F. et al. Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**, 945-60 (2002).
6. Domian, I. J., Reisenauer, A. & Shapiro, L. Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6648-53 (1999).
7. Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-20 (1999).
8. Domian, I. J., Quon, K. C. & Shapiro, L. Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* **90**, 415-24 (1997).
9. Hung, D. Y. & Shapiro, L. A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13160-5 (2002).
10. Ryan, K. R., Judd, E. M. & Shapiro, L. The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J Mol Biol* **324**, 443-55 (2002).

11. Hoch, J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165-70 (2000).
12. Stock, J. Signal transduction: Gyating protein kinases. *Curr Biol* **9**, R364-7 (1999).
13. Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**, 115-20 (1999).
14. Alex, L. A. & Simon, M. I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* **10**, 133-8 (1994).
15. West, A. H. & Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-76 (2001).
16. Russo, F. D. & Silhavy, T. J. The essential tension: opposed reactions in bacterial two-component regulatory systems. *Trends Microbiol* **1**, 306-10 (1993).
17. Dutzler, R. et al. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure Fold Des* **7**, 425-34 (1999).
18. Stephenson, K. & Hoch, J. A. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol Microbiol* **46**, 297-304 (2002).
19. Fabret, C., Feher, V. A. & Hoch, J. A. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**, 1975-83 (1999).
20. Jiang, M., Shao, W., Perego, M. & Hoch, J. A. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **38**, 535-42 (2000).
21. Michaux-Charachon, S. et al. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol* **179**, 3244-9 (1997).
22. O'Callaghan, D. (ed. Press, A.) 1991-2010 (2001).
23. Blasco, J. M. & Diaz, R. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* **342**, 805 (1993).
24. Gober, J. W. & Marques, M. V. Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* **59**, 31-47 (1995).
25. Jensen, R. B., Wang, S. C. & Shapiro, L. Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 167-76 (2002).
26. Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M. & Shapiro, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**, 2144-8 (2000).

27. Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L. & Marczynski, G. T. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 120-5 (1998).
28. Stephens, C. M., Zweiger, G. & Shapiro, L. Coordinate cell cycle control of a *Caulobacter* DNA methyltransferase and the flagellar genetic hierarchy. *J Bacteriol* **177**, 1662-9 (1995).
29. Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E. G., Sommer, J. M. & Newton, A. A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10297-301 (1992).
30. Wang, S. P. A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Developmental Biology*, 630-634 (1992).
31. Wu, J., Ohta, N., Zhao, J. L. & Newton, A. A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13068-73 (1999).
32. Wheeler, R. T. & Shapiro, L. Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation *Mol Cell* **4**, 683-94 (1999).
33. Jacobs, C. Ausmees, N. Cordwell, S. J. Shapiro, L. Laub, M. T. Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol Microbiol* **47**, 1279-90 (2003).
34. Shapiro, L., McAdams, H. H. & Losick, R. Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**, 1942-6 (2002).
35. Robertson, G. T. et al. The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J Bacteriol* **182**, 3482-9 (2000).
36. Latch, J. N. & Margolin, W. Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**, 2373-81 (1997).
37. Kohler, S. Porte, F. Jubier-Maurin, V. Ouahrani-Bettache, S. Teyssier, J. Liautard, J. P. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol* **90**, 299-309 (2002).

