



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation du régulateur de réponse Ple D chez *Brucella Melitensis*

Pouyez, Jenny

Award date:
2005

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTERISATION DU REGULATEUR DE REPONSE P_{LE D} CHEZ *BRUCELLA*
*MELITENSIS***

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

Jenny POUYEZ

Juin 2005

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>

CARACTERISATION DU REGULATEUR DE REPONSE PleD CHEZ *BRUCELLA* *MELITENSIS*

POUYEZ Jenny

Résumé

Brucella, bactérie membre des α -protéobactéries est un pathogène intracellulaire pour les animaux mais aussi pour les hommes. Cette bactérie possède un régulateur de réponse appelé PleD muni d'un domaine GGDEF.

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation du régulateur de réponse chez *Brucella*, nous faisons appel aux connaissances établies au sujet de PleD chez un autre membre des α -protéobactéries à savoir *Caulobacter crescentus*. Celle-ci constitue un modèle de différenciation procaryotique. PleD fait partie d'un système de transduction du signal à deux composants contrôlant la différenciation d'une cellule flagellée en cellule pédonculée. Etant un régulateur de réponse contenant un domaine Asp receveur, il est évident que son activité est régulée par des histidines kinases, en l'occurrence PleC et DivJ. Celles-ci agissent de façon directe sur l'état de phosphorylation de PleD, ce qui gouverne sa localisation subcellulaire.

Son domaine effecteur est de façon surprenante un domaine GGDEF ; en effet, habituellement ce domaine n'est pas associé à un régulateur de réponse. Son activité chez *C. crescentus* contrôle l'éjection du flagelle et la synthèse du pédoncule au cours du cycle cellulaire. D'un autre côté, il a été montré que chez *Rhizobium*, l'activité de ce domaine GGDEF contrôle la synthèse de cellulose.

Trois approches vont nous permettre de caractériser ce régulateur de réponse chez *B. melitensis* 16M. Premièrement la construction d'un délétant *pleD* suivie de l'observation des phénotypes sur la virulence et le flagelle. Deuxièmement, la construction d'outils plasmidiques qui serviront pour la complémentation et la localisation subcellulaire. Et enfin un test double hybride qui permettra la mise en évidence d'interactions protéiques entre des histidine kinases potentiellement impliquées dans le contrôle de son état de phosphorylation.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur : Prof. X. De Bolle

Co-promoteur : Prof. J.-J. Letesson

Je voudrais tout d'abord remercier les professeurs Xavier De Bolle (promoteur), Jean-Jacques Letesson (co-promoteur), Jean Vandenhoute et Eric Depiereux pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Merci à vous de m'avoir soutenue et encouragée durant ce mémoire. Je ne pourrais pas non plus terminer ce mémoire sans remercier Régis Hallez et Johann Mignolet, mes tuteurs. Merci pour votre patience, vos conseils, votre disponibilité et vos encouragements. Merci aussi pour tous ces bons moments passés ensemble.

Je remercie Isabelle Housen, Catherine Lambert, Yves Poumay et Jean Vandenhoute, membres du jury, pour la lecture critique de ce mémoire.

Je remercie aussi Richard pour la patience dont il a fait preuve lors d'explications pour le double hybride, mais aussi pour la bonne humeur qu'il dégage.

Merci encore à tous ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre durant ce mémoire : ptite Marie, pour tes conseils et ton aide précieuse lors des infections en souris, Nico pour tes encouragements et tes conseils sur le western blot. Johann, encore merci pour m'avoir laissée m'installer dans ton bureau et pour toutes nos discussions philosophiques (tu as compris maintenant que la poudre de Perlimpinpin n'existait pas ?!). John, merci pour ton humour décapant. Merci à ceux que je n'ai pas encore cités : Virginie, Gd Marie, Sophie, Sandrine, Julien, Alexandre, Zette, Rose-May, Rose-Maria, Bernard et Christian, je ne pouvais pas vous oublier dans ces remerciements. Merci aussi à tout le clan GEMO.

Merci aussi aux autres stagiaires du labo, Marie G., Gulcan, Séverine et Sylvie, merci pour le soutien que vous m'avez donné et pour toutes nos discussions.

Merci aux autres mémorantes Bérengère, Caroline, Yéliz, Florence, Marie. Bérengère, ton amitié m'est très précieuse et j'espère qu'elle durera encore très longtemps.

Enfin, je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont permis de faire ces études, merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Merci aussi à ma petite sœur d'être toujours présente pour moi. Je termine ces remerciements par la personne la plus chère à mon cœur, Mike, sans toi je n'en serais pas là, merci de m'avoir encouragée, supportée, merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu m'apportes, et surtout n'oublie jamais que je t'aime.

Liste des abréviations

Abrév.	Nom complet	Explication complémentaire
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazole	Inhibiteur de His3
a.a.	Acides aminés	
AD	Activating domain	Domaine de transactivation de Gal4
Amp	Ampicilline	Antibiotique
Arg	Arginine	Acide aminé
Asp	Aspartate	Acide aminé
BD	Binding domain	Domaine de liaison à l'ADN de Gal4
<i>bla</i>	β -lactamase	Gène conférant la résistance à l'ampicilline
BSA	Bovine serum albumin	Albumine sérique de bœuf
<i>cat</i>	Cm-acétyltransférase	Gène conférant la résistance au chloramphénicol
CDS	Coding sequence	Séquence codante d'une protéine
CFP	Cyan fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le bleu
Cm	Chloramphénicol	Antibiotique
DO	Densité optique	
Gen	Gentamycine	Antibiotique
GTP	Guanosine triphosphate	
GW TM	Gateway TM	Technique de clonage par recombinaison
HK	Histidine kinase	Acteur du système à deux composants
Hpt	Histidine phosphotransférase	Acteur du système à composants multiples
IPTG	Isopropyl-thio-galactopyranoside	Inducteur du <i>Plac</i> par inhibition de LacI
Kan	Kanamycine	Antibiotique
Kpb	Kilo paires de base	10 ³ paires de bases nucléotidiques
LB	Luria Bertani	Milieu de culture riche pour bactéries
LPS	Lipopolysaccharide	Feuillet lipidique externe de la membrane externe des bactéries Gram négatives
MOI	Multiplicity of infection	Calcul du nombre de bactéries/hôte
Nal	Acide nalidixique	Antibiotique
<i>Npt</i> ou <i>kan^R</i>	Néomycine phosphotransférase	Gène conférant la résistance à la kanamycine
ORF	Open reading frame	Phase ouverte de lecture
-P	phosphorylé	
pb	Paire de base	Deux nucléotides appariés
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique d'amplification de fragments ADN

PFA	Paraformaldéhyde	Fixateur utilisé pour l'observation sous microscope
rpm	Rotation par minutes	Unité de centrifugation
RR	Régulateur de réponse	Acteur du système à deux composants
Ser	Sérine	Acide aminé
Thr	Thréonine	Acide aminé
Trp	Tryptophane	Acide aminé
Tyr	Tyrosine	Acide aminé
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le jaune

Table des matières

INTRODUCTION -----	1
I. Avant propos -----	1
II. <i>Brucella</i> , description générale -----	1
1. <i>Brucella</i> , bactérie pathogène ^{Gorvel and Moreno, 2002;Michaux-Charachonet al., 2002} -----	1
2. Arbre phylogénétique ^{Moreno, 1998} -----	3
3. <i>Brucella</i> et son flagelle -----	3
III. PleD chez les α -protéobactéries -----	5
1. Chez <i>Caulobacter crescentus</i> -----	5
Systèmes à deux composants chez les procaryotes -----	6
2. Structure de PleD -----	8
a. Découverte de PleD ^{Sommer and Newton, 1989} -----	8
b. Identification des domaines de PleD -----	10
3. Les domaines D1 et D2 -----	11
a. Les Histidine Kinases DivJ et PleC -----	11
b. Localisation de PleD et des histidines kinases -----	11
4. Les domaines GGDEF -----	12
a. L'éjection du flagelle et la protéolyse de la protéine flagellaire FliF -----	12
b. Rôle dans la synthèse de cellulose et de biofilms ^{Romling, 2002} -----	13
c. diGMP cyclique, messenger secondaire important -----	14
d. Régulation allostérique -----	15
5. En résumé -----	16
IV. PleD chez <i>Brucella</i> -----	17
V. Objectif de ce mémoire -----	17
RESULTATS -----	18
I. Identification de PleD et des HK contrôlant potentiellement PleD chez <i>Brucella</i> spp. -----	19
II. Construction du délétant <i>pleD</i> et observation des phénotypes -----	20
1. Construction du plasmide de délétion -----	21
a. Construction du vecteur pour réaliser la délétion -----	21
b. Changement de marqueur plasmidique -----	24
2. Création des souches -----	24
a. Conjugaison dans <i>B. melitensis</i> et <i>B. abortus</i> -----	24
3. Caractérisations phénotypiques -----	27
a. Phénotype de virulence : test de survie en modèle murin -----	27
b. Phénotype morphologique : présence du flagelle -----	28
III. Construction d'outils plasmidiques -----	31
IV. Recherche de partenaires protéiques pour PleD -----	35
1. Choix de partenaires présumés et clonage des séquences codantes -----	36
2. Test d'interaction protéine/protéine -----	37
3. Résultats -----	38
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES -----	39

MATERIEL ET METHODES -----	42
I. Matériel-----	42
1. Souches et plasmides -----	42
a. Souches bactériennes -----	42
b. Souches de levures -----	42
c. Plasmides -----	42
2. Milieux de culture-----	43
a. Milieux de culture bactériens -----	44
b. Milieux de culture levuriens -----	44
3. Tampons et Solutions -----	45
II. Méthodes -----	47
1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN -----	47
a. PCR (Polymerase Chain Reaction) -----	47
b. Électrophorèse en gel d'agarose -----	48
c. Restriction sur plasmide -----	48
d. Ligation d'un plasmide -----	49
e. Purification sur colonne -----	49
f. Minipréparation de plasmide -----	49
g. Séquençage -----	49
h. Clonage Gateway™ -----	50
i. Extraction d'ADN génomique -----	50
j. Southern blot -----	51
2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries-----	52
a. Transformation bactérienne par choc thermique -----	52
b. Conjugaison -----	53
c. Coloration de Gram -----	53
d. Infection en souris BALB/c -----	54
e. Prélèvement de la rate des souris BALB/c -----	54
3. Techniques relatives à l'utilisation de levures-----	55
a. Test d'interaction protéique en double hybride -----	55
b. Transformation par choc thermique -----	55
c. Technique de la réplique velours -----	56
d. Coloration X-GAL en surcouche -----	56
4. Techniques relatives à l'utilisation de protéines : Western blot-----	56
a. Préparation des échantillons -----	56
b. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) -----	56
c. Transfert sur membrane de nitrocellulose -----	57

d. Immunodétection ou western blot proprement dit -----	58
e. Révélation -----	58
5. Techniques relatives à l'utilisation de la microscopie -----	59
a. Préparations des échantillons -----	59
b. Coloration des échantillons -----	59
BIBLIOGRAPHIE -----	60

INTRODUCTION

I. Avant propos

Les régulateurs de réponse ont des fonctions diverses chez les procaryotes. Ils permettent notamment l'homéostasie, l'adaptation, le cycle cellulaire, la mobilité, les comportements de groupe tels que les biofilms. Il existe de nombreuses possibilités de structures pour ces régulateurs de réponse. Parmi elles, on retrouve en outre l'organisation à deux composants, c'est-à-dire le régulateur de réponse associé aux histidine kinases.

Le régulateur de réponse PleD constitue le sujet principal de ce mémoire. Chez certaines α -protéobactéries, on sait qu'il contrôle le développement d'appendices polaires et la différenciation bactérienne. Faisant partie d'un réseau, il interagit avec plusieurs composants menant à son activation ou son inactivation ; il s'agit en outre des histidine kinases PleC et DivJ, dont nous reparlerons plus loin.

La protéine PleD a été caractérisée chez *Caulobacter crescentus*, bactérie membre, tout comme *Brucella spp.*, des α -protéobactéries. En effet, les phénotypes d'un mutant *pleD* de *C. crescentus* ont été caractérisés, notamment au niveau de la morphogénèse et la mobilité. C'est la raison pour laquelle *C. crescentus* sera citée comme bactérie de référence, afin de mieux comprendre les différents acteurs intervenant dans cette voie de transduction du signal.

Le rôle de PleD chez *Brucella spp.* n'a pas encore été étudié, mais la construction d'un mutant *pleD* est un premier pas vers la compréhension de la fonction de PleD chez cette espèce.

La première partie de cette introduction présente de façon générale les bactéries pathogènes du genre *Brucella* et plus particulièrement son flagelle dont nous pensons qu'il pouvait être contrôlé par PleD. La seconde partie de l'introduction traite du rôle du régulateur de réponse PleD et des mécanismes qui le contrôle chez l' α -protéobactérie *C. crescentus*. Cette introduction se clôture avec les fonctions hypothétiques de PleD chez *Brucella spp.*

II. *Brucella*, description générale

1. *Brucella*, bactérie pathogène ^{Gorvel and Moreno, 2002; Michaux-Charachonet *al.*, 2002}

Brucella spp. est un cocco-bacille Gram négatif de 1,2 μm de long sur 0,8 μm de large (Figure 1), adapté pour la survie et pour la réplique à l'intérieur des cellules eucaryotiques mammaliennes.



Figure 1 Micrographie de *B. abortus* prise en Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables d'anthropozoonoses répandues dans le pourtour du bassin méditerranéen, au Moyen Orient, et dans certaines régions d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud. Ces bactéries infectent des animaux domestiques et sauvages, et fortuitement l'homme qui reste un « cul de sac » infectieux pour elles. Dans certains pays, la brucellose représente un vrai problème de santé publique.

Six espèces du genre *Brucella* sont décrites comme pathogènes pour un hôte préférentiel mais non exclusif : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* et *Brucella neotomae* qui infectent respectivement les caprins et ovins, les bovins, les suidés, les canidés, les ovins et les rats du désert (Figure 2).

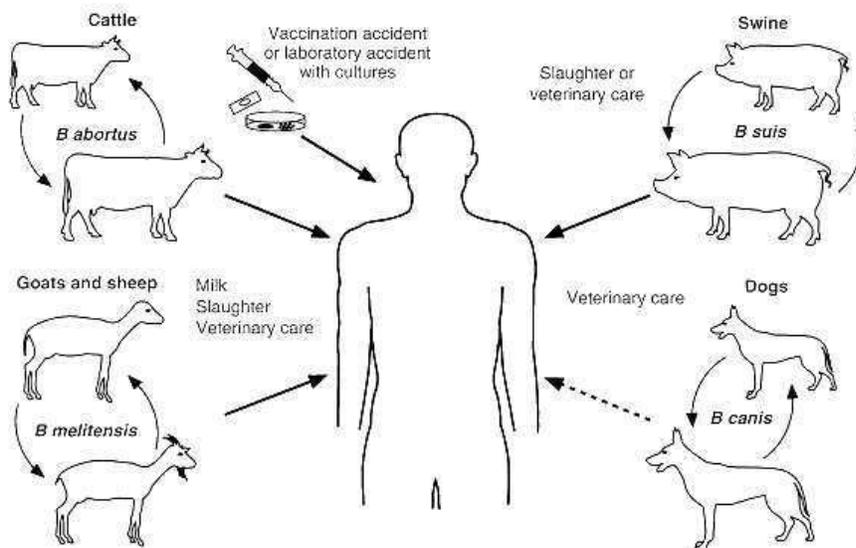


Figure 2 Hôtes infectés par *Brucella* spp.

Chez l'animal, la brucellose se caractérise par une atteinte de l'appareil génital. En effet, *Brucella* est responsable d'avortements chez les femelles gravides. Chez les mâles, l'infection se traduit par des orchites et des épидидymites. La brucellose est plus ou moins bien contrôlée par le système immunitaire, menant à l'élimination de la bactérie ou à l'établissement d'une forme chronique de la maladie.

La forme humaine de la maladie, appelée fièvre de Malte est caractérisée dans sa forme aiguë par une septicémie d'origine lymphatique où les bactéries viennent coloniser les cellules du système réticulo-endothélial. Les décharges bactériémiques se traduisent alors par des fièvres ondulantes caractéristiques de la primo infection. Cependant, les signes cliniques sont peu spécifiques et passent souvent inaperçus. Le risque est alors élevé de passer à une forme suppurée localisée, on parlera alors de brucellose subaiguë focalisée. Ces localisations secondaires sont souvent ostéoarticulaires, neuroméningées, hépato-spléniques, cardiaques ou encore glandulaires.

Suite à son adhésion sur la cellule cible, *Brucella* s'introduit par l'intermédiaire d'une vacuole de phagocytose, sans déclencher de réorganisation spectaculaire du cytosquelette Pizarro-Cerdaet al., 1998. La bactérie va persister et se multiplier dans un compartiment cellulaire membranaire jusqu'à faire éclater la cellule hôte sous le nombre. De manière plus approfondie, on sait que *Brucella* inhibe la fusion phagosome-lysosome dans les cellules phagocytaires, qu'elles soient professionnelles ou non, ainsi que la dégranulation dans les

polynucléaires neutrophiles. Elle est aussi capable de modifier le processus de maturation du phagosome pour créer une niche intracellulaire spécifique dans laquelle elle va pouvoir se multiplier. Après avoir bloqué la fusion phago-lysosomiale, les bactéries se retrouvent de façon transitoire dans un compartiment cellulaire présentant les caractéristiques d'un autophagosome. Tout en stoppant son cycle de division, *Brucella* va court-circuiter la voie classique du trafic vacuolaire et va dévier celui-ci afin de se confectionner une niche de réplication dans une vacuole qui présente plusieurs marqueurs membranaires du réticulum endoplasmique ^{Pizarro-Cerda et al., 1998}. Ce compartiment de réplication de la bactérie pourrait également lui permettre d'être en contact avec des nutriments. Il semble donc que *Brucella* exploite la machinerie cellulaire dédiée à l'autophagocytose (élimination des déchets cellulaires) pour atteindre sa niche de réplication. Une fois que *Brucella* a établi sa niche de réplication intracellulaire, elle se maintient dans la cellule le plus longtemps possible en inhibant l'apoptose par expression de plusieurs facteurs anti-apoptotiques, c'est le cas pour la production de TNF α par les macrophages ^{Michaux-Charachon et al., 2002}. En développant des mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire, *Brucella* se rend invisible et augmente ses chances de survie intracellulaire ^{Pizarro-Cerda et al., 1998}.

2. Arbre phylogénétique ^{Moreno, 1998}

Le genre *Brucella* se trouve dans la classe α des protéobactéries, qui regroupe notamment des bactéries symbiontes de plantes telle que *Rhizobium leguminosarum*, pathogènes de plantes telle que *Agrobacterium tumefaciens* ou d'animaux telles que *Bartonella henselae*, *Rickettsia prowazekii* ou *conorii* ; ces trois dernières étant caractérisés par leur pouvoir pathogène intracellulaire. Des bactéries vivant à l'état libre font aussi partie des α -protéobactéries, telles que *Rhodobacter capsulatus* et *Caulobacter crescentus*. (Figure 3).

Alors que les différents membres des α -protéobactéries ont un style de vie totalement différent, ceux-ci se regroupent dans un même groupe phylogénétique. Malgré ces différences, il existe des mécanismes de régulation conservés au sein de plusieurs espèces, notamment le réseau autour de PleD.

3. *Brucella* et son flagelle

Le flagelle est un organelle complexe qui permet aux bactéries de se déplacer. La mobilité est conférée par rotation du filament de flagelline qui agit comme une turbine. On considère trois parties importantes dans le flagelle. La première correspond au corps basal qui ancre le flagelle dans la membrane et la paroi bactérienne. La seconde partie correspond au coude (hook), exposé à la surface bactérienne. Et enfin, la troisième partie est constituée du filament, ce dernier se prolonge à l'extérieur de la bactérie et correspond à la partie visible du flagelle. La source énergétique utilisée est un gradient de protons qui génère une force protomotrice.

Au moins 20 protéines sont assemblées en une structure flagellaire hautement complexe et 30 autres protéines sont utilisées pour sa construction. L'assemblage correct et le fonctionnement de cette structure macromoléculaire requièrent une régulation à différentes étapes, à la fois au niveau de l'expression des gènes mais aussi au niveau de l'interaction entre protéines. L'ordre d'assemblage des différentes protéines flagellaires se fait de manière hiérarchisée allant de la partie proximale à la partie distale de la structure. Notons que les gènes flagellaires sont répartis en plusieurs classes, notées de I à IV. Typiquement chez *Caulobacter*, la classe I est composée uniquement du gène *ctrA* dont le produit active la transcription des gènes de classe II, regroupant les pièces structurales nécessaires à l'assemblage d'un flagelle en membrane interne. Quand l'assemblage en membrane interne de

ces produits est réalisé correctement, alors il y a transcription des gènes flagellaires de classe III. Ces produits vont également lancer la transcription des gènes de classe IV quand ils seront assemblés correctement dans le périplasma et la membrane externe. Les gènes de classe IV codent essentiellement pour des protéines du filament flagellaire ^{England and Gober, 2001}.

Un composant clé du flagelle est le disque MS. C'est la première structure qui est assemblée et qui ancre le flagelle dans la membrane cytoplasmique. Il y a 26 monomères de FliF qui s'assemblent pour former la structure circulaire qui constitue alors un pore central. Le disque MS interagit avec le cylindre axial du côté périplasmique. Ce cylindre axial constitue l'arbre de transmission. Il interagit aussi avec le disque C dans la membrane interne ^{Grunenfelder et al., 2003}. Le disque C est nécessaire au démarrage de la rotation du flagelle en réponse aux signaux environnementaux. Il est constitué de 3 protéines : FliG, FliM et FliN. Ce disque est construit sous le disque MS intégré en membrane, par interaction directe entre FliG et FliF avec une stoechiométrie de 1 pour 1. Comme il sera indiqué ci-dessous, la protéine FliF joue vraisemblablement un rôle clé dans l'assemblage et l'éjection du flagelle durant le cycle cellulaire ^{Grunenfelder et al., 2003}.

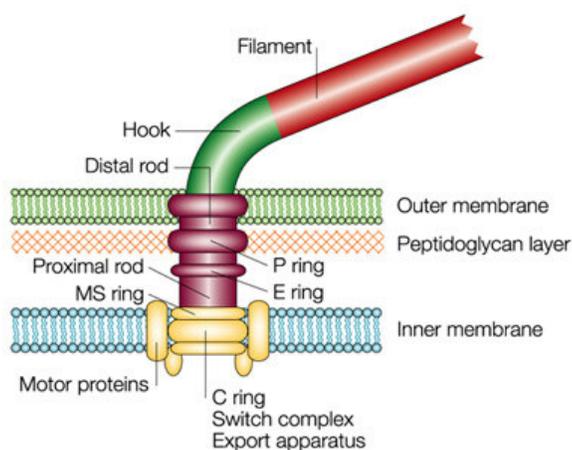


Figure 4 Structure du flagelle chez *Caulobacter crescentus* ^{Jensen et al., 2002}.

Au contraire des autres Rhizobiacées, *Brucella* est décrite comme bactérie non mobile ; cependant, chez *Brucella melitensis* une trentaine d'ORFs encodent des protéines flagellaires qui permettent l'assemblage d'un flagelle fonctionnel. De manière empirique, on sait qu'au tout début de sa phase exponentielle au cours d'une culture en milieu riche, *Brucella melitensis* 16M exprime ses gènes flagellaires correspondant aux composants distaux et basaux de l'appareil flagellaire. Les fonctions biologiques de l'appareil flagellaire de *Brucella* sont encore inconnues, mais il semblerait qu'il soit important pour la persistance de l'infection en modèle murin ^{Fretinet et al., 2005}.

L'assemblage de ces gènes flagellaires chez une bactérie pathogène considérée comme non mobile n'est pas quelque chose d'exceptionnel, on a effectivement décrit des gènes flagellaires avec un assemblage correct du flagelle chez d'autres bactéries pathogènes non mobiles, *Shigella flexnerii* et *Aeromonas salmonicida* ^{Tominaga et al., 1994; Umelo and Trust, 1997}. Malgré cela, deux aspects sont remarquables chez *Brucella*. Tout d'abord, le fait que *Brucella* ait besoin de son flagelle pour réaliser son cycle infectieux. En effet, l'incapacité d'assembler un appareil flagellaire complet mène à une atténuation de l'infection de *Brucella* en modèle animal. L'autre aspect vient du fait que l'appareil flagellaire est présent sans l'existence d'aucun système de chémotactisme ^{Fretinet et al., 2005}. Il faut remarquer aussi que chez *Salmonella thyphimurium*, les mutants *Che⁻* (sans chémotactisme) ont montré un phénotype de survirulence ^{Jones et al., 1992}.

III. PleD chez les α -protéobactéries

1. Chez *Caulobacter crescentus*

PleD a été essentiellement étudié chez *Caulobacter crescentus*. Cette bactérie constitue l'une des références pour l'étude des processus de différenciation cellulaire et le cycle cellulaire chez les procaryotes. *Caulobacter* est une bactérie aquatique qui a la particularité de présenter un cycle de division cellulaire asymétrique. Conventionnellement, on fait commencer le cycle de division cellulaire (figure 5) par une cellule flagellée nageuse cherchant une niche favorable à sa survie. A un des pôles cellulaires de la bactérie se trouve un flagelle mobile, plusieurs pili de type IV, permettant à la bactérie de nager avec un système chimotactique fonctionnel et d'adhérer à un substrat. A cet instant, la cellule est incapable d'initier la réplication de son chromosome. Elle est alors en phase G1. Lorsque la bactérie rencontre un milieu propre à la colonisation, elle entame sa différenciation en cellule pédonculée (« stalkée »). Cette phase de transition est appelée transition G1-S. Lors de celle-ci, il y a éjection du flagelle, rétraction des pili et formation d'un pédoncule (ou « stalk ») au pôle précédemment occupé par le flagelle. La structure pédonculée permet à la cellule un ancrage au substrat grâce à l'holdfast, un mélange d'exopolysaccharides présent à l'extrémité du pédoncule. Le stalk est un prolongement de l'enveloppe bactérienne ne contenant pas de ribosomes ni d'ADN. Suivant les conditions environnementales, deux choses différentes peuvent se passer. Si le milieu est pauvre en nutriments, la cellule ne se divise pas mais allonge son stalk de façon à augmenter sa surface de contact avec le milieu et augmenter son apport en nutriments, notamment en phosphate inorganique. Si le milieu est riche en nutriments, alors la bactérie va croître et initier une seule fois un cycle de réplication chromosomique. Quand la réplication de l'ADN est initiée, la cellule en phase S, passe dans un état prédivisionnel et synthétise un nouveau flagelle au pôle opposé au pôle pédonculé. Les chromosomes sont ségrégués et il y a constriction septale menant à la séparation des deux cellules filles, c'est la phase de cytokinèse. La séparation des cellules filles mène d'une part à la rotation du flagelle et à la biogenèse de pili chez la cellule flagellée, et d'autre part mène à l'initiation de la réplication chromosomique chez la cellule stalkée. Les deux cellules filles résultantes sont différentes d'un point de vue morphologique, au niveau de leur taille et de leur densité cellulaire, mais aussi au niveau fonctionnel. En effet, la cellule pédonculée va se diviser et coloniser le milieu, éventuellement jusqu'à former des biofilms, tandis que la cellule flagellée va se disperser dans le milieu environnant Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003; Skerker and Laub, 2004

Toutes ces étapes de différenciation et de division cellulaire requièrent une régulation spatiotemporelle stricte et une coordination entre les différents événements de morphogenèse et de division cellulaire. Un des aspects importants du développement polaire est la périodicité de gain et de perte de la mobilité.

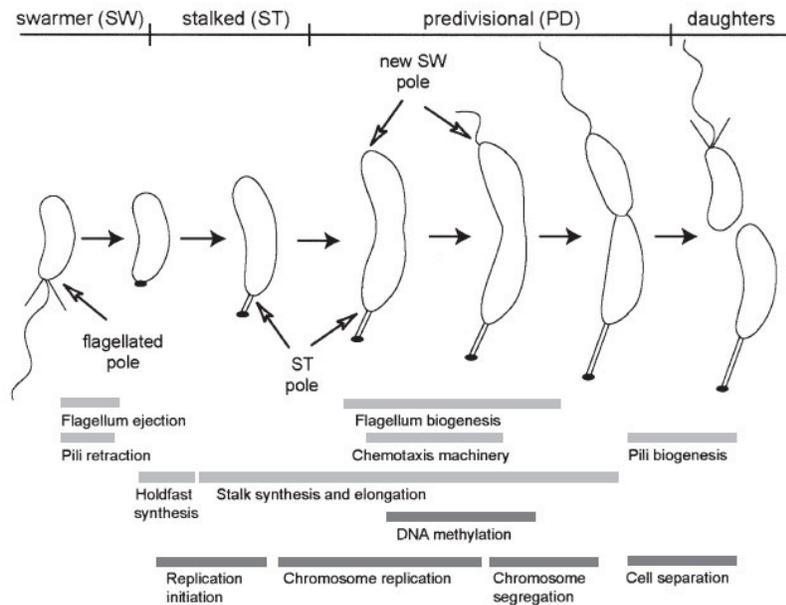


Figure 5 Cycle cellulaire de *C. crescentus* ^{Jacobs-Wagner, 2004}. Trois types cellulaires sont à distinguer : nageuse (SW), stalkée (ST) et prédivisionnelle (PD).

La coordination des différentes étapes du développement polaire et de division chez *C. crescentus* fait intervenir un système à deux composants. (Voir l'encadré ci-dessous sur les systèmes à deux composants chez les procaryotes.)

Systèmes à deux composants chez les procaryotes

a. La phosphorylation, mécanisme central de la transduction du signal ^{Alex and Simon, 1994; West and Stock, 2001}

L'information transmise via un groupement phosphate chez les procaryotes, c'est-à-dire la phosphorylation de protéine, est un mécanisme central de la transduction du signal. Le transfert de phosphate entre protéines nécessite deux composants, une kinase senseur ou protéine histidine kinase (HK) capable de détecter un stimulus, ainsi qu'un régulateur de réponse (RR), par exemple un facteur de transcription qui, après activation, permet à la cellule de répondre de manière adaptée à un signal perçu. La réaction de transfert de groupement phosphate se fait entre le résidu histidine de l'Histidine Protéine Kinase et le résidu aspartate du Régulateur de Réponse. (Figure 6)

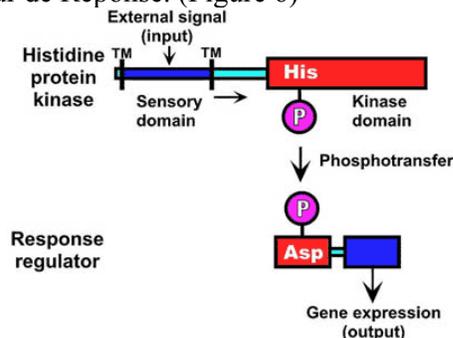


Figure 6 Transfert de phosphate entre HK et RR.

(Lien internet : www.mcgill.ca/microimm/departement/professeurs/lemoual)

L'HK est une protéine homodimérique qui dispose d'un domaine senseur aminoterminal, souvent ancré en membrane, et d'un domaine autokinase carboxyterminal qui est cytoplasmique. Ce dernier est composé d'un domaine de dimérisation et un domaine catalytique impliqué dans la liaison à l'ATP. Lors de la perception du stimulus, le domaine senseur va alors provoquer un changement de conformation du dimère de l'HK et l'activation du domaine autokinase. Après l'activation de ce dernier, celui-ci va alors catalyser la réaction de transfert de groupement phosphate entre une molécule d'ATP et un résidu histidine du domaine kinase.

Le régulateur de réponse est une protéine comportant en général un domaine RR caractérisé contenant un Aspartate conservé et un domaine effecteur. Le RR va catalyser le transfert du groupe phosphate de l'HK sur le résidu aspartate conservé de son domaine régulateur. La phosphorylation de ce résidu aspartate permet l'activation du domaine effecteur qui va favoriser une réponse spécifique. 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 ou de protéines qui augmentent l'activité autophosphatase de son domaine régulateur.

b. Systèmes à composants multiples West and Stock, 2001

Le système à composants multiples est une variante du système à deux composants. Ce système inclut des domaines RR intermédiaires supplémentaires ainsi qu'un troisième type de domaine appelé Hpt, ce qui allonge la chaîne de transfert de phosphate : $HK \rightarrow RR_1 \rightarrow Hpt \rightarrow RR_2$, RR_2 est souvent un régulateur transcriptionnel. Le domaine Hpt présente un court motif consensus qui comporte une histidine invariante permettant le transfert du groupement phosphate d'un domaine RR à un autre, il n'exerce aucune activité kinase. Les domaines RR additifs sont quant à eux phosphorylés au niveau d'un résidu aspartate et permettent le transfert de groupement phosphate du résidu histidine d'une HK 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'activation complète du phosphorelais.

Plusieurs éléments d'un système à composants multiples peuvent s'associer en un seul polypeptide, il en résulte donc des protéines hybrides qui portent le nom de kinase hybride, par exemple HK-RR-Hpt chez BvgS de *Bordetella pertussis* Uhl and Miller, 1996a; Uhl and Miller, 1996b.

La structure de ces protéines résulte de la fusion de domaines régulateurs et de domaines comportant une boîte H, boîte typique des HK, dans laquelle on trouve l'histidine phosphorylable.

Différents membres de voies de transduction du signal à deux composants contrôlent le développement polaire chez *C. crescentus*. Les protéines impliquées dans le réseau de transduction du signal répondent probablement à des signaux internes et sont essentielles à la régulation et la progression de la morphogenèse polaire dans le cycle cellulaire.

Le génome de *Caulobacter* encode 61 histidines kinases et 43 régulateurs de réponse. A ce jour, on sait que quatre de ces protéines kinases, DivJ, PleC, CckA et DivL, ainsi que les régulateurs de réponses DivK, CtrA et PleD sont impliqués dans la régulation du cycle. Les protéines kinases CckA et DivL ainsi que le système à multicomposants DivJ-PleC-DivK sont impliqués dans le contrôle du cycle de division cellulaire par régulation de l'activité du régulateur transcriptionnel CtrA Jacobs-Wagner, 2004.

L'idée que l'on se fait actuellement du mécanisme de régulation est qu'il existe deux voies de transduction du signal agissant sur le contrôle de la mobilité durant le cycle cellulaire. La première voie implique DivK et a un effet globalement positif sur la mobilité (voir l'encadré ci-dessous). La deuxième voie implique PleD et a, par contre, un effet négatif sur la mobilité et un effet positif sur la synthèse du stalk. Dans ces deux voies, les histidine kinases agissent sur l'état de phosphorylation des régulateurs de réponse PleD et DivK ^{Aldridge et al., 2003}.

Dans la première voie, DivK est phosphorylé par DivJ au pôle stalké et est déphosphorylé par PleC au pôle flagellé ^{Jacobs-Wagner, 2004}. Après séparation des cytoplasmes (cytocinèse) des deux cellules filles, DivK est principalement déphosphorylé dans la cellule flagellée, tandis qu'il est principalement phosphorylé dans la cellule stalkée. Dans la cellule flagellée, la déphosphorylation de DivK permet de lever l'inhibition sur la rotation du flagelle. Dans la cellule stalkée, la phosphorylation de DivK stimulerait la protéolyse de CtrA, ce qui lèverait la répression sur l'initiation du chromosome. La phase S peut donc commencer dans les cellules stalkées, mais pas dans les cellules flagellées ^{Hecht and Newton, 1995; Oka et al., 1981}.

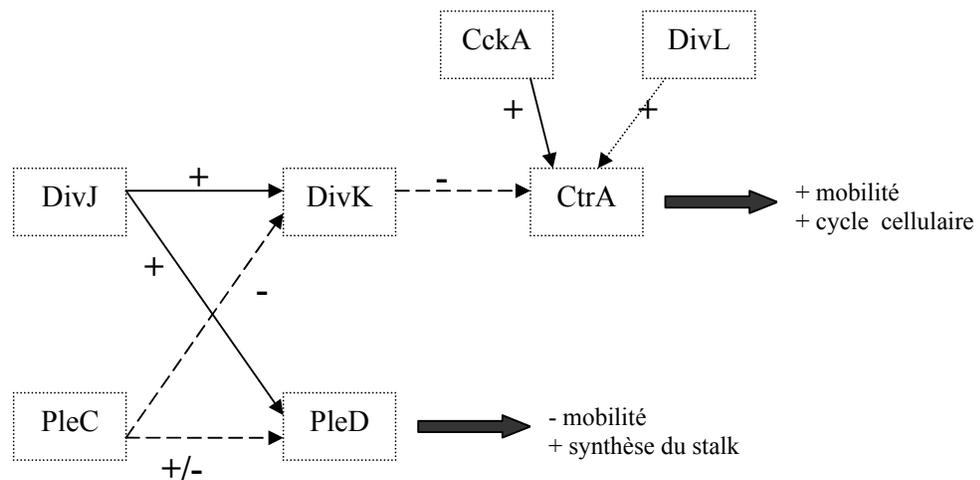


Figure 7 Voies de régulation dépendante de DivK et PleD..

Deux histidines kinases interviennent également dans cette voie, DivL et CckA. Tout d'abord DivL, dont on sait seulement que c'est une tyrosine kinase capable de phosphoryler et donc d'activer CtrA in vitro ^{Wuet al., 1999}. CckA, qui est une histidine kinase hybride, agit indirectement sur la phosphorylation de CtrA sûrement via un intermédiaire ^{Jacobset al., 1999}.

La deuxième voie, faisant intervenir PleD, fait l'objet de la suite de cette introduction.

2. Structure de PleD

a. Découverte de PleD ^{Sommer and Newton, 1989}

PleD est un élément important dans la coordination du cycle cellulaire et de la morphogenèse. Il a été décrit pour la première fois lors d'un crible tentant d'isoler des

mutations ponctuelles dans des gènes qui provoqueraient le découplage de la coordination entre le cycle de la division cellulaire et les événements de morphogénèse polaire chez *Caulobacter*. Lors de ce crible, trois gènes dits pléiotropiques ont été identifiés *pleA*, *pleC* et *pleD*.

Les phénotypes observés chez les différents mutants étaient les suivants. Les mutants *pleA* étaient non flagellés, mais avec formation normale du pédoncule. Les mutants *pleC* montraient une perte d'assymétrie puisque les deux cellules filles obtenues étaient toutes les deux flagellées et non mobiles. Enfin, l'observation des phénotypes morphologiques du mutant *pleD* montre l'absence de pédoncule et présence de flagelles sur les deux cellules filles comme c'est le cas pour les mutants *pleC* (Figure 8). Néanmoins, le mutant *pleD* est mobile, et assemble correctement des pili polaires. On parlera même de mutants hypermobiles ; en effet, il y a échec pour les cellules flagellées de perdre leur mobilité au stade normal de leur cycle cellulaire, la production de deux cellules filles flagellées à chaque cycle augmente donc la proportion de cellules mobiles. Remarquons aussi que, nonobstant l'absence de stalk chez le mutant *pleD*, on observe une légère excroissance à l'endroit où un stalk devrait se trouver chez la sauvage.

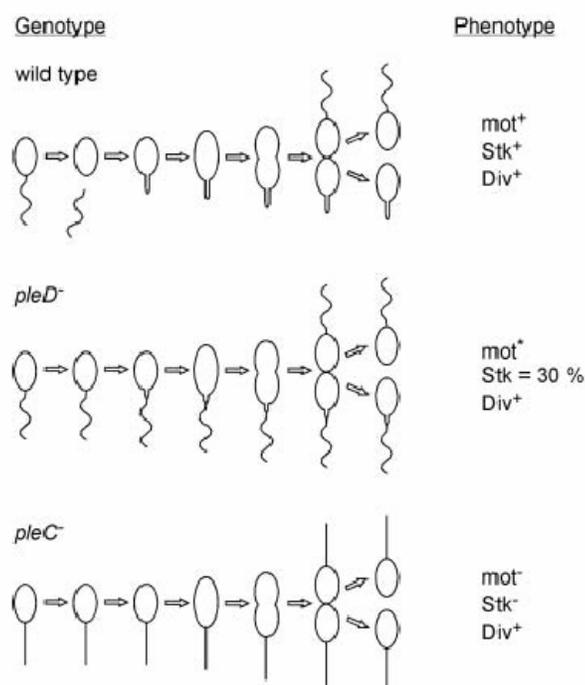


Figure 8 Schéma représentant les phénotypes des mutants *pleC* et *pleD* Aldridge et al., 2003

L'étude phénotypique des mutants a permis de comprendre que PleA et PleC/D s'organisaient en deux voies indépendantes dans la formation des cellules filles mobiles ainsi que la formation des cellules pédonculées. La voie PleA conduit à la biosynthèse du flagelle dans la cellule prédivisionnelle. La voie PleC/D conduit à l'activation du flagelle dans les cellules prédivisionnelles, la perte de mobilité dans les cellules en transition G1-S et la formation de pédoncule dans les cellules stalkées. De plus on sait que les mutants *pleD* sont épistatiques aux mutants *pleC* ; en effet, on sait que les mutants *pleD* suppriment les défauts de mobilité des mutants Sommer and Newton, 1991; Sommer and Newton, 1989

b. Identification des domaines de PleD

Si on s'intéresse de plus près au gène codant pour PleD, on peut remarquer que le codon start du gène *pleD* chevauche le codon stop du gène *divK*, suggérant que la transcription des deux gènes est couplée chez *C. crescentus*. L'analyse de la séquence des 2000 nucléotides suivant le gène *divK*, a permis de mettre en évidence l'ORF de 1365 nucléotides codant pour le polypeptide PleD de 454 acides aminés et ayant une masse prédite de 49,6 kDa. ^{Hecht and Newton, 1995}

La protéine PleD contient trois domaines en tandem. On retrouve du côté N-terminal deux domaines (D1 et D2) homologues aux domaines régulateurs de réponse, ainsi qu'un domaine GGDEF (encore appelé DUF-1) en C-terminal. Le domaine D1 correspond aux 125 acides aminés du côté N-terminal. Il contient une séquence hautement conservée par rapport aux séquences des autres membres de la famille des régulateurs de réponse. En particulier au niveau des Asp-9, Asp-10, Asp-53 et Lys-105, qui correspondent aux quatre résidus invariants trouvés dans toutes ces protéines, parfois un des Asp (9 ou 10) est remplacé par un Glu (aussi chargé négativement). D1 est aussi décrit comme ayant des motifs hydrophobes qui sont conservés dans la plupart des protéines régulateurs de réponse. Il semblerait que cette hydrophobicité soit nécessaire au repliement correct de la protéine. L'identification d'un site de phosphorylation sur l'Asp-53 suggère qu'il y a une régulation de PleD par une histidine kinase. ^{Hecht and Newton, 1995}

Le domaine D2 s'étend du résidu 151 au résidu 275. Il contient lui aussi des motifs conservés nécessaires au repliement correct du régulateur de réponse, mais le manque de résidus conservés au niveau du site actif du régulateur de réponse semble indiquer que, malgré la nécessité de ce domaine pour l'activité de PleD, ce domaine n'agit pas en tant qu'accepteur de phosphate.

Le domaine C-terminal n'est pas similaire au domaine effecteur prédit généralement pour des régulateurs de réponse, c'est-à-dire un domaine de liaison à l'ADN. Le domaine GGDEF chez PleD a une fonction de domaine effecteur ^{Hecht and Newton, 1995} à laquelle nous reviendrons plus loin (Point III.4 à la page 12).

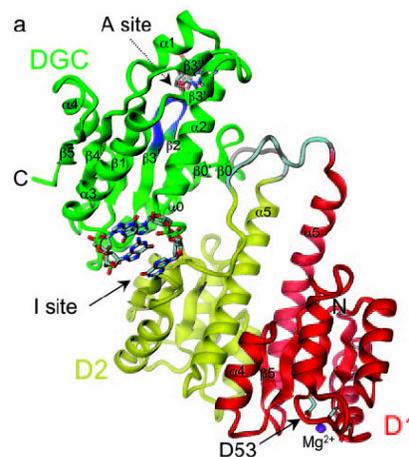


Figure 9 Structure cristallographique de PleD ^{Chanet al., 2004}.

On distingue donc deux parties qui composent le régulateur de réponse PleD, une partie receveuse du signal, composée par les domaines D1 et D2, et une partie effectrice, c'est-à-dire

le domaine GGDEF. La suite de cette introduction va aborder la partie receveuse du signal et nous terminerons par la partie effectrice.

3. Les domaines D1 et D2

a. Les Histidine Kinases DivJ et PleC

PleD étant un régulateur de réponse, il est très probable que son activité soit régulée par la présence d'histidine kinases. On pense que celles-ci sont DivJ et PleC, protéines jouant un rôle essentiel dans les voies de transduction du signal contrôlant la différenciation cellulaire chez *Caulobacter* et interagissant directement avec le régulateur de réponse PleD ^{Hecht and Newton, 1995}.

In vivo, le taux de phosphorylation de PleD est fortement réduit chez un mutant *divJ*, alors qu'il est augmenté chez un mutant *pleC*. Si l'on garde ces résultats en vue, l'augmentation des taux de PleD~P pourrait être la cause du flagelle paralysé ^{Aldridge et al., 2003}. DivJ est principalement responsable de la phosphorylation de PleD, les signaux reconnus par les histidines kinases PleC et DivJ restant évanesifs ^{Paulet et al., 2004}.

b. Localisation de PleD et des histidines kinases

Les histidines kinases PleC et DivJ sont responsables du contrôle temporel du gain et de la perte de mobilité durant le cycle cellulaire. Leur localisation est dynamique au cours du cycle cellulaire. Ce contrôle se fait par modulation de l'état de phosphorylation de PleD ^{Aldridge et al., 2003}. Dans une cellule flagellée, l'histidine kinase PleC est localisée au pôle flagellé. Lors de la transition G1-S, il y a transcription et traduction du gène *divJ*. L'histidine kinase DivJ, liée elle aussi en membrane, est alors localisée au futur pôle pédonculé, ce qui correspond à la disparition de PleC à ce pôle cellulaire ^{Sciocchetti et al., 2002; Wheeler and Shapiro, 1999}. La localisation de DivJ à ce pôle correspond également avec la présence de PleD~P à cet endroit et à la perte de mobilité, l'éjection du flagelle et la synthèse du pédoncule. Cela concorde avec les phénotypes observés chez les mutants *pleD* (phénotype hypermobile par non éjection du flagelle). PleD et DivJ se co-localisent ensuite au pôle stalké tout au long du cycle. PleC se localise au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle (Figure 8).

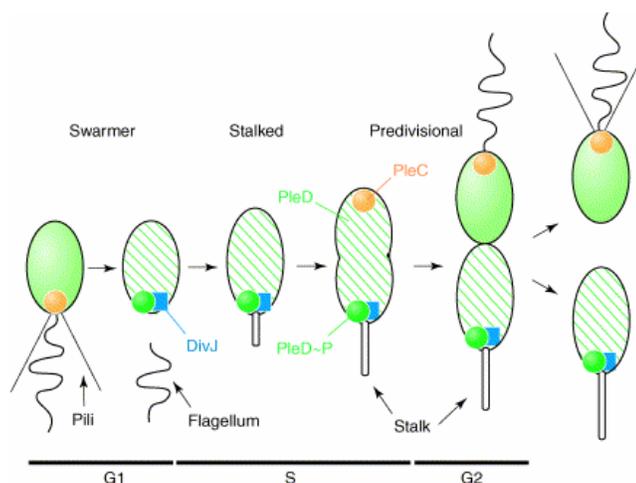


Figure 10 Localisation des histidines kinases PleC et DivJ et du régulateur de réponse PleD chez *Caulobacter crescentus* ^{Jenal, 2004}.

La localisation polaire de PleD dépend de son état de phosphorylation. En effet, PleD n'est plus du tout localisé polairement chez un double mutant *divJ-pleC* de *C. crescentus* ^{Paul et al., 2004}.

4. Les domaines GGDEF

Après s'être intéressé à la partie receveuse du signal du régulateur de réponse, concentrons-nous maintenant sur la partie effectrice, c'est-à-dire le domaine GGDEF de la protéine.

a. L'éjection du flagelle et la protéolyse de la protéine flagellaire FliF

Un des composants clés impliqués à la fois dans l'assemblage et l'éjection du flagelle chez *Caulobacter crescentus* est la protéine FliF. Comme on l'a vu plus haut, celle-ci forme le disque MS situé dans la membrane cytoplasmique. FliF constitue la base sur laquelle la structure entière du flagelle est construite et elle permet également l'ancrage du flagelle dans la membrane interne. Lors de la transition de cellule flagellée à cellule pédonculée, l'éjection du flagelle coïncide avec la dégradation de FliF. Au moment de l'éjection du flagelle, le disque MS, et donc FliF, sera détruit par protéolyse (Voir l'encadré sur la protéolyse à la page suivante). Il a été montré que c'est la partie C-terminale de FliF qui porte les signaux fonctionnels pour l'assemblage et la destruction du flagelle ^{Grunenfelder et al., 2003}. La dégradation de FliF nécessite la protéase ClpAP. La protéase ClpAP ATP dépendante est constituée de 2 types de polypeptides : la ClpA ATPase et la ClpP peptidase ^{Grunenfelder et al., 2004}.

Deux hypothèses sont émises; soit la protéolyse de FliF provoquerait la destruction de l'ancrage du flagelle, menant alors au relargage des composants distaux du flagelle dans le milieu. Soit, la perte de la partie axiale de la structure flagellaire provoquerait indirectement la dégradation de FliF. En effet, la disruption de l'interaction cylindre axial - disque MS pourrait causer l'instabilité de la protéine FliF. Le disparition de FliF serait alors directement dépendant de l'éjection de la structure flagellaire, et donc de la structure en elle-même.

Un second acteur est également important, il s'agit du gène flagellaire *fliL*. Il faut noter que la protéine FliL est nécessaire pour la dégradation de FliF, mais elle n'est aucunement essentielle à l'assemblage de l'appareil flagellaire. En effet, un mutant *fliL* est le seul mutant des gènes des classes II et III qui affecte la protéolyse de FliF et la synthèse du stalk ^{Aldridge and Jenal, 1999}. La présence du régulateur de réponse PleD est essentielle pour la disparition de FliF, et sûrement pour l'éjection du flagelle ^{Aldridge and Jenal, 1999}. Il reste encore à montrer si PleD a une interaction directe avec FliF ou un effet indirecte sur la stabilité de FliF.

Dans la littérature, seuls les mutants *pleC* et *pleD* sont décrits comme incapables de relarguer le flagelle. Or *pleD* est épistatique sur *pleC*. L'attention s'est donc portée sur *pleD*. Si on complémente un mutant *pleD* par *pleD_{AGGDEF}* ou par *pleD_{GG368DE}* (c'est-à-dire sans domaine GGDEF fonctionnel), il n'y a pas de protéolyse de FliF pendant la transition G1-S. De plus, PleD n'a pas d'effet sur la protéolyse de protéines telles que McpA et CtrA et sur la protéolyse en général. PleD n'a pas d'effet non plus sur l'expression de FliF. Tout ceci nous indique clairement que le domaine C-terminal, c'est-à-dire le domaine GGDEF de PleD qui est requis pour l'activation de la protéolyse de FliF chez *C. crescentus* ^{Aldridge and Jenal, 1999}.

La protéolyse Jenal and Fuchs, 1998

Chez les bactéries, on dénombre quatre familles de protéases ATP dépendantes : Clp (ClpAP, ClpXP) ; Hsl (ClpYQ) ; AAA (FtsH) et Lon family (Lon). Les protéines Clp sont assemblées en structures similaires aux protéasomes eucaryotiques. Une cavité centrale est formée par deux anneaux multimériques de ClpP ou ClpQ ; de part et d'autre de ceux-ci se trouvent deux anneaux multimériques de ClpA ou ClpX, des chaperons ATP-dépendants qui régulent l'entrée des chaînes polypeptidiques. L'activité protéolytique réside dans les sous-unités ClpP ou ClpQ ; leur accès aux chaînes polypeptidiques dépendent alors d'une reconnaissance spécifique. Il s'en suit un dépliement du substrat protéique par l'ATPase

Grunenfelder et al., 2004

b. Rôle dans la synthèse de cellulose et de biofilms Romling, 2002

Les domaines GGDEF sont souvent impliqués dans la modulation de la surface cellulaire, la préparant aux interactions cellule/cellule ou cellule/hôte, ainsi qu'à la formation de biofilms Aldridge et al., 2003. De façon intéressante, ActA, une protéine contenant un domaine GGDEF chez *Myxococcus xanthus*, est impliqué dans le contrôle de la production du signal C, requis pour l'agrégation cellulaire et la sporulation Gronewold and Kaiser, 2001. De manière similaire, on retrouve chez *Pseudomonas aeruginosa*, la protéine WspR, contenant un domaine GGDEF. WspR régule l'autoagrégation, ainsi que la formation de biofilms par le contrôle de l'expression d'une adhésine D'Argenio et al., 2002.

Longtemps, on a considéré que la production de cellulose appartenait au règne végétal. Malgré cela, la biosynthèse de cellulose a été récemment établie pour une variété de bactéries d'origine diverses d'un point de vue phylogénétique. Notamment pour *Agrobacterium tumefaciens* Matthysse et al., 1995, *Rhizobium leguminosarum trifolii* Ausmees et al., 1999, *Salmonella spp.* Romling et al., 2000, *Escherichia coli* Ausmees et al., 2001; Zogaj et al., 2001, et surtout *Acetobacter xylinum* Talet et al., 1998, ancien nom de *Gluconacetobacter xylinum*, bactérie modèle dans l'étude de la synthèse de cellulose. L'utilisation de cette bactérie comme référence se base sur des motifs conservés au niveau des celluloses synthases. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de biosynthèse et de régulation de la cellulose permettrait de développer de nouvelles stratégies d'éradication de la formation de biofilms bactériens.

La cellulose chez les bactéries est un exopolysaccharide, c'est-à-dire un polymère de β -glucose. Cette production se distingue par la nature extracellulaire du polymère qui promeut l'adhérence cellulaire par formation d'agrégats. Ceux-ci sont attribués à la haute affinité du matériau cellulosique pour lui-même. A la fois chez *Salmonella* et chez *Pseudomonas*, la cellulose semble contribuer au comportement multicellulaire, ainsi qu'à l'agrégation par la promotion de contacts entre les cellules D'Argenio et al., 2002; Romling et al., 2000.

Les récentes découvertes de production de cellulose par une large variété de bactéries, ont permis la compréhension des mécanismes moléculaires de biosynthèse de cellulose, du rôle de la cellulose dans le développement bactérien, ainsi que de l'interaction entre la cellule bactérienne et son environnement.

A quelques exceptions près, l'architecture opéronique de la cellulose synthase s'articule comme suit ; deux gènes se retrouvent dans le génome de ces bactéries : le gène codant pour la cellulose synthase, ainsi que le gène diGMPc binding protein. Chez *G. xylinum*, le complexe de synthèse de cellulose est transmembranaire ; la cellulose synthase (BcsA) étant

localisée dans la membrane externe et le diGMPc binding protein (BcsB) dans la membrane cytoplasmique ^{Kimura et al., 2001}. Le diGMPc a été identifié comme activateur de la biosynthèse de cellulose. C'est la forme du dinucléotide lié à la BcsB qui active de façon allostérique la cellulose synthase BscA ^{Wong et al., 1990}.

Une autre étude, réalisée sur la synthèse de cellulose chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* a montré que celle-ci était régulée par CelR2, un orthologue de PleD. Tout en sachant que la synthèse de cellulose est induite en réponse à un signal environnemental et que le domaine GGDEF est impliqué dans la synthèse du composé diGMPc, il est intéressant et même intrigant de constater que la protéine CelR2, codant pour le régulateur de réponse, présente plus de 65% de similarité avec PleD. Et même encore, CelR1 précédant CelR2 présente quant à lui 80% de similarité avec DivK. Les produits des gènes *divK* et *pleD*, placés en opéron, sont des éléments clés dans les modifications cellulaires lors du cycle de *C. crescentus*. Si on tient compte de l'effet de ces régulateurs de réponse sur la différenciation chez cette bactérie, et leur rôle sur la production de cellulose chez *R. leguminosarum*, on peut en émettre l'hypothèse que CelR2 et PleD, malgré l'extrême similarité de leur structure, ont des fonctions différentes chez ces deux bactéries ^{Ausmees et al., 2001}.

Cependant, PleD chez *C. crescentus* a un effet positif sur la synthèse du stalk. A l'extrémité de celui-ci se trouve l'holfast, qui est un exopolysaccharide comme c'est le cas pour la cellulose. Dans les mutants *pleD*, il n'y a pas de synthèse de l'holfast. Il est intéressant d'observer que PleD a un effet positif sur la synthèse de l'holfast et que CelR2, l'orthologue de PleD, a un effet positif sur la synthèse de cellulose. D'un autre côté, on ne sait pas si CelR2 a un effet sur la mobilité chez *R. leguminosarum*.

c. diGMP cyclique, messenger secondaire important

C'est dans les années 1980, que l'on a identifié le diGMPc comme composé signal impliqué dans le contrôle de la condensation du glucose en polymère de cellulose chez *G. xylinum* ^{Rosset et al., 1991}. Comme décrit plus haut, il est le régulateur allostérique de la cellulose synthase. Ce dernier se fixe de façon hautement spécifique et de façon réversible au site de régulation allostérique de la cellulose synthase. Actuellement, le diGMPc est reconnu comme messenger secondaire agissant au niveau de la surface cellulaire, en régulant ainsi les composants d'adhésion cellulaire et en préparant les cellules pour les interactions cellule/cellule et cellule/surface.

De manière générale, les taux cellulaires en diGMPc sont contrôlés par les activités opposées des diguanylates cyclases (DGC) et des phosphodiesterases (PDE) se trouvant soit sous forme soluble soit sous forme membranaire.

Ces deux enzymes catalysent les réactions suivantes ; tout d'abord la diguanylate cyclase convertit deux molécules de guanosine triphosphate (GTP) en diGMP cyclique, en passant par un intermédiaire linéaire, la diguanosine tétraphosphate (pppG3'p5'G). La phosphodiesterase quand à elle, clive le composé cyclique diGMPc en deux molécules de guanosine monophosphate (GMP) en passant aussi par un intermédiaire, le diguanosine diphosphate (pG3'p5'G).

La concentration en diGMPc cellulaire est de 5 à 10 μ M, une concentration semblable à celle en AMPc et 100 fois moindre que celle en GTP. Dans la cellule, une faible quantité de diGMPc diffuse librement, tandis que la plus grande portion est liée aux membranes par des diGMPc binding protein. La liaison du messenger à la protéine permet sa protection d'une dégradation par les phosphodiesterases.

Une large étude sur la synthèse de cellulose chez *G. xylinum* révèle que ce procédé est positivement régulé par une nouvelle molécule effectrice, le diGMP cyclique ^{Wong et al., 1990}. Plusieurs opérons sont impliqués dans le métabolisme du diGMPc ; dans chaque opéron, on

retrouve un gène qui code pour une phosphodiesterase et un pour une diguanylate cyclase. Chacun de ces opérons code pour une protéine multidomaine contenant un domaine PAS en N-terminal (senseur), un domaine GGDEF ainsi qu'un domaine EAL en C-terminal. La fonction de ce dernier n'est pas encore connue. Les trois domaines sont identiques, qu'il s'agisse d'une diguanylate cyclase ou d'une phosphodiesterase. Le domaine PAS est impliqué comme senseur, suivant la liaison ou non du ligand, le PAS est capable de réagir à plusieurs signaux (O₂, lumière, potentiel rédox)^{Jenal, 2004}.

In vitro, il a été montré que la protéine PleD purifiée catalyse la conversion du GTP en diGMP cyclique. Mais, aucune activité de phosphodiesterase n'a pu être observée^{Paulet al., 2004}. *C. crescentus* utilise donc une signalisation dépendante du diGMPc pour contrôler sa différenciation cellulaire. On sait que l'activation de PleD par phosphorylation va catalyser l'éjection du flagelle et la biogenèse du pédoncule. Ceci se fait probablement par l'intermédiaire du diGMPc. L'activité de PleD requiert son domaine GGDEF intact et est spécifique au GTP^{Jenal, 2004}.

Le lien entre l'activation de l'activité diguanylate cyclase de PleD et sa localisation au pôle cellulaire de différenciation implique que l'accumulation de diGMPc produit par PleD à ce site agit de façon locale. Les activités diguanylate cyclase et phosphodiesterase agissent localement. En effet, chez *G. xylinum*, les diguanylate cyclase et phosphodiesterase sont situées à proximité de leur cible, la cellulose synthase, le diGMP cyclique peut alors agir localement pour coordonner la synthèse de cellulose au site adjacent^{Rosset al., 1991}.

d. Régulation allostérique

Le domaine C-terminal (GGDEF) de la protéine PleD, que l'on retrouve dans plus de 900 protéines identifiées chez des bactéries Gram+ et Gram-, n'est généralement pas liée à un domaine receveur d'un régulateur de réponse. Initialement, ce domaine GGDEF était considéré comme un nouveau motif de liaison à l'ADN^{Aldridge and Jenal, 1999}. Mais ce n'est pas le cas ; nous savons maintenant qu'il est impliqué dans la cyclisation nucléotidique.

Ce domaine C-terminal est appelé GGDEF, vu la séquence d'acides aminés hautement conservée (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe ou Gly-Gly-Glu-Phe), ou encore DUF-1. Ces domaines de protéines sont retrouvés chez d'autres bactéries. On dénombre ainsi 19 protéines contenant un domaine GGDEF chez *E. coli*, 10 chez *C. crescentus*, 33 chez *P. aeruginosa* et 41 chez *V. cholerae*. La plupart de ces protéines ont une architecture moléculaire contenant un domaine GGDEF fusionné avec une série de domaines d'entrée (recevant le signal), de domaines extracellulaires ou même encore des domaines dont on ne connaît pas la fonction. L'arrangement de ces domaines suggère qu'après stimulation du domaine d'entrée voisin, le domaine GGDEF produit alors le signal de sortie.

Le processus de contrôle de PleD durant le développement polaire de *C. crescentus* est très similaire à ceux qui se mettent en place durant les étapes initiales de la formation de biofilms. Il est en effet concevable que des membres de protéines à domaine GGDEF aient une large fonction dans la formation de biofilms. Les protéines à domaines GGDEF ne sont pas requises seulement pour la synthèse d'exopolysaccharides, mais sont aussi recrutées pour orchestrer le développement cellulaire dans des associations multicellulaires^{Aldridge et al., 2003}.

Un rôle dans l'adhésion cellulaire serait possible. Néanmoins, on ne retrouve pas d'homologue de la cellulose synthase chez *C. crescentus*, ce qui veut dire que l'adhésion devra se faire via un ou plusieurs autres exopolysaccharides.

PleD inactif, c'est-à-dire non phosphorylé, apparaît comme monomérique. La phosphorylation sur l'Asp 53 du domaine D1 conduit à un remodelage de l'interface D1/D2

avec réorientation de D1 envers D2. Le contact entre les interfaces des domaines D1/D2 mène à la formation d'un dimère et à l'activation de PleD (Figure 11). Il faut noter que l'on peut observer une faible activité constitutive *in vitro*, celle-ci est due probablement à une petite fraction de dimères non dissociés.

Après la formation du dimère, l'activité catalytique du domaine GGDEF augmente drastiquement ^{Chanet *al.*, 2004}.

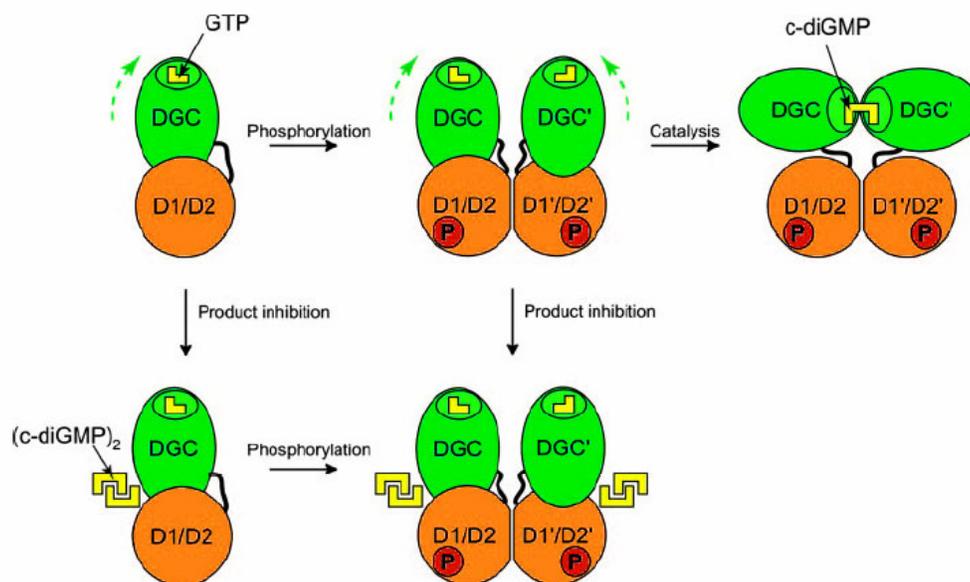


Figure 11 Modèle de l'activité catalytique de PleD ^{Chanet *al.*, 2004}.

La modulation de l'activité de PleD se fait par fixation d'un régulateur allostérique à l'interface D₂/DGC. Il s'agit plus précisément de deux molécules de diGMP cyclique orientées en tête bêche. Cette inhibition est non compétitive et se fait par stabilisation de l'interface D₂/DGC qui a pour conséquence d'empêcher le rapprochement des dimères de domaines DGC.

5. En résumé

PleD a plusieurs fonctions distinctes dans le développement polaire de *C. crescentus*. Il est requis pour éteindre la mobilité et permettre l'allongement du pédoncule lors de la transition de cellule flagellée à cellule pédonculée.

La présence de la protéine PleD tout au long du cycle cellulaire est expliquée par le fait que PleD joue un rôle à différents temps dans le cycle cellulaire de *C. crescentus*. Etant régulateur de réponse, PleD est contrôlé par les histidine kinases DivJ et PleC ; ces dernières conditionnent sa localisation au pôle pédonculé. PleD permet l'éjection du flagelle et la synthèse du stalk. Ces données concordent avec les phénotypes observés des mutants *pleD*.

En outre, CelR2 qui est un orthologue de PleD chez *R. leguminosarum*, a un rôle dans la synthèse de cellulose et par conséquent dans la formation de biofilms. Or le stalk chez *C. crescentus* se termine par un holfast qui est constitué d'exopolysaccharides tout comme la cellulose et qui joue également un rôle dans la formation de biofilm.

Les domaines GGDEF pourraient donc exercer un rôle global dans la formation de biofilms.

IV. PleD chez *Brucella*

Si *Caulobacter crescentus* a souvent été citée tout au long de ce mémoire, c'est parce que cette bactérie constitue un modèle vis-à-vis de la caractérisation de notre régulateur de réponse PleD. Tout en gardant à l'esprit qu'elle n'est qu'un modèle, elle nous permet d'émettre des hypothèses et nous met sur la voie concernant le rôle de PleD chez *Brucella spp.*

N'oublions pas non plus que ces deux bactéries ont des styles de vie bien différents. Alors que *Caulobacter* vit à l'état libre, *Brucella* est pathogène intracellulaire. D'autres différences importantes entre les deux bactéries sont encore à souligner. *Caulobacter* ne peut donc pas nous renseigner sur aucun mécanisme de virulence dans lequel PleD pourrait être impliqué. De plus, lors de son cycle cellulaire asymétrique, *Caulobacter* donne naissance à une cellule fille flagellée et une cellule fille pédonculée. Cette asymétrie morphogénique ne se retrouve pas chez *Brucella*.

Néanmoins, il existe un orthologue PleD chez *Brucella* et l'organisation opéronique *divK-pleD* est conservée chez les α -protéobactéries (*C. crescentus*, *S. meliloti*, *B. melitensis*,...). De plus il existe des orthologues des histidine kinases DivJ et PleC chez *Brucella spp.* Ces HK contrôlent l'activité de PleD chez *C. crescentus* en modifiant son état de phosphorylation.

V. Objectif de ce mémoire

L'objectif de ce mémoire est triple, Premièrement, nous créerons un mutant par délétion du gène *pleD* chez *Brucella* et caractériserons les phénotypes associés à la mutation. Deuxièmement, nous construirons les outils nous permettant tout d'abord de compléter les mutants *pleD* chez *B. melitensis* et *C. crescentus*, et aussi de localiser PleD chez *B. melitensis*. Enfin, nous tenterons de décrire le réseau de régulation de PleD en cherchant les interactions entre le régulateur de réponse PleD et les histidine kinases potentiellement impliquées dans sa phosphorylation.

RESULTATS

Les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire ont pour but la caractérisation du régulateur de réponse PleD chez *Brucella spp.*

D'un point de vue pratique, trois approches sont envisagées afin de déterminer le rôle du régulateur de réponse.

- Premièrement, on réalise la construction d'une souche délétante pour le gène d'intérêt à partir des souches sauvages de *B. melitensis* 16M et de *B. abortus* 544, nous tentons de mettre en évidence des phénotypes au niveau de la virulence mais aussi au niveau de la morphologie, et plus précisément au niveau du flagelle. Les techniques d'infection en modèle animal, de microscopie électronique et de western blot sont nécessaires à l'observation de ces phénotypes.
- Deuxièmement, dans le but de s'assurer que les phénotypes observés sont bien la conséquence de la délétion du gène *pleD*, nous construisons des vecteurs permettant de compléter les phénotypes des mutants *pleD*. Pour ce faire, des constructions plasmidiques contenant la copie sauvage du gène d'intérêt sont réalisées par technique Gateway^(TM). Un des plasmides est utilisé afin de localiser notre régulateur de réponse. Grâce aux gènes *cfp* ou *yfp* placés en fusion traductionnelle avec *pleD*. Tous ces vecteurs pourraient également être utilisés pour compléter les phénotypes du mutant *pleD* chez *C. crescentus*.
- Enfin, la troisième et dernière manipulation consiste à mettre en évidence des interactions protéines-protéine entre PleD et les différents acteurs potentiellement impliqués dans sa régulation. Ceci se fait par la technique du double hybride réalisé en levure.

I. Identification de PleD et des HK contrôlant potentiellement PleD chez *Brucella* spp.

La première étape du travail consistait à identifier au sein des génomes de *Brucella* spp. un orthologue de PleD, ainsi que des histidine kinases potentiellement impliquées dans le contrôle de PleD. Pour rappel, deux histidine kinases, DivJ et PleC, contrôlent l'état de phosphorylation de PleD chez *C. crescentus*. Lorsque nous recherchons par homologie de séquence les homologues des protéines DivJ et PleC au sein des génomes disponibles de *Brucella* spp. (*B. melitensis* 16M^{DelVecchioet al., 2002}, *B. abortus* 9-941^{Hallinget al., 2005} et *B. suis* 1330^{Paulsenet al., 2002}), trois protéines ressortent. Il s'agit de bmei1357 (appelé *divJ*), bmei1325 (appelé *pleC*) et bmei10417 (appelé *pdhs* pour *pleC-divJ* Homologue Sensor). Les pourcentages de similarité entre ces trois protéines et les protéines de *C. crescentus* sont repris ci-dessous

	c _c DivJ (597 aa)	c _c PleC (842 aa)
B _m DivJ (530 aa)	6 e ⁻⁴² (105/246)	4 e ⁻³⁷ (96/261)
B _m PleC (783 aa)	3 e ⁻⁴⁷ (105/221)	1 e ⁻⁹³ (238/659)
B _m PdhS (1035 aa)	1 e ⁻⁴⁴ (104/261)	4 e ⁻⁵³ (221/397)

Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de résidus conservés sur le nombre de résidus alignés.

Ce tableau reprend les e-values après un alignement de séquence pairé entre les histidine kinases DivJ et PleC de *C. crescentus* et les histidine kinases DivJ, PleC et PdhS de *B. melitensis*. Les e-values ont été choisies parce qu'elles tiennent compte non seulement des pourcentages de similarité/identité mais également de la longueur des portions alignées.

Par contre, un seul et unique orthologue à PleD de *C. crescentus* présentant 44% d'identité a été identifié au sein des génomes de *Brucella* spp. De manière intéressante, le gène bmeii0660 encodant PleD chez *Brucella* est directement situé en aval du gène bmeii0659, qui encode une protéine présentant 79% d'identité avec DivK de *C. crescentus*. Les protéines DivK et PleD des deux espèces s'alignent sur toute leur longueur.

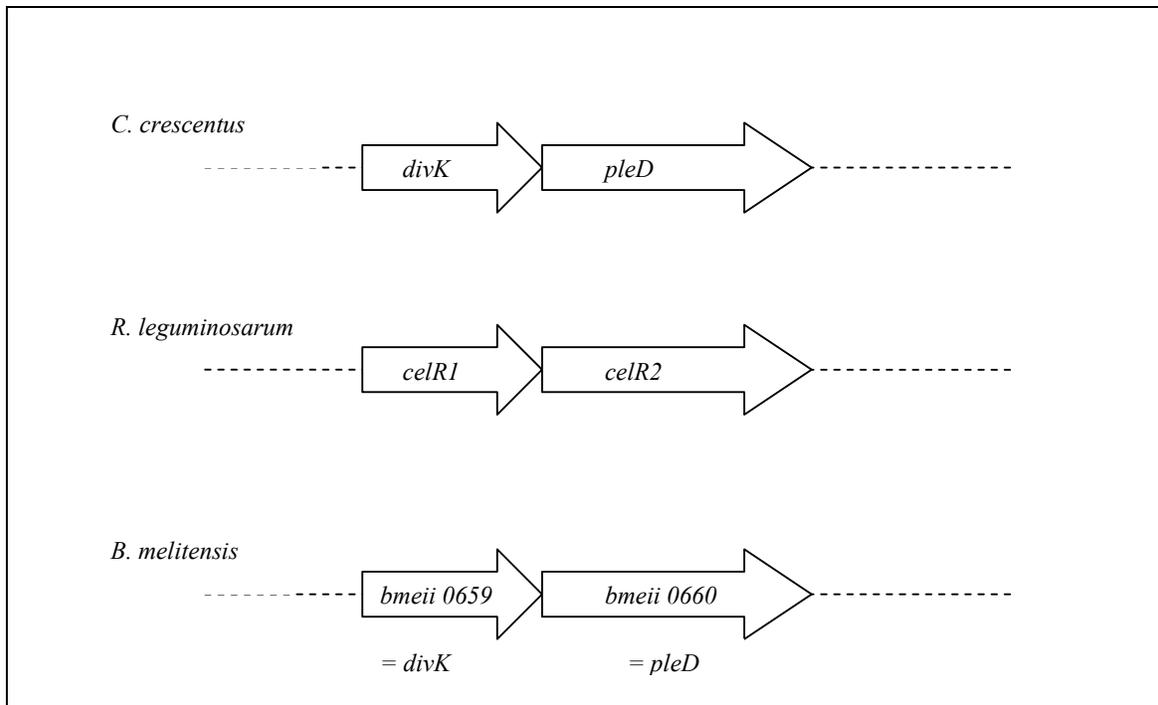


Figure 1 Organisation opéronique de *divK-pleD* chez trois espèces d' α -protéobactéries.

Comme l'illustre la figure 1, l'organisation opéronique entre *divK* et *pleD* semble être conservée chez au moins trois espèces d' α -protéobactéries : *C. crescentus*, *R. leguminosarum* et *B. melitensis*.

En résumé, la recherche d'homologues au sein des génomes de *Brucella* nous a permis d'identifier un orthologue de PleD ainsi que trois protéines potentiellement impliquées dans le réseau de régulation de PleD : DivJ, PleC et PdhS.

II. Construction du délétant *pleD* et observation des phénotypes

La construction du délétant *pleD* devrait permettre de proposer une fonction pour PleD en examinant l'effet de son absence sur les caractéristiques de la bactérie, notamment au niveau de la virulence et de la morphologie. La souche délétante est complètement débarrassée de la séquence codante du gène d'intérêt, et par conséquent, cette souche perd toutes les fonctions de la protéine. Il est donc plus aisé d'interpréter les phénotypes causés par la perte de la protéine et de lui en attribuer un rôle global. C'est dans ce but que nous avons procédé à une délétion du gène *pleD* chez *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 544.

Pourquoi réaliser la délétion chez ces deux souches bactériennes ? Premièrement c'est chez *B. melitensis* 16M que l'observation du flagelle a été réalisée au laboratoire et qu'une des fonctions putatives de PleD réside dans sa capacité à contrôler l'arrêt de la mobilité. La délétion a aussi été réalisée chez *B. abortus* 544, car c'est chez cette souche qu'une partie des gènes du réseau de régulation ont été délétés à savoir les gènes *pleC* et *divJ*.

1. Construction du plasmide de délétion

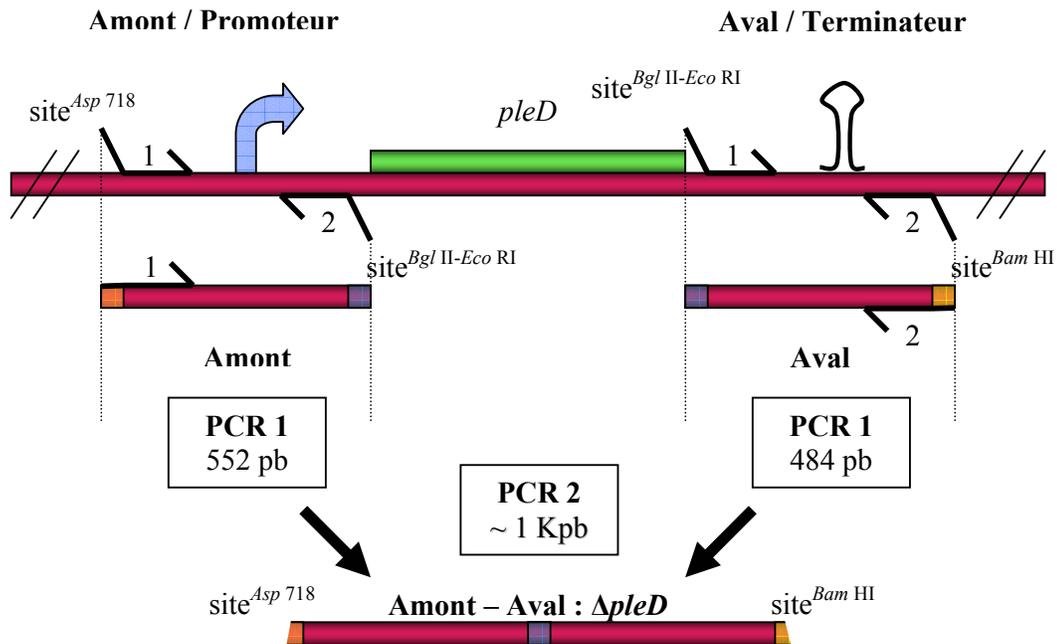


Figure 2 Amplification des parties amont et aval du gène d'intérêt *pleD*.

Le but de cette manipulation est l'obtention de souches de *B. melitensis* et *B. abortus* dont on a enlevé le gène d'intérêt *pleD*. La technique utilisée se base sur le principe d'échange allélique : la séquence codante de *pleD* va être remplacée par un marqueur de sélection (marqueur de résistance à la kanamycine).

De façon pratique, on vient abouter des portions correspondantes à la région en amont et en aval de la séquence codante *pleD*. Ces portions sont assez longues que pour favoriser un double évènement de recombinaison (environ 500 pb chacune). Après cela, on vient insérer une cassette de résistance à la kanamycine entre ces deux portions afin de pouvoir sélectionner les délétants. (Voir figures 3 et 4)

a. Construction du vecteur pour réaliser la délétion

Une première PCR permet d'amplifier les régions en amont et en aval de la séquence codante *pleD*. Il faut avant tout déterminer les amorces qui permettent d'amplifier ces régions. On conçoit alors une paire d'amorces délimitant environ 500 paires de bases en amont du gène à déléter (552pb). On fait la même chose pour la région en aval (484pb).

Les amorces externes (amont 1 et aval 2) ont au niveau de leur extrémité 5' un site de restriction respectivement pour les enzymes *Asp 718* et *Bam HI*. Les amorces nommées amont 2 et aval 1 portent quant à elles des sites de restriction pour les enzymes *Bgl II* et *Eco RI* (Figure 2). La succession de ces deux sites de restriction à séquence palindromique nous permet d'avoir une région complémentaire d'environ 15 nucléotides entre la fin de l' amont et le début de l'aval. C'est donc grâce à cette région complémentaire que les régions amont et aval de *pleD* peuvent être aboutées en servant de matrice lors de la seconde PCR.

Cette seconde PCR utilise les amorces amont 1 et aval 2 sur les deux fragments pour amplifier un fragment d'environ 1 Kpb correspondant à la fusion des deux premiers produits PCR de 500 pb (Figure 2). Le produit PCR final est alors dénommé *ΔpleD*.

Après purification du produit PCR et son analyse par électrophorèse en gel d'agarose, on restreint le fragment *ΔpleD* avec les enzymes de restriction *Asp* 718 et *Bam* HI (figure 3). Cette restriction va alors permettre le clonage directionnel du produit PCR dans le pSKoriT, vecteur plasmide conférant la résistance à l'ampicilline. Celui-ci sera également restreint par les mêmes enzymes. Les deux produits de restriction sont alors mis en présence dans un rapport moléculaire insert/matrice 1 pour 1. Le plasmide pSKoriT-*ΔpleD* est alors sélectionné par test blanc/bleu sur un milieu LB supplémenté d'ampicilline et de X-Gal (voir matériels et méthodes page 55) et validé par restriction enzymatique diagnostique. Enfin, un séquençage du fragment *ΔpleD* dans le pSK oriT a été effectué.

L'étape suivante consiste à insérer une cassette de résistance à la kanamycine (*kan^R*) dans le pSKoriT-*ΔpleD*. La cassette de résistance à l'antibiotique est isolée du plasmide pUC4K suite à une restriction par *Bam* HI. Le plasmide pSKoriT-*ΔpleD* est restreint quant à lui par *Bgl* II dont le site est présent entre la partie amont et aval. La direction du clonage n'a pas d'importance ici, puisque le gène *kan^R* possède son propre promoteur et son propre terminateur. Le produit se nomme alors pSKoriT-*ΔpleD::kan^R*.

Une restriction diagnostique permettra tout de même de s'assurer du caractère unique de l'insertion de la cassette de résistance à la kanamycine (Figure 3).

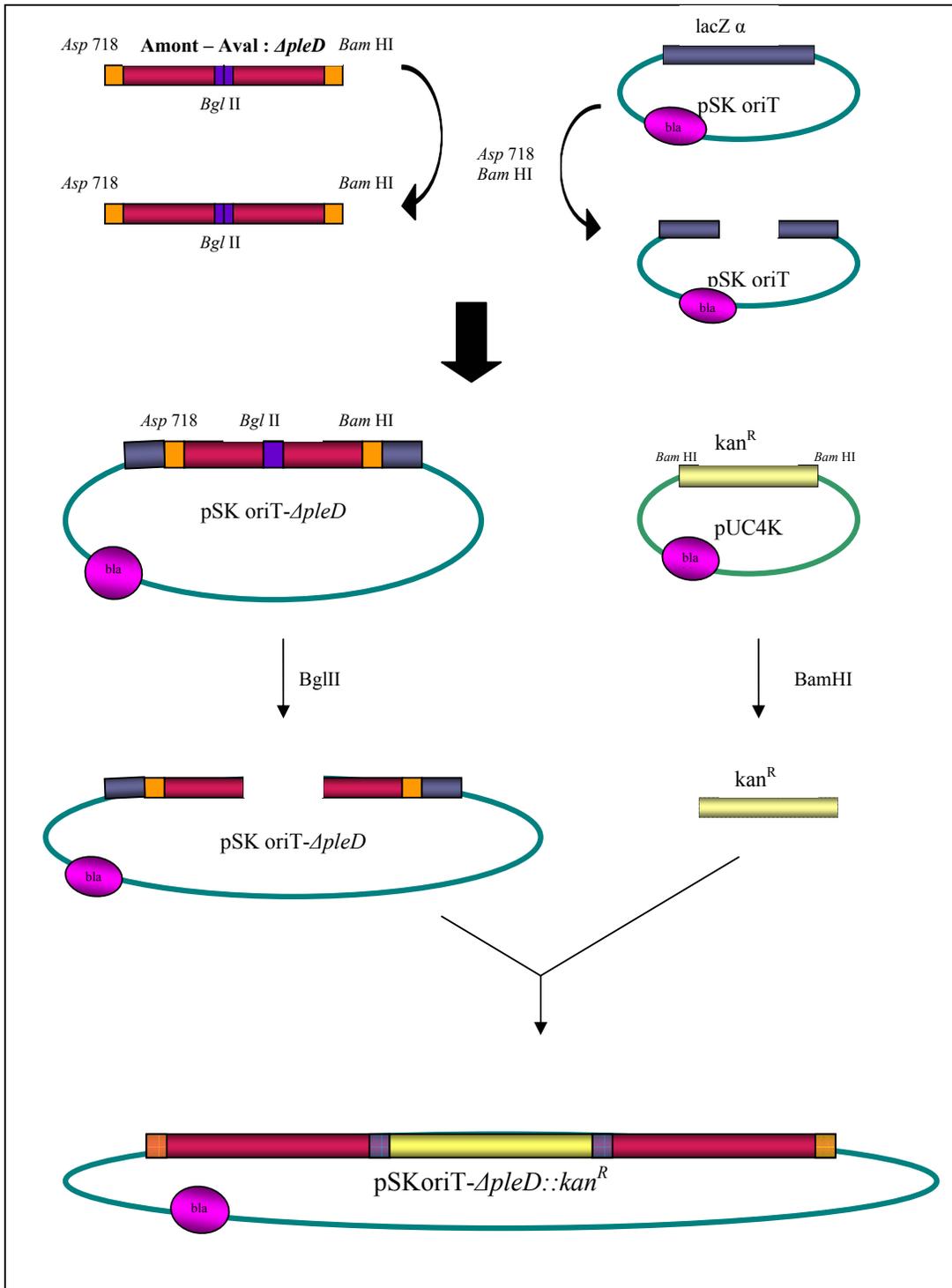


Figure 3 Insertion du produit PCR dans le pSKoriT et insertion de la cassette de résistance à la kanamycine.

b. Changement de marqueur plasmidique

La construction plasmidique pSKoriT-*ApleD::kan^R* contient une cassette de résistance à l'ampicilline. Or, *Brucella* est déjà légèrement résistante à l'ampicilline ce qui rend l'utilisation de cet antibiotique problématique. Pour pallier à ce problème, nous avons transféré l'insert *ApleD::kan^R* du pSKoriT dans le pSKoriT-*cat* au moyen des enzymes *Asp* 718 et *Sac* I. La transformation et la sélection des clones résistants à la kanamycine et au chloramphénicol, ainsi qu'une restriction diagnostique par *Bam* HI, nous permettent de nous assurer que le plasmide obtenu est bien celui qui était attendu, ce plasmide final est nommé pSKoriT-*cat-ApleD::kan^R*.

2. Création des souches

a. Conjugaison dans *B. melitensis* et *B. abortus*

Le vecteur construit pSKoriT-*cat-ApleD::kan^R* est introduit par conjugaison dans *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 544. Ensuite, on repique et sélectionne les clones capables de pousser sur milieu contenant de la kanamycine. Une seconde série de repiquage se fait alors sur milieu kanamycine et sur milieu chloramphénicol. Ce second test de croissance nous permet de savoir de quel événement de recombinaison il s'agit ; en effet, trois possibilités s'offrent à nous :

- Soit il y a un simple événement de recombinaison. Celui-ci a lieu dans les régions amont ou dans la région avale de *pleD*. La souche est alors résistante à la kanamycine et au chloramphénicol (Figure 4).
- Soit il y a un double événement de recombinaison. Celui-ci a lieu dans le promoteur et le terminateur ; la cassette de délétion est intégrée dans le génome à la place de la séquence codante. Le plasmide ayant servi à la conjugaison est éliminé, étant donné qu'il n'a pas d'origine de répllication compatible chez *Brucella*. La souche est résistante à la kanamycine mais sensible au chloramphénicol (Figure 4). C'est cette possibilité de recombinaison qui nous intéresse.
- Soit il y a intégration ectopique et le phénotype de la souche est identique à l'intégration (simple événement de recombinaison), à savoir résistante à la kanamycine et au chloramphénicol.

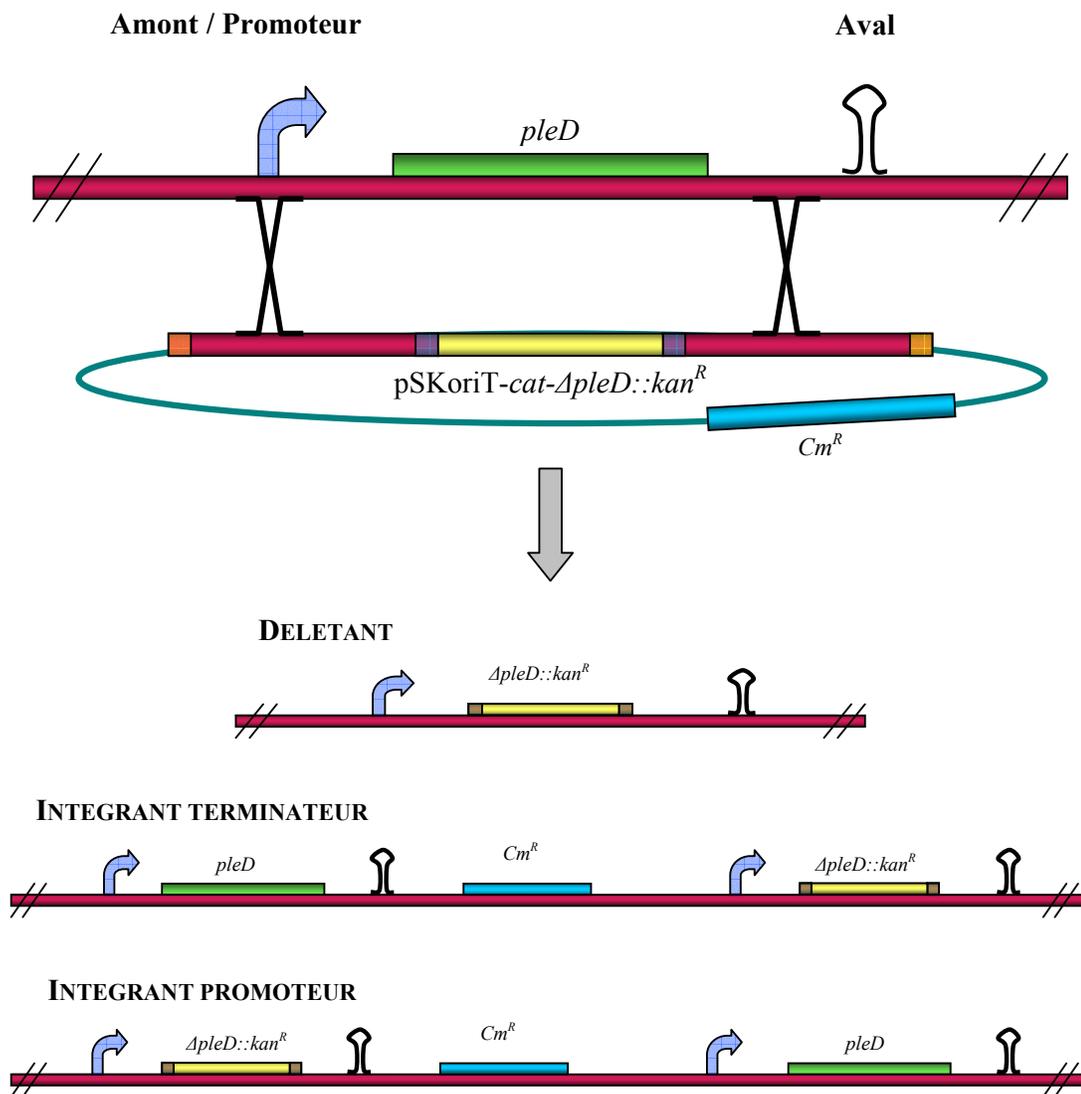


Figure 4 Evènements théoriques de recombinaison entre notre construction plasmidique et le génome bactérien.

Après la sélection des candidats sur boîte de culture, une PCR nous permet de confirmer l'absence du gène *pleD*. Lors de cette PCR, nous cherchons à amplifier deux portions de gène; la première se trouve dans *pleD* dont nous voulons vérifier l'absence (test) et la seconde se trouve dans *ctrA* dont nous voulons vérifier la présence afin de valider la PCR (contrôle interne). Un autre contrôle consiste à réaliser la PCR sur un échantillon de la souche sauvage (Figure 5).

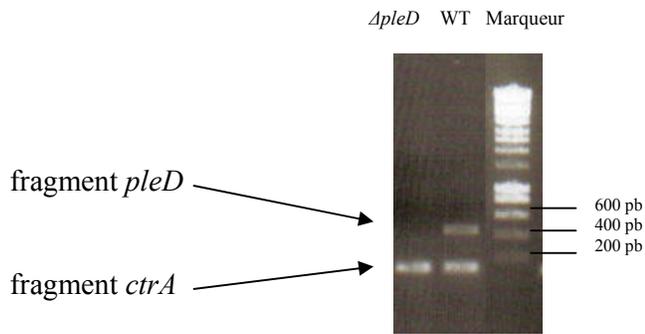


Figure 5 Electrophorèse en gel d'agarose des fragments internes de *pleD* et *ctrA* amplifiés par PCR.

Nous pouvons identifier sur cette figure un clone correspondant à ce que nous cherchions, c'est-à-dire une intégration de la construction plasmidique par double évènement de recombinaison, ce qui nous donne une PCR positive pour *ctrA* (199 pb) et négative pour *pleD* (477pb) contrairement à la souche sauvage qui est positive pour les deux PCR's. Suite à plusieurs essais, nous sommes parvenus à identifier un clone pour *B. melitensis*.

Nous avons réalisé un Southern blot de manière à vérifier le génotype des candidats $\Delta pleD::kan^R$. Cette technique consiste à restreindre l'ADN génomique de chaque souche candidate, de séparer les fragments obtenus par électrophorèse en gel d'agarose 1% et de les transférer sur membrane de nylon. Une sonde spécifique obtenue à partir de la partie amont de *pleD*, nous permet alors de mettre en évidence les bandes d'intérêt. Le même Southern blot effectué sur l'ADN génomique issu de la souche sauvage nous sert de contrôle positif (Figure 6).

ADNg de :	B. mel.	$\Delta pleD$
Restriction en :	<i>Hind</i> III	
Profil attendu	5 Kpb	5,7 Kpb
Profil intégrant promoteur	-	4,6 Kpb 5,7 Kpb
Profil intégrant terminateur	-	5 Kpb 5,8 Kpb

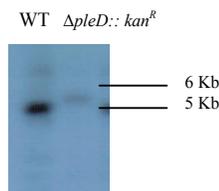


Figure 6 Southern blot sur ADN génomique de *B. melitensis* et candidats $\Delta pleD$.

Comme l'illustre la figure 6, le profil du candidat correspond parfaitement au profil d'un $\Delta pleD::kan^R$.

Par contre, malgré le criblage d'une centaine de clones, aucun mutant $\Delta pleD::kan^R$ chez *B. abortus* n'a pu être obtenu. Nous avons alors décidé de travailler avec le mutant obtenu chez *B. melitensis* 16M.

3. Caractérisations phénotypiques

L'obtention d'un délétant *pleD* par double évènement de recombinaison nous montre déjà que le gène *pleD* n'est pas essentiel pour la croissance en milieu riche (2YT), du moins chez *B. melitensis*. Pour évaluer l'implication du gène *pleD* dans la virulence de *B. melitensis* 16M, la survie des délétants a été testée lors d'une infection dans le modèle murin BALB/c, ceci en comparaison avec la souche sauvage. En parallèle, d'autres expériences ont été réalisées afin de savoir si PleD intervenait au niveau du flagelle de *B. melitensis* 16M. A cet effet, nous avons observé la production de la protéine flagellaire FlgE chez le délétant *pleD* en comparaison avec la souche sauvage, grâce à la technique du western blot. Nous avons également visualisé la présence du flagelle en microscopie électronique après coloration en « negative staining ».

a. Phénotype de virulence : test de survie en modèle murin

Pour évaluer la virulence du délétant *pleD*, nous avons procédé à des infections en modèle murin. Huit souris femelles BALB/c âgées de 7 semaines ont été infectées par voie intrapéritonéale avec les souches sauvage et $\Delta pleD$ de *B. melitensis* 16M.

Après une et quatre semaines d'infection, les souris ont été sacrifiées et les rates ont été récupérées afin d'en extraire les *Brucella*. Nous avons ensuite dénombré les bactéries (CFU, colony forming units) par rate pour le délétant, ainsi que pour la souche sauvage.

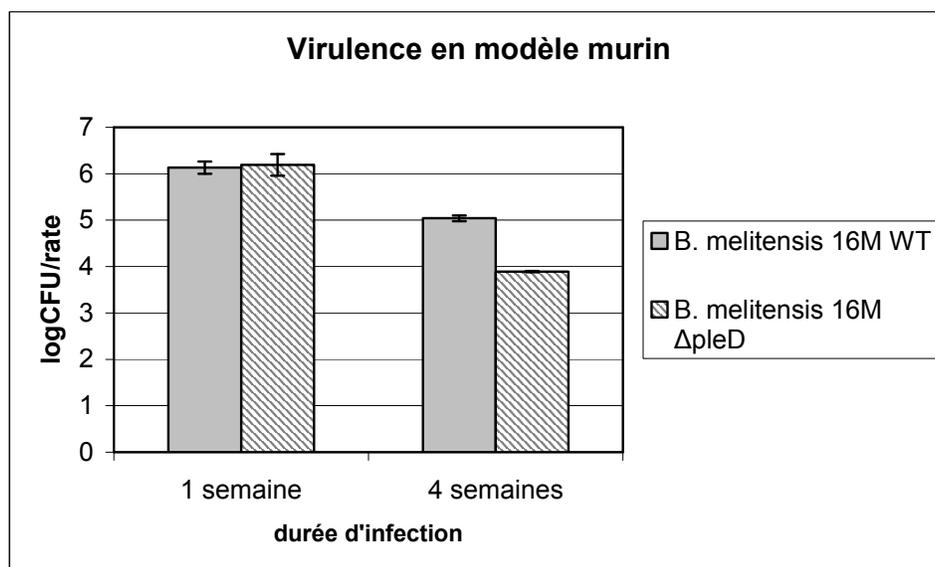


Figure 7 Survie de *B. melitensis* $\Delta pleD$ en comparaison avec la souche sauvage (WT) après 1 et 4 semaines d'infection.

Les résultats obtenus (Figure 7) montrent qu'il y a non pas, atténuation de la virulence après une semaine d'infection, mais qu'il y a atténuation de la virulence après 4 semaines d'infection. En effet, on dénombre plus de dix fois moins de bactéries pour les souris infectées par le délétant par rapport aux souris infectées par la souche sauvage.

b. Phénotype morphologique : présence du flagelle

L'étude du génome de *Brucella melitensis* 16M montre que cette bactérie a toutes les séquences codantes prédites nécessaires à la synthèse et à la fonction d'un flagelle et que celui-ci a été observé ^{Fretinet *et al.*, 2005}. Il était intéressant pour nous d'observer l'effet de l'absence de *pleD* sur la présence du flagelle chez *B. melitensis*. En effet, nous savons que chez *C. crescentus*, PleD a une effet positif sur l'éjection du flagelle. Rappelons que l'expression des gènes flagellaires n'a lieu que pendant une période assez courte de la croissance de *Brucella*. Cette période s'étend plus exactement de la fin de la phase de latence au début de la phase exponentielle.

Deux techniques ont été utilisées pour détecter soit les protéines flagellaires, soit la structure flagellaire : le western blot et l'observation en microscopie électronique à transmission. Ces données ont été obtenues à partir des mêmes cultures bactériennes afin de pouvoir comparer les résultats. La préparation des échantillons se réalise de la façon suivante; après inoculation de cultures liquides de *B. melitensis* 16M sauvage et $\Delta pleD$ dans du milieu 2YT ajustée à une DO^{600} de 0,03, à partir de précultures cultivées une nuit à 37°C avec agitation, on prélève des échantillons à différents temps d'incubation. Ces échantillons sont traités différemment suivant qu'il s'agisse du western blot ou de la microscopie.

→ *Western blot*

Les extraits bruts obtenus à différents temps post-inoculation à partir des souches sauvage et délétante sont séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane et révélés avec un polysérum de lapin dirigé contre la protéine structurale du coude flagellaire FlgE. Nous avons veillé à déposer dans chaque puits une quantité équivalente de bactéries (évalué par DO^{600}). En effet, comme le montre la figure 9, la souche $\Delta pleD$ ne présente aucun retard de croissance par rapport à la souche sauvage. Nous pouvons dès lors considérer qu'à une DO^{600} , particulièrement nous avons le même nombre de bactéries par unité de volume, donc la même quantité de protéines totales. Le contrôle positif utilisé est la protéine FlgE recombinante purifiée (FlgE-His6).

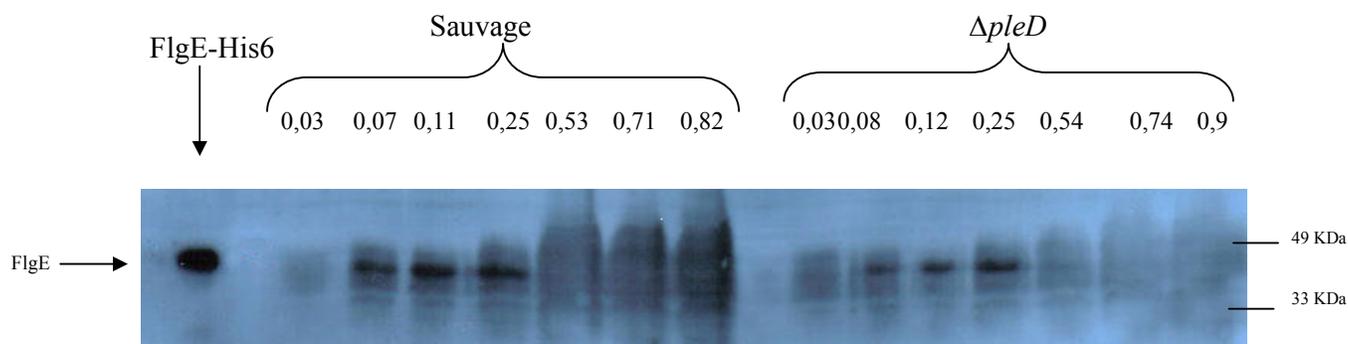


Figure 8 Western blot anti-FlgE avec des échantillons issus de cultures de souches *B. melitensis* 16M sauvage et $\Delta pleD$ à différentes DO^{600} .

La taille attendue pour la protéine flagellaire est de 40 kDa. Il faut remarquer que la protéine FlgE recombinante purifiée a une taille d'environ 42 kDa dus à la présence d'un « tag » contenant six résidus histidines qui ont été nécessaires à la purification de la protéine par chromatographie d'affinité.

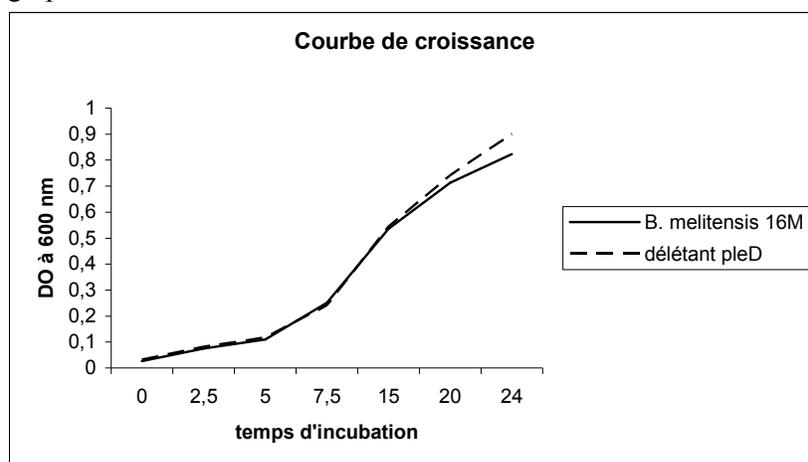


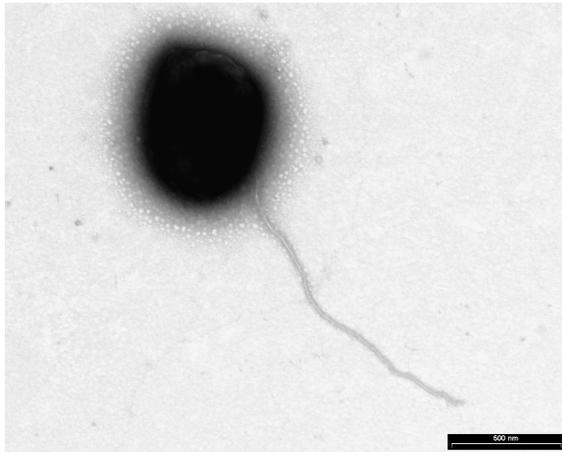
Figure 9 Courbe de croissance des souches sauvage et $\Delta pleD$ cultivées en milieu riche.

Deux conclusions peuvent être tirées des résultats obtenus avec le western blot anti-FlgE représenté à la figure 8. Tout d'abord, nous pouvons observer un pic d'expression de FlgE dans la souche sauvage de *B. melitensis* 16M pour des DO^{600} comprises entre 0,07 et 0,5. Cette donnée confirme les résultats obtenus préalablement dans le laboratoire ^{Fretinet *et al.*, 2005}. D'autre part, aucune différence n'est observée entre les souches sauvage et $\Delta pleD$. En effet, $\Delta pleD$ présente un profil d'expression de FlgE comparable à la souche sauvage de *B. melitensis* 16M. Ajoutons que nous avons hybridé la même membrane avec un Ac dirigé contre une autre protéine, en l'occurrence Omp89, ce qui nous a permis de confirmer la présence en quantité équivalente de protéines dans toutes les pistes et ce pour les deux souches.

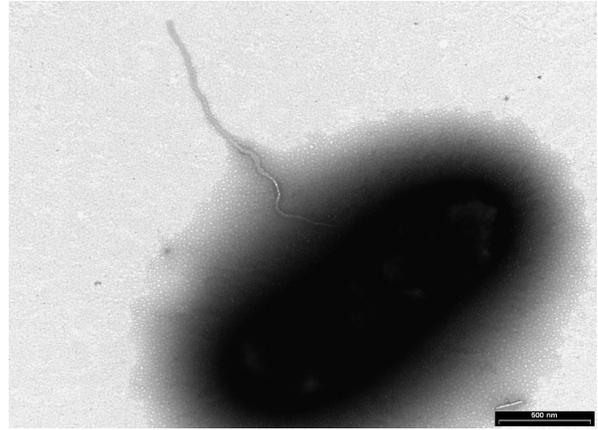
→ *Microscopie électronique à transmission*

Des bactéries des souches sauvage et $\Delta pleD$ à différents stades de croissance (fin de la phase de latence et la fin de la phase exponentielle de croissance) ont été prélevées. Après centrifugation, les bactéries sont fixées au paraformaldéhyde, déposées sur grille de microscopie et colorés à l'acétate d'uranyle.

DO⁶⁰⁰ ~ 0,2

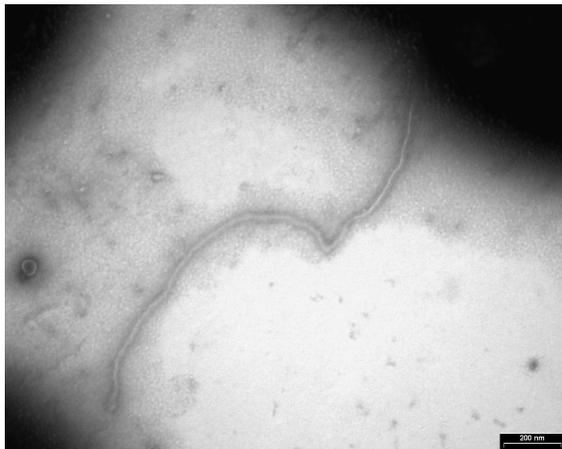


WT (1)

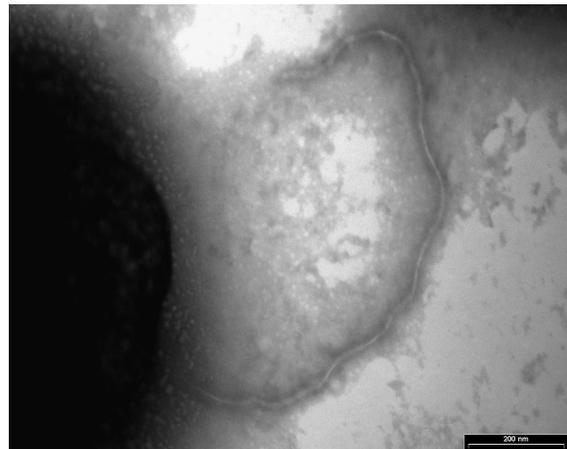


ΔpleD (2)

DO⁶⁰⁰ ~ 0,6

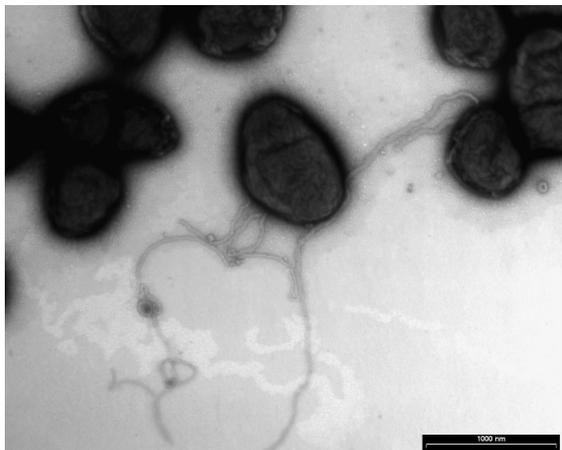


WT (3)

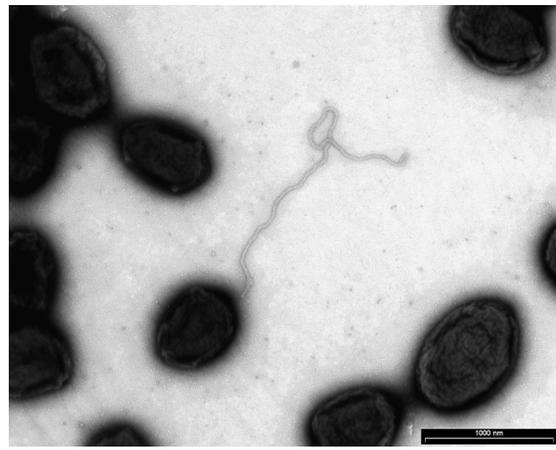


ΔpleD (4)

DO⁶⁰⁰ ~ 0,8



WT (5)



ΔpleD (6)

Figure 10 Microscopies électroniques de *B. melitensis* 16M et $\Delta pleD$ prises à différents stades de croissance : 1 et 2 correspondent aux $DO^{600} = 0,2$; 3 et 4 aux $DO^{600} = 0,6$ et 5 et 6 aux $DO^{600} = 0,8$. 1, 3 et 5 représentent la souche sauvage et 2,4 et 6 représentent la souche $\Delta pleD$ de *B. melitensis* 16M.

Quelque soit la DO à laquelle nous observons nos deux souches, aucune différence entre souches sauvage et délétante *pleD* n'a pu être mise en évidence. Il faut noter aussi qu'une faible proportion de cellules pourvues d'un flagelle a été observée dans la population totale (de l'ordre du %).

III. Construction d'outils plasmidiques

Une des expériences envisagée pour décrire le rôle biologique de PleD chez *B. melitensis* est une complémentation hétérospécifique d'un mutant *pleD* de *C. crescentus*. En effet, les fonctions assurées par PleD sont particulièrement bien décrites chez cette espèce. L'orthologue de BmPleD identifié chez *B. melitensis* 16M partage 64 % de similarité avec CcPleD de *C. crescentus*. Dès lors, si BmPleD est capable de remplacer fonctionnellement CcPleD, nous pourrions émettre des hypothèses quant aux fonctions assurées par BmPleD. En outre, CcPleD présente la particularité de localiser au pôle pédonculé de *C. crescentus*^{Paulet al., 2004}. Nous envisageons de localiser PleD chez *B. melitensis* 16M et ainsi vérifier si la localisation polaire de ce régulateur de réponse est une caractéristique conservée chez les α -protéobactéries.

L'approche utilisée pour construire les vecteurs pour la complémentation et la localisation est le clonage de type GatewayTM.

Le système de clonage Gateway par recombinaison est basé sur le système de recombinaison site spécifique du bactériophage λ qui fournit un moyen rapide et efficace de transférer des séquences d'ADN dans un système de vecteurs multiples en vue d'analyses fonctionnelles. Chez le bactériophage λ , la recombinaison a lieu entre le phage et le chromosome de *E. coli* via des séquences de recombinaison spécifiques (on parlera de site *att* pour attachement), et est catalysée par différentes enzymes de recombinaison. Une des caractéristique importante de cette recombinaison est que les réactions d'intégration et d'excision ne mettent pas en jeu les mêmes paires de séquences, les réactions ont donc un caractère directionnel. Le système de clonage Gateway^(TM) par recombinaison se fait en trois étapes :

- a. Premièrement, on amplifie *pleD* par PCR au moyen d'amorces dont l'extrémité 3' de 20 bases s'hybride sur la séquence d'intérêt et dont l'extrémité 5' contient les sites de recombinaison *attB1* pour l'amorce amont et *attB2* pour l'amorce aval. Le produit PCR obtenu est donc constitué de la séquence de *pleD* flanquée des sites *attB1* et *attB2* à ses extrémités.

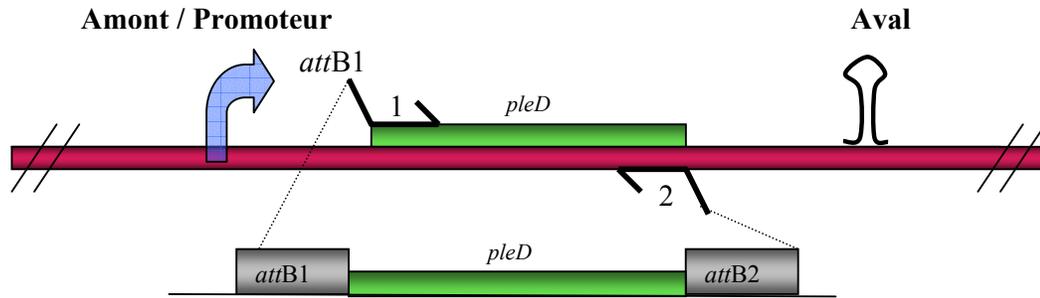


Figure 11 Amplification d'un produit PCR flanqué des sites attB1 et attB2.

- b. La seconde étape correspond à la réaction BP où l'on clone *pleD* dans un vecteur donneur par recombinaison entre les sites *attP1* et *attP2* de ce vecteur avec les sites *attB1* et *attB2* de chaque côté du gène. Cette recombinaison génère un vecteur d'entrée qui contient la séquence codante *pleD* bordé des sites *attL1* et *attL2*. Cette réaction est catalysée par le mix enzymatique BP clonaseTM, qui correspond au mélange de l'intégrase du phage λ (Int) et de la protéine de *E. coli* IHF (Integration host factor).

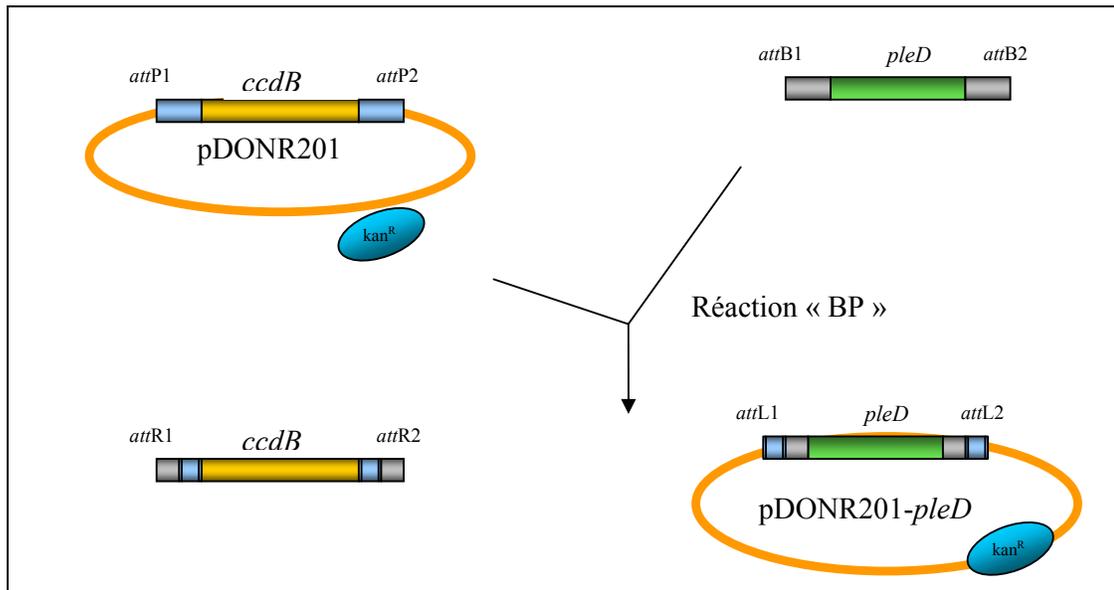


Figure 12 Schéma de la réaction BP entre le gène d'intérêt *pleD* et le vecteur donneur (pDONR201).

En guise de diagnostic, le pDONR201-*pleD* est restreint par les enzymes *Hpa* I et *Pvu* II. Les produits de la restriction sont déposés sur gel. Les tailles attendues des fragments sont de 2023 pb et 1618 pb.

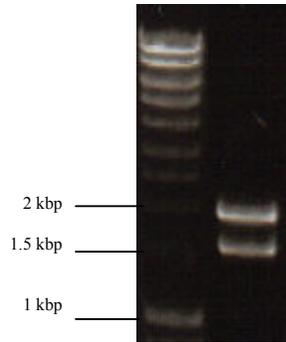


Figure 13 Electrophorèse en gel d'agarose 1% de la construction restreinte en Hpa I et Pvu II.

- c. La troisième et dernière étape est la réaction LR. Cette étape permet la recombinaison d'un clone d'entrée contenant les sites *attL* avec un vecteur de destination contenant les sites *attR*, afin de créer un plasmide d'expression contenant les sites *attB* (Figure 14). Le gène *pleD* contenu dans le vecteur d'entrée est cloné dans une série de vecteurs de destination. Cette réaction est catalysée par le mix enzymatique contenant l'intégrase (Int) et l'excisionase (Xis) du phage λ , ainsi que la protéine IHF de *E. coli*.

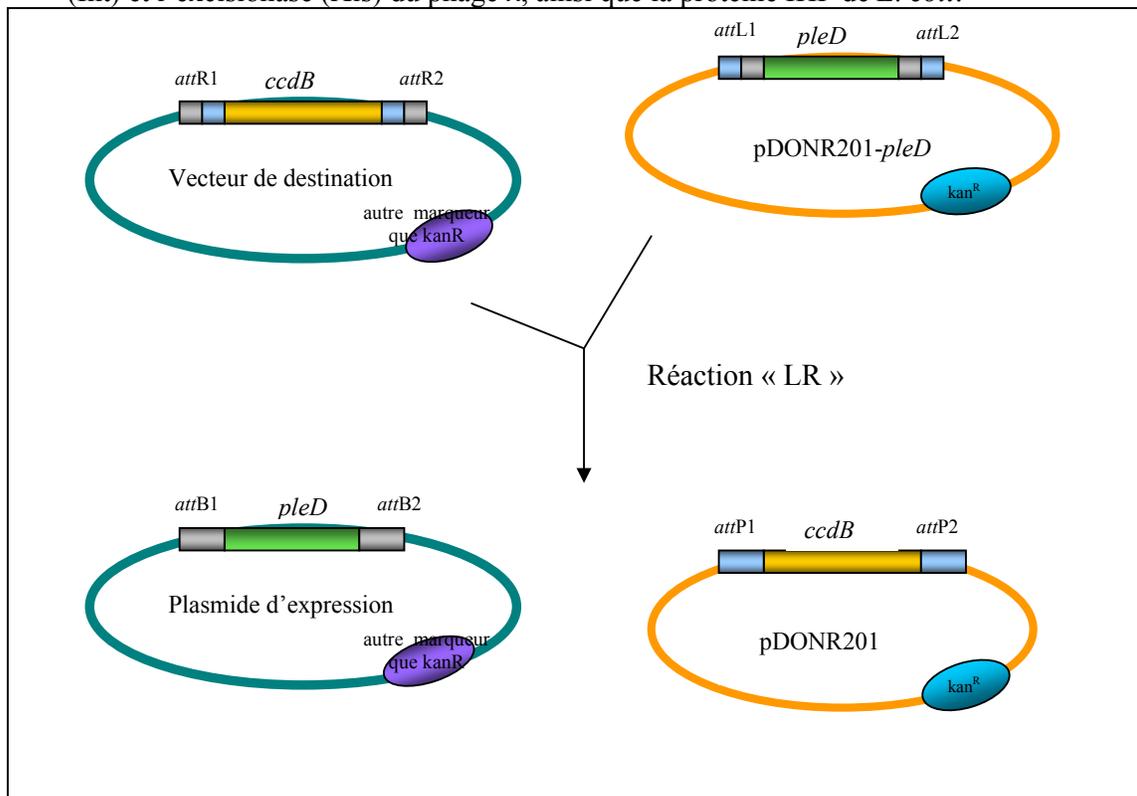


Figure 14 Schéma de la réaction LR entre le vecteur d'entrée contenant le gène *pleD* (*pDONR201-pleD*) et le vecteur de destination, qui permet l'obtention du plasmide d'expression.

Durant ce mémoire, la construction des plasmides d'expression a été réalisée. Nous avons inséré la séquence codante de *pleD* dans des vecteurs d'expression qui permettent la

complémentation chez *Brucella* ou l'hétérocomplémentation chez une autre bactérie (pMR10-*cat-pleD* et pBBR1-*cat-pleD*) et dans d'autres vecteurs qui permettront la localisation subcellulaire de PleD (pMR10-*cat-pleD-cfp*, pMR10-*cat-pleD-yfp*, pKSoriT-*pleD-cfp* et pKSoriT-*pleD-yfp*).

Le plasmide dérivé de pBBR1 est « medium-copy » chez *Brucella* (environ 10 à 20 copies par cellules^{Kovachet al., 1995}), tandis que le plasmide dérivé de pMR10 est dit « low copy » chez *Brucella* (environ 2 à 4 copies par cellule). Les protéines CFP et YFP permettront la localisation subcellulaire de PleD car elles fluorescent à des longueurs d'onde caractéristiques. Dans les vecteurs dérivés de pMR10 (pMR10-*cat-pleD-cfp* et pMR10-*cat-pleD-yfp*), on assure une production élevée et constitutive des protéines de fusion PleD-CFP ou PleD-YFP grâce au promoteur *lac* de *E. coli*. Dans les plasmides dérivés de pKSoriT (pKSoriT-*pleD-cfp* et pKSoriT-*pleD-yfp*), les fusions avec PleD devraient être produites à un taux comparable à celui de PleD dans la souche sauvage, ce qui limite le risque de surproduction de la fusion, qui peut s'accompagner d'une perte de la localisation détectée. Par contre, si les fusions avec PleD sont peu abondantes dans les conditions de culture utilisées, elles peuvent ne pas être détectables.

IV. Recherche de partenaires protéiques pour PleD

Nous avons décidé de cloner les séquences codantes de 5 partenaires présumés de PleD, à savoir DivJ, PleC, PdhS, DivK et PleD lui-même. En effet, PleC et DivJ sont des histidine kinases partenaires de PleD chez *C. crescentus*. PdhS est une histidine kinase homologue à PleC et DivJ (d'où son nom PleC-DivJ homologue sensor), mais qui a la particularité de ne pas présenter de segment transmembranaire prédit. PdhS, DivJ et PleC ont été décrits comme partenaires de DivK lors d'un test double hybride en levure (Hallez, Van Mullem et Wéry, non publié). Comme il est possible que PleD interagisse avec DivK, nous avons également testé cette interaction. Enfin, nous avons également testé l'homodimérisation de PleD. Au total, 5 séquences codantes (complètes ou tronquées) sont testées.

Le transactivateur (par exemple Gal 4) est un facteur *trans* capable de moduler la transcription d'un gène (par exemple *GALI*) en se liant à un élément *cis* de l'ADN appelé UAS (upstream activator sequence) (par exemple UAS_G ou UAS_{GAL}) située dans le promoteur du gène cible. Il est constitué d'un domaine d'activation, AD (activation domain) qui recrute la machinerie de transcription, et d'un domaine de liaison à l'ADN, BD (binding domain). Si l'on sépare physiquement ces deux domaines, alors le transactivateur n'est plus fonctionnel, dans la mesure où chacun de ces domaines ne peut à lui seul activer la transcription. En venant lier à ces domaines des protéines X et Y par génie génétique, on peut reconstituer le facteur de transcription dans le cas où les deux protéines interagissent. Si un gène rapporteur (*lacZ* ou *HIS3* par exemple) est placé en aval d'un promoteur cible, l'expression du gène rapporteur sera alors une indication de l'interaction protéine-protéine entre X et Y (Figure 15).

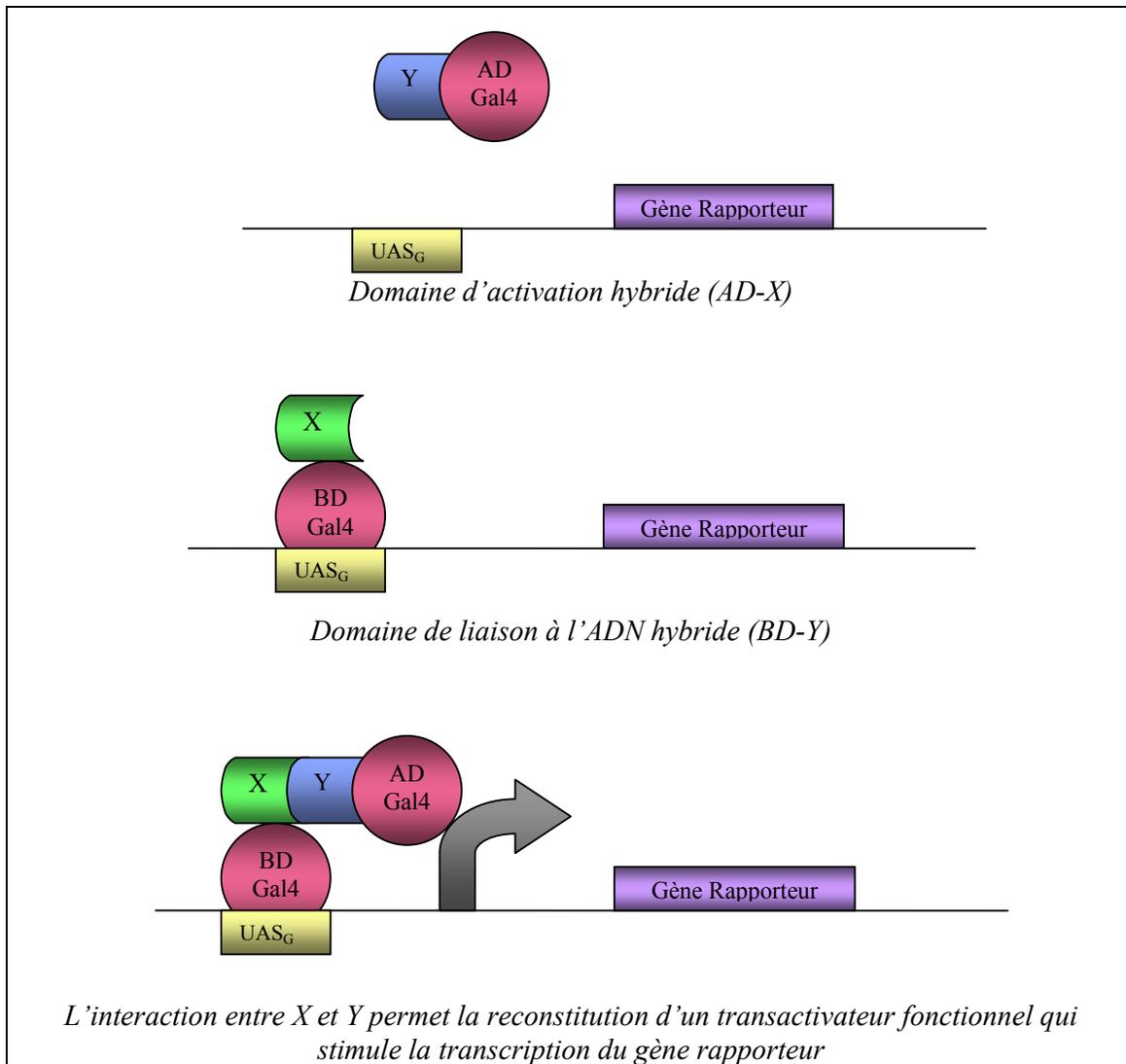


Figure 15 Détection des interactions protéiques (X-Y) par le système double hybride en levure.

Il est nécessaire de contrôler que AD-Y et BD-X n'activent pas la transcription du gène rapporteur à eux seuls. C'est pour cette raison que des contrôles négatifs sont réalisés.

1. Choix de partenaires présumés et clonage des séquences codantes

Le test double hybride en levure nécessite la réalisation d'un plasmide « appât » encodant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine BD de Gal4 et la protéine Y (BD-Y), ainsi que le plasmide « proie » encodant le produit de la fusion traductionnelle entre l'AD et la protéine d'intérêt X (AD-X).

Pour effectuer cette expérience, nous avons utilisé deux vecteurs multicopies contenant soit la séquence du domaine d'activation (pVV213), soit la séquence du domaine de liaison à l'ADN (pVV212) du transactivateur de Gal4, tous deux compatibles Gateway.

Le laboratoire disposait des vecteurs pVV212 et pVV213 dans lesquels étaient clonés les séquences codantes de *pleC*, *divJ*, *pdhS* et *divK*. (R. Hallez et J. Mignolet). Soulignons que les séquences codantes des HK DivJ et PleC, correspondent à des versions tronquées en N-terminal, c'est-à-dire dépourvues de tout domaine transmembranaire. Ceci parce que des protéines membranaires peuvent ne pas traverser la membrane nucléaire des levures pour transactiver les gènes rapporteurs et donc contribuer à augmenter le nombre de faux négatifs. Il nous restait à réaliser une réaction LR entre le vecteur d'entrée pDONR201-*pleD* et les vecteurs receveurs adaptés au double hybride (pVV212 et pVV213). Nous avons ensuite transformé des bactéries DH10B avec le produit de ces 2 réactions LR. Après vérification des préparations d'ADN par restriction diagnostique, puis nous avons sélectionné les transformants sur milieu contenant de l'ampicilline.

2. Test d'interaction protéine/protéine

Nous avons réalisé une matrice de 25 interactions (5x5 interactions) où chaque BD-P est testé contre chaque AD-P et chaque AD-P est testé contre chaque BD-P, P correspondant à chaque protéine. Les contrôles négatifs ajoutés à cette matrice sont les interactions entre BD seul et chaque AD-P, ainsi que AD seul contre chaque BD-P, ce qui fait un total de 36 clones diploïdes. Nous disposons aussi de contrôles positifs, à savoir les interactions DivJ-DivK, PleC-DivK et PdhS-DivK, qui ont été mis en évidence par test double hybride par R. Hallez, V. Van Mullem et M. Wéry.

Chaque souche de levure haploïde Mav103 (Mat a) contenant les plasmides pVV212-*cds* (ce qui correspond à l'BD-Y), a été croisée avec les souches haploïdes Mav203 (Mat α) contenant les plasmides pVV213-*cds* (ce qui correspond au AD-X). Les 36 diploïdes résultants ont été sélectionnés sur un milieu dépourvu de leucine et de tryptophane.

Dans le cadre de ce test, nous avons utilisé deux gènes rapporteurs : *HIS3* et *lacZ*. La réplique des diploïdes se fait donc sur deux milieux différents.

- Pour le gène rapporteur *HIS3* permettant un test de croissance: milieu sans leucine, ni tryptophane, ni histidine et contenant du 3AT (100mM). *HIS3* code pour l'enzyme imidazole glycérol phosphate déshydrogénase. Celle-ci est impliquée dans la voie de biosynthèse de l'histidine dont l'expression permet la croissance de la levure en absence d'histidine. Néanmoins, il faut savoir qu'un niveau basal de transcription de *HIS3* permet aux levures de croître lentement en absence d'histidine. Ce bruit de fond étant gênant pour l'interprétation de nos résultats, nous avons utilisé le 3AT qui est un inhibiteur de l'enzyme *HIS3*. L'utilisation de cet agent permet l'auxotrophie complète pour l'histidine.
- Pour le gène rapporteur *lacZ* permettant un test de coloration : milieu de coloration sans leucine, ni tryptophane et une surcouche de X-Gal. Le gène *LacZ* codant pour une β -galactosidase, celle-ci va cliver le X-Gal et qui donnera un produit bleuté. Son activité peut donc être mise en évidence par un test blanc/bleu sur colonie.

3. Résultats

Parmi les 25 interactions testées, 8 interactions ont été détectées. Ces interactions sont reprises dans le tableau suivant.

Pour le gène rapporteur *HIS3* :

212-213	/	PleD	DivJΔN	PleCΔN	PdhSΔN	DivK
/	-	-	-	-	-	-
PleD	-	+	-	-	-	-
DivJΔN	-	-	-	-	-	+
PleCΔN	-	+	-	-	-	+
PdhsΔN	-	-	-	-	-	+
DivK	-	-	+	+	+	-

Pour le gène rapporteur *lacZ* :

212-213	/	PleD	DivJΔN	PleCΔN	PdhSΔN	DivK
/	-	-	-	-	-	-
PleD	-	+	-	-	-	-
DivJΔN	-	-	-	-	-	+
PleCΔN	-	+	-	-	-	+
PdhsΔN	-	-	-	-	-	+
DivK	-	-	+	-	-	-

Comme attendu, aucune interaction n'a été observée pour les contrôles négatifs, c'est-à-dire pour pVV212 vide contre chaque protéine et pVV213 vide contre chaque protéine. Cela nous indique que nos protéines ne sont pas capables de transactiver par elles seules le gène rapporteur, ni même de substituer la fonction du domaine activateur ou la fonction du domaine de liaison à l'ADN du transactivateur. Cette information nous indique que chaque interaction mise en évidence dans cette expérience de double hybride est spécifique. En outre, la détection d'interactions pour les contrôles positifs (DivJ-DivK, PleC-DivK et PdhS-DivK) valide la technique du double hybride dans notre cadre d'expérimentation.

Comme nous pouvons l'observer dans le tableau ci-dessus, PleD est non seulement capable de multimériser mais également d'interagir avec l'histidine kinase PleC, comme c'est le cas chez *C. crescentus* en l'absence de ses domaines transmembranaires.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

La première partie de ce mémoire a consisté en la caractérisation phénotypique d'un délétant *pleD*. Plusieurs observations intéressantes ont pu être dégagées.

Premièrement, en ce qui concerne la virulence. La souche de *Brucella melitensis* 16M délétante pour le gène *pleD* ne montrait pas d'atténuation de la virulence après une semaine d'infection en modèle murin, alors qu'après 4 semaines d'infection, on a pu observer plus d'un log d'atténuation en comparaison avec la souche sauvage, c'est-à-dire plus de dix fois moins de bactéries intraspléniques. Cette atténuation lors de l'infection en modèle murin suggère l'existence d'un lien entre le régulateur de réponse et la virulence de *Brucella*.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'atténuation de la virulence observée uniquement après 4 semaines d'infection. Si l'on garde à l'esprit le rôle de PleD chez *Caulobacter crescentus* et son importance cruciale pour l'éjection du flagelle, on peut penser que, chez *Brucella*, le régulateur de réponse PleD régule également le flagelle. Or, nous savons que les mutants flagellaires chez *B. melitensis* 16M sont atténués à 4 semaines post-infection et non à une semaine ^{Fretinet al., 2005}. Cette concordance de phénotypes nous permet d'émettre l'hypothèse que PleD pourrait réguler la présence ou l'absence du flagelle chez *B. melitensis* 16M. Si nous poursuivons notre hypothèse, dans l'organisme hôte la bactérie devrait faire face à une réponse immunitaire stimulée par non éjection de la structure flagellaire. On pourrait imaginer de tester cette hypothèse en évaluant l'intensité de la réponse immune à l'encontre de composants flagellaires, pour le mutant *pleD* et la souche sauvage, à 4 semaines post-infection en modèle murin.

D'autres investigations devront être réalisées au niveau de l'étude de la virulence du délétant *pleD*, notamment en modèle cellulaire.

Deuxièmement, concernant l'information morphologique. Les observations réalisées par technique du Western blot montrent un pic d'apparition de la protéine flagellaire FlgE (protéine du coude). On observe un signal à partir d'une DO⁶⁰⁰ de 0.07 et une disparition à 0.5 et ce quelque soit la souche étudiée. En effet, aucune différence entre la souche sauvage et la souche délétante pour *pleD* n'a été mise en évidence. Notons que les expériences réalisées précédemment au laboratoire avaient montré un profil de disparition de la protéine flagellaire au-delà d'une DO⁶⁰⁰ de 0.3. Chez *C. crescentus*, les mutants *pleD* sont hypermobiles par non éjection du flagelle, il n'y a pas de protéolyse de la protéine FliF. Dans la souche sauvage par contre, on observe des bactéries flagellées pour dans 1/3 de la population.

Les résultats de la microscopie électronique nous indiquent également qu'il n'y a pas de différences entre les souches sauvage et délétante *pleD*. Précédemment, on avait observé au laboratoire la présence d'un flagelle au début de la phase exponentielle de croissance. Lors de ce mémoire, nous avons observé une petite proportion de cellules flagellées (de l'ordre du %) et ce à tous les stades de croissance observés et dans les deux souches.

Comment s'expliquer cette absence de différences entre la souche sauvage et la souche délétante *pleD*? Quatre hypothèses nous éclairent à ce sujet.

- Premièrement, on observe chez *C. crescentus* la dégradation de la protéine flagellaire FliF, or ici nous suivons la protéine FlgE (disposant de l'anticorps anti-FlgE au laboratoire, c'est sur cette protéine flagellaire que nous nous sommes focalisés). Si l'on observe une disparition similaire de la protéine FlgE dans les souches sauvage et

délétante, rien ne nous dit qu'il en va de même pour la protéine FliF. La production d'anticorps anti-FliF et l'observation de son profil de disparition par technique de Western blot, nous permettraient peut-être d'observer une différence entre les deux souches. En résumé, il est possible que *pleD* réalise la même fonction chez *B. melitensis* 16M que chez *C. crescentus*, mais les expériences réalisées ici ne nous permettent pas de visualiser cette fonction.

- Deuxièmement, la structure flagellaire se trouve chez une petite proportion de bactéries. Il ne nous semble pas y avoir de différences entre les souches sauvage et délétante. Le problème est que chez *C. crescentus*, on passe de 33% de bactéries flagellées pour la souche sauvage à 100% de bactéries flagellées pour la souche *ΔpleD*. Il est donc difficile d'observer dans notre cas un triplement de la population de bactéries flagellées puisque celles-ci sont en faible proportion (pour rappel de l'ordre du %). Idéalement, il faudrait pouvoir réaliser un comptage afin de déterminer le pourcentage exact de bactéries flagellées dans les deux populations. Mais ceci est un travail laborieux compte tenu du fait qu'il faudrait compter plusieurs milliers de bactéries.
- La troisième hypothèse tient du fait que chez *C. crescentus*, tout le contrôle flagellaire est lié au cycle cellulaire, et non pas à la croissance. Dans notre cas, nous avons tenté d'observer une différence au niveau du contrôle flagellaire entre les deux souches au cours de la courbe de croissance. Il faudrait dorénavant synchroniser des souches sauvage et délétante, et observer à partir de celle-ci la présence du flagelle. En effet, il est possible que le flagelle ne soit produit que pendant une fenêtre très étroite du cycle cellulaire, ce qui expliquerait la très faible proportion de cellules flagellées lorsqu'on examine des cultures non-synchronisées.
- Enfin, la dernière hypothèse est que lors de ce mémoire, un choix s'est imposé à nous. En effet, il est important aussi de se rappeler que l'on a observé deux rôles biologiques différents pour PleD, un sur le contrôle flagellaire chez *C. crescentus* et un sur la synthèse de cellulose chez *R. leguminosarum*. Lors de ce mémoire, seules les investigations au niveau de la morphologie, donc au niveau du contrôle flagellaire ont été réalisées. Des études phénotypiques sur la synthèse de cellulose et sur la formation de biofilms devront être réalisées à l'aide du délétant *pleD*.

La deuxième partie de ce mémoire a consisté en la construction de vecteurs d'expression contenant une copie de l'allèle sauvage du gène *pleD*. Faute de temps, seules ces constructions ont été réalisées. Les plasmides pMR10-*cat-pleD* et pBBR1-*cat-pleD* vont nous permettre de compléter les souches délétante *pleD* chez *B. melitensis* 16M et *C. crescentus*. Les plasmides pMR10-*cat-pleD-cfp*, pMR10-*cat-pleD-yfp*, pKSoriT-*pleD-cfp* et pKSoriT-*pleD-yfp*, vont nous permettre de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine PleD.

Cette expérience nous permettra de savoir si le gène *pleD* chez *B. melitensis* 16M a conservé la capacité de contrôler la mobilité (ceci sera réalisé en collaboration avec le laboratoire du Professeur Urs Jenal, Université de Basel, Suisse).

Enfin, dans la troisième partie de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux interactions protéiques entre les différents acteurs du réseau de régulation de PleD. Les informations suivantes ont pu être tirées. Tout d'abord, PleD a la capacité de multimériser mais aussi d'interagir avec PleC. L'absence des domaines transmembranaires de PleC n'empêchent pas l'interaction entre PleD et PleC, comme cela a été décrit ^{Ohta and Newton, 2003}, les domaines senseurs ne sont pas requis pour l'interaction avec le régulateur de réponse associé.

Il est intéressant de terminer sur le rôle global des domaines GGDEF. Chez *R. leguminosarum*, CelR2 qui est un orthologue de PleD, qui a un rôle dans la synthèse de cellulose et par conséquent dans la formation de biofilms. Or chez *C. crescentus*, le stalk se termine par un holdfast qui est constitué d'exopolysaccharides (de nature non cellulosique) tout comme la cellulose mais qui joue également un rôle dans l'adhésion et la formation de biofilm. Les domaines GGDEF exerceraient donc un rôle global dans la formation de biofilms ou encore dans l'interaction bactérie/cellule hôte. Ce rôle pourrait être conservé pour *Brucella spp.*

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Souches et plasmides

a. Souches bactériennes

- *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen)
F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*ΔM15 D*lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* D (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* l- *rpsL* *nupG*.
Cette souche est utilisée pour l'amplification d'un plasmide ou d'un produit de ligation. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne.
- *Escherichia coli* S17-1λ*pir* (Miller, 1988)
recA *thi pro* *hsdR*⁻ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenized with λ*pir* phage.
Cette souche possède le plasmide RP4 intégré dans son génome qui lui permet de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert. De plus, elle est résistante à la streptomycine et au triméthoprim.
- *Brucella melitensis* 16M biovar 1 (MacMillan)
Cette souche a été prélevée sur le terrain en 1955. Des mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique ont été sélectionnés en laboratoire.
- *Brucella abortus* 544
Des mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique ont été sélectionnés en laboratoire.

b. Souches de levures

- *Saccharomyces cerevisiae* MAV 103 (Walhout, 2001)
(Mata) : LEU2-3, 112 TRP-901 HIS3Δ200 *ade2-1gal4Δ gal80ΔSPAL10* ::URA3 GAL1 ::*lacZGAL1* ::HIS3-@LYS2 *can1*^R*cyh*^R
Cette souche de levure est utilisée notamment dans le cadre de la technique du double hybride.
- *Saccharomyces cerevisiae* MAV 203 (Walhout, 2001)
(Mata) : LEU2-3, 112 TRP-901 HIS3Δ200 *ade2-1gal4Δ gal80ΔSPAL10* ::URA3 GAL1 ::*lacZGAL1* ::HIS3-@LYS2 *can1*^R*cyh*^R
Cette souche de levure est utilisée notamment dans le cadre de la technique du double hybride.

c. Plasmides

- pSKoriT

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK (Stratagene) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène *bla* (résistance à l'ampicilline) et une origine de répllication ColE1 (origine non fonctionnelle chez *Brucella*; c'est donc un plasmide non répliatif chez cette bactérie).

- pSKoriT-*cat*

Mêmes remarques que concernant le pSKoriT à ceci près que le gène *bla* est disrupté par le gène *cat* (résistance au chloramphénicol).

- **pKSoriT**
Mêmes remarques que concernant le pSKoriT à ceci près qu'il dérive du pBluescript KS.
- **pMR10-*cat***
Le pMR10-*cat* est un plasmide répliquatif chez *Brucella spp.* à faible nombre de copies (origine RK2oriV), possédant un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol.
- **pUC4K** ^{Okaet al., 1981;Vieira and Messing, 1982}
Ce plasmide fourni par la firme Amersham biosciences encode le gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*) pourvu de son promoteur, disruptant le gène *lacZ'*. Il contient aussi le gène *bla* et une origine de répllication dérivée du pBR322.
- **pMR10-gateway**
Ce plasmide est dérivé du pMR10-*cat*, auquel ont été rajoutés, à proximité du promoteur *Plac*, des sites *attR1* et *attR2* compatibles gateway (GWTM) de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, toxique pour certaines souches de *E. coli*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol (Régis Hallez, thèse en cours). Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur donneur via une réaction LR. *In fine*, nous obtiendrons une fusion transcriptionnelle entre le *Plac* et la séquence codante insérée.
- **pBBR1-gateway**
Dérivé du pBBR1 MCS-1 ^{Kovachet al., 1995}, ce plasmide a été rendu compatible au système gateway à la manière du pMR10-gateway (Régis Hallez, thèse en cours) et possède une origine de répllication REP.
- **pDONR201** (Invitrogen)
Vecteur conçu pour le clonage en système GWTM de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *attP1* et *attP2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de répllication (pUC ori) chez *E. coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt muni de sites *attB1* et *attB2*, résultant en un vecteur d'entrée.
- **pVV212** ^{Van Mullemet al., 2003}
Vecteur dérivé du pGBT9 ^(Bartel et al., 1993) dans lequel a été insérée une cassette de clonage GWTM (Invitrogen).
- **pVV213** ^{Van Mullemet al., 2003}
Vecteur dérivé du pACTII ^(Fromont et al., 1997) dans lequel a été insérée une cassette de clonage GWTM (Invitrogen).

2. Milieux de culture

Après leur préparation, tous les milieux de culture sont à autoclaver (120°C pendant 20 min).

a. Milieux de culture bactériens

- *Milieu Luria Bertani (LB) : Milieu riche pour E. coli*

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

- *Milieu 2 YT : Milieu riche pour Brucella spp*

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	1 g

b. Milieux de culture levuriens

- *Milieu YPD*

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Glucose	20 g	20 g
Bacto peptone 2%	50 g	50 g
Yeast extract 1%	25 g	25 g
Agar	-	20 g

- *Milieu minimum*

Milieu SD concentré 100X :

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Glucose	20 g	20 g
Yeast Nitrogen Base w/o amino acid	6.75 g	6.75 g
Agar	-	20 g

- *Milieu synthétique*

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant dans le milieu minimum les acides aminés et bases azotées à raison de 1 ml de solution stock pour 100 ml de milieu.

Acides aminés et bases azotées concentrées 100X :

Adénine sulfate	2 g/l
Uracile	2 g/l
L-Tryptophane	2 g/l
L-Lysine-HCl	2 g/l

L-Histidine-HCl	3 g/l
L-Leucine	3 g/l

3. Tampons et Solutions

- **Tampon PBS 20X**

Na ₂ HPO ₄	22.98 g/l
KCl	4 g/l
NaCl	160 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l
- **Tampon TEna**

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	50 mM
NaCl	0.1 M
- **Tampon TE**

Tris HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM
- **Tampon TAE 50x**

Tris-HCl pH 8,0	40mM
EDTA	50mM
Acide acétique glacial	57.1 ml

Porter à un volume de 1000 ml avec de l'eau distillée
- **PBS Triton-X 100 (500ml)**

PBS 10 X	50 ml
Triton-X 100	0.5 g
Eau distillée	450 ml
- **PFA 4% (conservation à -20°C)**

Paraformaldéhyde	8 g
PBS 1X	200 ml
- **Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10X**

Li Ac	10.2 g
-------	--------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée et autoclaver
- **Polyacrylamide 30% (100ml)**

Acrylamide 29.2%	29.2 ml
Bisacrylamide 0.8	0.8 ml
H ₂ O	70 ml
- **Poly éthylène glycol (PEG) 50%**

PEG 4000	50 g
----------	------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser au moyen d'un filtre de 0.45 µm (Millipore).
- **LiAc/TE 1X**

LiAc 10X	1/10 ^{ème} de volume
TE 10X	1/10 ^{ème} de volume
H ₂ O	8/10 ^{ème} de volume
- **Mélange LiAc/TE/PEG 400**

LiAc 10X	1/10 ^{ème} de volume
TE 10X	1/10 ^{ème} de volume
PEG 50%	8/10 ^{ème} de volume
- **Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M**

Porter 42.04 g de 3 AT à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser au moyen d'un filtre de 0.22 µm (Millipore). Conserver à 4°C.

- **Solution d'alourdisseur**

glycérol	50%
EDTA	100mM
SDS	1%
Bleu de bromophénol ou méthyl orange	
- **Solution de dénaturation (Southern blot)**

NaCl	1 M
NaOH	0.5 M
- **SSC 20X**

NaCl	3 M
Citrate de sodium	0.3 M
- **Solution de neutralisation (Southern blot)**

NaCl	1.5 M
Tris-HCl pH 7.2	0.5 M
EDTA	1 mM
- **Solution de préhybridation (Southern blot)**

Denhardt 50X	5 ml
SSC 20X	12.5 ml
SDS 10%	0.5 ml
ADN de thymus de veau 100 µg/ml	3.3 ml
H ₂ O	28.7 ml
- **Solution de blocking (Western blot) pour 1l**

PBS stock 20X	50 ml
Lait en poudre	50 g
Tween	500 µl
H ₂ O	950 ml
- **PBS-Tween 0,05% (Western blot) pour 1l**

PBS stock 20X	50 ml
H ₂ O	950 ml
Tween	500 µl
- **Tampon de chargement protéique 5X (Western blot) (28 ml)**

Glycérol 50%	10 ml
β-mercapto-éthanol 5%	5 ml
SDS 10%	2 g
Tris 1,5M pH6,8	13 ml
Bleu de bromophénol 0,005%	0,0005 g
- **Tampon de transfert (Western blot): Towbin buffer**

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

On porte à 1l avec de l'eau distillée.
- **Tampon SDS PAGE (Western blot)**

Tris base	30,35 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

On porte à 11 avec de l'eau distillée.

- **Antibiotiques, X-GAL et IPTG**

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H ₂ O	50 mg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	Ethanol 70%	100 mM
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside	X-gal	Diméthylformamide	2 mg/ml

Stérilisation au moyen d'un filtre de 0.22 μm (Millipore) avant d'aliqoter. Dilution 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

II. Méthodes

1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

a. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Les séquences bordant le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers). La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools ou l'Expand High Fidelity de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. La *Taq* polymérase, vu le taux relativement élevé de mutations introduites, est utilisée dans les cas de PCR diagnostiques alors que la High Fidelity est utilisée dans les cas de clonage. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

Réactifs	Quantité
Tampon 10X correspondant à l'enzyme	5 μl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	4 μl
Primer sens (20 μM)	1 μl
Primer antisens (20 μM)	1 μl
Taq polymérase ou High Fidelity	0,5 μl
Template	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 μl

Lors d'une PCR dont les amorces sont bordées de site de recombinaison gateway GWTM (*attB1* ou *attB2*), la concentration des primers utilisés n'est plus de 20 mais de 100 µM.

Programme :

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C.
- 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :
 - a. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles GWTM) à 94°C pour dénaturer.
 - b. 30 secondes (même remarque que pour le point a) à X°C pour hybrider où X = T_m-10°C
 - c. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kpb) du fragment à amplifier.
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

La température de melting (T_m) des amorces de moins de 20 pb égale le quadruple de la somme des bases G et C additionné du double de la somme des bases A et T. En bref, la T_m = 4(G+C) + 2(A+T). Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence exotique en 5'.

Remarquons que l'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

b. Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Comme marqueur de tailles, nous utilisons l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

Fabrication du gel

- Dissoudre par chauffage Y g d'agarose dans Z ml de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose, généralement celui-ci est de 1%.
- Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (2mg/ml H₂O).
- Une fois que la température du flacon permet de le tenir en main (~60°C), couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
- Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur, sans oublier de charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 µl/puits).

c. Restriction sur plasmide

- 1 µl Buffer 10X (3 µl pour le Southern blot) en fonction de l'enzyme (A, B, L, M ou H).
- 1 µl d'enzyme de Restriction (enzyme concentrée 5X pour un Southern blot).
- X µl de plasmide,

- Porter à un volume final de 10 µl (30 µl pour un Southern blot) avec de l'eau distillée.

Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C. Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche.

Enzyme	Site	Tampon	Enzyme	Site	Tampon
<i>Asp</i> 718	G/GTACC	B	<i>Nco</i> I	C/CATGG	H
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	A, B ou M	<i>Pvu</i> II	CAG/CTG	L
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	A, B, M ou H	<i>Sac</i> I	GAGCT/C	A
<i>Eco</i> R I	G/AATTC	A, B ou H	<i>Sma</i> I	CCC/GGG	A
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	B	<i>Ssp</i> I	AAT/ATT	H
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	B ou M	<i>Xba</i> I	T/CTAGA	A ou H
<i>Hpa</i> I	GTT/AAC	A	<i>Xho</i> I	C/TCGAG	H

d. Ligation d'un plasmide

Réaction réalisée pendant 2 heures à température ambiante (sur la paillasse), le volume final n'étant jamais supérieur à 20 µl. Le mélange de réaction contient :

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un non directionnel.
- 4 µl de Tampon 5X T4 DNA Ligase.
- 1 µl de T4 DNA Ligase.
- Porter à volume final (20 µl) avec de l'eau.

e. Purification sur colonne

Suivre le protocole du High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche. Ce protocole est prévu pour purifier des fragments d'ADN simple ou double brin de réactions PCR ou d'autres réactions enzymatiques.

f. Minipréparation de plasmide

Lancer une culture de 5 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s). Suivre les instructions du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel). Ce protocole est employé pour purifier environ 20 µg d'ADN plasmidique.

g. Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube de 100 µl :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles de primer.
- Ajouter 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- Ajouter 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl₂.

- Amener le volume final à 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles

1. Dénaturation de 1 minute à 96°C.
2. 25 cycles de :
 - a. 10 secondes à 96°C.
 - b. 10 secondes à 50°C.
 - c. 4 minutes à 60°C.
3. Maintenir à 4°C ou stocker à -20°C.

h. Clonage Gateway™

Le système gateway (GW™) est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*E. coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage λ et dans le génome bactérien. Cette réaction génère un génome phagien intégré compris entre les sites *attR* et *attL* néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément appelée BP clonase. Cette intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites *attR* et *attL*. Cette réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément appelée LR clonase. Ce système a été adapté de sorte à permettre des clonages faciles en laboratoire. La perte d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* lors des recombinaisons est un moyen de sélection des clones recombinants.

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR201 restreint NcoI	3 µl de vecteur d'entrée
3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt	3 µl de vecteur de destination
2 µl de tampon de dilution BP	2 µl de tampon de dilution LR
2 µl d'enzyme clonase BP	2 µl d'enzyme clonase LR
2 µl d'H2O distillée	
Placer à 25°C de 2 à 24h, puis stopper la réaction en incubant 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K	Placer à 25°C de 2 à 24h.

i. Extraction d'ADN génomique

- En utilisant une anse, prélever des bactéries sur milieu solide et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en chloroforme, et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4 °C à 13500 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% conservé à -20°C.
- Mélanger en inversant l'eppendorf.

- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% conservé à -20°C.
- Centrifuger 10 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et resuspendre dans 100 µl d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incuber l'appendice à 37°C.

j. Southern blot

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

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon la taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxyde de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon grâce à un transfert effectué par capillarité. On obtient donc une réplique en miroir du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane de nylon par exposition aux UV. L'hybridation de la sonde d'acide nucléique radiomarquée à l'ADN dénaturé et restreint fixé sur la membrane de nylon (Marcheney-Nagel) s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane. La sonde hybridée au fragment d'ADN est décelée par autoradiographie de la membrane. La position à laquelle s'est effectuée l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de tailles.

Restriction de l'ADN génomique

- Prendre X µl d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée.
- Ajouter 1.5 µl d'enzyme concentré (*Hind* III, *Eco*R I ou *Ssp* I).
- Ajouter 3 µl de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme.
- Mettre à un volume de 30 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber une nuit à 37 °C.

Électrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint est réalisée dans un gel d'agarose de 1%. Le marqueur de tailles HyperLadder (Bioline) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction.

Transfert sur membrane et immobilisation

- Après l'électrophorèse, exposer le gel d'agarose aux UV (302 nm) afin de le photographier et d'obtenir une référence (latte).
- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Découper un morceau de membrane de nylon chargée positivement de taille un peu supérieure à celle du gel.
- Par un montage de transfert, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 20X overnight.
- Incuber la membrane à 80 °C pendant 120 min.
- Immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 30 secondes.
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman.

Préhybridation

La membrane est immergée dans une solution de préhybridation pendant 30 minutes à 65°C. Ceci permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non-spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau. L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 min et incubé sur glace.

Marquage de la sonde et hybridation

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence de primers aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont le dCTP est marqué radioactivement par son $\alpha^{32}\text{P}$.

- Porter environ 25 ng d'ADN sonde à un volume finale de 10 μl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 5 min., faire un quick spin et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 1 μl de dATP, dGTP, dTTP et 20 μl de random primers (solution 2.5x).
- Ajouter 5 μl de dCTP marqué au ^{32}P et ajouter 11 μl d' H_2O , mélanger.
- Ajouter 1 μl de Klenow et faire un quick spin.
- Incuber 10 min. à 37°C.

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

Détection

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

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette avec un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 30 à 60 secondes. Quand les bandes sont révélées, le film est trempé dans une solution de fixation, puis rincé dans de l'eau.

2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

a. Transformation bactérienne par choc thermique

La transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

- Placer 100 μl de bactéries CaCl_2 compétentes dans un eppendorf sur glace.
- Une fois les bactéries décongelées, ajouter de 1 à 8 μl du plasmide.
- Laisser sur glace pendant 45 minutes.
- Choc thermique pendant 2 minutes dans un bain-marie à 37°C.
- Ajouter 1 ml de milieu LB liquide.
- Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C.
- Etaler 100 μl sur un milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°C.
- Centrifuger le reste pendant 5 minutes à 5000 rpm puis resuspendre le culot dans environ 150 μl .
- Etaler le tout sur milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°C.

b. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert vers une bactérie receveuse. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif. Les bactéries donneuses sont en l'occurrence des *E. coli* S17-1.

- Préparer deux précultures : ensemencer, d'une part, 10 ml de LB liquide plus antibiotique(s) approprié(s) avec des *E. coli* S17-1 donneuses transformées avec le plasmide d'intérêt. D'autre part, ensemencer 10 ml de 2YT liquide d'une colonie de *Brucella* receveuse (Nal^R).
- Incuber les deux précultures durant une nuit à 37°C sous agitation.
- Le jour de la conjugaison, prélever 1 ml de la préculture d'*E. coli* S17-1 et ensemencer 9 ml de LB liquide de manière à ce que les bactéries se trouvent en phase exponentielle de croissance 4 à 5 heures plus tard.
- Avant la conjugaison, centrifuger la culture de *E. coli* S17-1 pendant 5 minutes à 5000 rpm afin de culotter les cellules. Eliminer le surnageant et effectuer deux lavages dans du LB liquide pour éliminer les antibiotiques.
- Resuspendre dans un volume final de 1 ml de 2YT.
- Les cultures de *Brucella* sont centrifugées 5 minutes à 5000 rpm. Le culot est resuspendu dans 500 µl de 2YT.
- Placer un filtre stérile 0,22 µm sur une boîte de Pétri contenant du 2YT solide, y déposer 80 µl de culture de *Brucella* et 80 µl d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- Transférer le filtre dans une petite boîte de pétri vide et gratter les bactéries sur le filtre dans 1 ml de 2YT et transvaser par la suite dans un eppendorf.
- Centrifuger l'eppendorf 5 minutes à 5000 rpm, vider le surnageant et resuspendre dans 300 µl de 2YT.
- Etaler les 300 µl sur trois boîtes de Pétri contenant du 2YT additionné d'agents sélectifs (100 µl/milieu). Effectuer des dilutions avant l'étalement si le plasmide à conjuguer est répliatif.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

Contrôle négatif :

Les bactéries donneuses *E. coli* S17-1 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17-1 donneuses.

c. Coloration de Gram

Cette technique se base sur la distinction entre les bactéries pourvues d'une paroi muréique importante et d'une simple membrane plasmique et celles pourvues de deux membranes circonscrivant une mince paroi muréique. Le procédé est basé sur la capacité d'une bactérie à retenir le bleu de gentiane après sa précipitation, cas des bactéries à paroi épaisse. La safranine, quant à elle, n'est employée que pour visualiser en rouge les bactéries réfractaires au bleu de gentiane. Dès lors, une bactérie rouge est dite à Gram négatif, une bactérie bleue à Gram positif.

- Sur une lame de verre, mettre une goutte d'eau.

- Toucher une colonie avec un cure-dents stérile et la déposer sur l'eau.
- Sécher à la flamme.
- Fixer les bactéries en ajoutant de l'alcool (Vel, Leuven, Belgium) et passer à la flamme.
- Ajouter le bleu de gentiane (Merck, Darmstadt, Germany) sur la lame et attendre 1 minute.
- Ajouter le lugol (Merck, Darmstadt, Germany) pour précipiter le bleu de gentiane et attendre 1 minute.
- Rincer à l'alcool.
- Rincer à l'eau.
- Ajouter la safranine (Merck, Darmstadt, Germany) et attendre 1 minute.
- Sécher la lame en tapotant avec un papier absorbant.

d. Infection en souris BALB/c

Au jour J-1, lancement d'une culture liquide de 5 ml de 2YT, additionnée d'antibiotiques, des souches infectantes à tester.

Le jour J :

- Centrifuger les cultures à 3000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans du PBS 1X (même volume que la culture de départ, 5 ml).
- Mettre dans une cuve à spectrophotomètre 500 µl de PBS et 500 µl de culture.
- Prendre la DO à 600 nm (étalonner avec 1 ml de PBS).
- Calculer la dose infectante (obtenir une concentration de 4.10^5 bactéries/ml) sachant qu'une DO de 1 correspond à une concentration de 3.10^9 bactéries/ml.
- Remplir des seringues de 1 ml avec les cultures diluées (injection de 0.1 ml par souris).
- Nettoyer l'extrémité de la seringue à l'alcool.
- Prendre la souris par la queue et la mettre en extension sur le couvercle de la cage.
- Agripper la souris par la peau du cou entre le pouce et l'index.
- Retourner la souris et coincer sa queue entre la paume de la main et l'auriculaire.
- Incliner la souris vers le bas pour faire descendre ses viscères, puis introduire la seringue perpendiculairement (afin de réaliser une injection intrapéritonéale et non sous cutanée), et de façon à voir les graduations.
- Injecter 0.1 ml de culture à chaque souris.

e. Prélèvement de la rate des souris BALB/c

Au jour J+1 (ou +4) semaines d'infection,

- Tuer les souris par dislocation cervicale (déposer celles-ci sur la cage, bloquer la tête et tirer sur la queue).
- Asperger les souris d'éthanol afin d'éliminer les parasites présents sur la fourrure.
- Amener les souris mortes sous la hotte et les déposer sur leur flan droit (la rate se trouvant à gauche).
- Effectuer une incision dans la peau au niveau de l'abdomen puis déshabiller la souris.
- Inciser le péritoine, prendre la rate à l'aide d'une pince puis couper le tissu conjonctif retenant la rate.
- Placer la rate dans un sac plastique préalablement taré, et fermer celui-ci.

- Ecraser la rate à l'aide d'un marqueur (il reste une membrane qui ne se désintègre pas).
- Ajouter 2 ml de PBS-triton 0.1% dans le sac et homogénéiser.
- D'un côté, transférer 200µl (à l'aide d'un tips à filtre) dans une plaque 96 puits.
- Diluer de 10 en 10, en mettant 20µl de la dilution précédente dans 180µl de PBS 1X.
- De l'autre, étaler 1,8ml à raison de 300µl par boîte de 2YT carrées.

3. Techniques relatives à l'utilisation de levures

a. Test d'interaction protéique en double hybride

Le but de cette manipulation est expliqué dans le chapitre « Résultats et discussions » à la page 37.

La réalisation d'un test double hybride nécessite la construction d'un plasmide « appât » encodant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (BD) et l'ORF d'intérêt Y, ainsi que la construction d'un plasmide « proie » encodant le domaine d'activation de Gal4 (AD) fusionnée elle-même à l'ORF d'intérêt X. Ces plasmides sont transformés dans deux souches de levures haploïdes de type conjugatif différent possédant un ou plusieurs gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur cible du BD. Ces deux plasmides doivent être porteurs de marqueurs d'auxotrophie différents pour permettre la sélection des transformants sur un milieu sélectif. La réplique velours permet alors le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs d'intérêt. La présence des deux plasmides dans une seule souche est sélectionnée chez une levure, grâce à sa capacité à croître sur un milieu nécessitant l'expression des marqueurs d'auxotrophie des deux plasmides.

En pratique, l'interaction entre les fusions BD-Y et AD-X est mise en évidence par l'expression de deux gènes rapporteurs (*HIS3* et *lacZ*). Une interaction est donc visualisée par la capacité de la souche à pousser sur un milieu sans histidine, ou à produire une réponse positive dans un test de coloration β-Gal.

b. Transformation par choc thermique

- Incuber 50 ml de YPD avec une colonie isolée (*MAV103* ou *MAV203*) obtenue sur un milieu solide.
- Incuber une nuit à 30°C sous agitation.
- Diluer la préculture dans 200 ml de YPD pour obtenir une DO comprise entre 0.2-0.3.
- Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à d'atteindre une DO comprise entre 0.7 et 0.8.
- Effectuer 2 lavages avec 1/10^e de volume de culture (20 ml) d'eau.
- Effectuer un lavage avec 1/10^e de volume (20 ml) de TE/LiAc.
- Resuspendre le culot dans du TE/LiAc pour concentrer les cellules 100X (2 ml).

Remarque : toutes les centrifugations pour les lavages durent 3 minutes à une vitesse de 6000 rpm et à une température ambiante.

Pour chaque transformation, dans un tube Eppendorf stérile, déposer :

- 1 µg d'ADN (5-10µl).
- 25 µg de « DNA carrier » dénaturé préalablement dans de l'eau à 100°C pendant 5 minutes.
- 50 µl de cellules.
- 300 µl du mélange PEG/TE/LiAc préparé extratemporanément.
- Vortexer et incuber 30 à 40 minutes à 30°C, puis 20 minutes à 42°C en agitant toutes les demi-heures.

- Centrifuger 1 minute à 10 000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile.
- Etaler sur milieu sélectif et incuber à 30°C pendant environ 3 jours.
- Mettre au frigo afin d'intensifier la coloration.

c. Technique de la réplique velours

Cette technique de dépôt de cellules sur boîtes de Pétri permet de répliquer un nombre important de colonies. Le milieu solide (en boîte de Pétri) portant des colonies est amené au contact d'un velours stérile de sorte que des cellules de chaque colonie s'y déposent. Un contact entre ce velours et un autre milieu solide coulé en boîte de Pétri entraîne le dépôt de cellules sur le milieu. La disposition des colonies reste identique sur les deux boîtes de Pétri.

d. Coloration X-GAL en surcouche

Le but de cette manipulation est expliqué dans le chapitre « Résultats et discussions » à la page 37.

- Préchauffer un bain-marie à 50°C.
- Préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau stérile et porter à ébullition, puis refroidir à 50°C.
- Préchauffer à 50°C dans le bain-marie 5 ml de tampon K-PO₄ pH 7.0 1M.
- Mélanger la solution d'agarose et le tampon K-PO₄, et conserver à 50°C.
- Ajouter 0.1 ml de SDS 10%.
- Ajouter 0.5 ml de NN'diméthylformamide (DMF).
- Ajouter 0.2 ml de X-Gal 2 % dans du DMF.
- Mélanger et couler une surcouche de 10 ml sur la boîte à colorer.
- Attendre la solidification puis incuber une nuit à 30°C.

4. Techniques relatives à l'utilisation de protéines : Western blot

a. Préparation des échantillons

Après avoir pris la DO₆₀₀ des échantillons, on centrifuge ceux-ci. On ajoute au culot un volume de PBS 1X afin que ceux-ci soient ajustés à une DO₆₀₀ de 6. 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 avec le SDS.

b. Electrophorèse en gel de 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 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 (tétraméthyl diamide). 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 qui vont alors migrer dans le gel indépendamment de leur conformation 3D native.

Le SDS est un détergent anionique qui 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.

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 de Running Gel à 12% de polyacrylamide :

Pour 15 ml : 5,3 ml d'eau
5 ml de polyacrylamide 30%
3,8 ml de Tris 1,5M (pH8,8)
0,15 ml de SDS 10%
0,15 ml d'APS 10%
6 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 5 ml : 3,4 ml d'eau
0,83 ml d'acrylamide
0,63 ml de Tris 0,5 M pH6,8
0,05 ml de SDS 10%
0,05 ml d'APS 10%
0.04 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.

c. Transfert 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 par le SDS d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose formant ainsi une réplique en miroir du gel.

- 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.

d. Immunodétection ou western blot proprement dit

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.

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 2 heures 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.

Enlever la solution de blocking, rincer 5X 3min avec du PBS-Tween 0,05%.

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.

Récupérer les anticorps et faire 5 lavages de 3 minutes avec du PBS-Tween 0,05%.

Mise en présence de l'anticorps secondaire

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine Fc de l'anticorps primaire. Il 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.

- 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.

e. Révélation

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

On place la membrane dans un film plastique dans une cassette de révélation et on la recouvre du mélange des solutions S1 (1ml) et S2 (1ml) ; on laisse incubé

pendant 1 minute. On expose à un film autoradiographique pendant différentes durées en fonction de l'intensité du signal (30 secondes à 10 minutes). Il faut savoir qu'une fois les solutions S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu 5 minutes après le mélange et que celle-ci décroît en fonction du temps.

On révèle alors le film dans un bain de révélateur, on passe ensuite dans un bain de fixateur et finalement on rince dans un bain d'eau.

5. Techniques relatives à l'utilisation de la microscopie

a. Préparations des échantillons

Une culture de *B. melitensis* 16M est au préalable inoculée à une DO à 600 nm initiale de 0,05 nm à partir d'une préculture fraîche, dans un milieu 2YT ou dans un milieu appauvri contenant de l'acide nalidixique, et placée à 37°C sous agitation. Des échantillons sont prélevés aux temps de culture souhaités.

- Prélever 50ml d'échantillon.
- Centrifuger à 1000 rpm 20 min.
- Eliminer le surnageant et resuspendre très délicatement dans 10 ml de PBS 1x stérile.
- Centrifuger à 1000 rpm 20 min.
- Eliminer le surnageant, resuspendre dans 50 µl de PFA 4% et incuber 20 min à température ambiante.
- Conserver à 4°C.

b. Coloration des échantillons

- Activation des grilles sous UV pendant 3 min.
- Déposer les 3 grilles de Formvar-carbone sur une goutte (40µl) d'échantillon, laisser agir 10 min.
- Laver les grilles par passages successifs sur 5 gouttes d'H₂O bidistillée.
- Tremper 10 sec sur une goutte d'acétate d'uranyle.
- Poser la grille sur du papier buvard pour la sécher.
- Ranger la grille sur la tranche (côté blanc vers la droite).
- Laver le support à l'alcool.

BIBLIOGRAPHIE

- Aldridge, P. & Jenal, U. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* **32**, 379-391 (1999).
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. & Jenal, U. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**, 1695-1708 (2003).
- Alex, L. A. & Simon, M. I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* **10**, 133-138 (1994).
- Ausmees, N. & Jacobs-Wagner, C. Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-247 (2003).
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. & Lindberg, M. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* **145** (Pt 5), 1253-1262 (1999).
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. & Lindberg, M. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 163-167 (2001).
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. & Schirmer, T. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17084-17089 (2004).
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B. & Pesci, E. C. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**, 6481-6489 (2002).
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mujer, C. V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* **90**, 587-592 (2002).
- England, J. C. & Gober, J. W. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 674-680 (2001).
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. & Letesson, J. J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-698 (2005).
- Gorvel, J. P. & Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-297 (2002).
- Gronewold, T. M. & Kaiser, D. The act operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **40**, 744-756 (2001).
- Grunenfelder, B., Gehrig, S. & Jenal, U. Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. *J Bacteriol* **185**, 1624-1633 (2003).

- Grunenfelder, B., Tawfilis, S., Gehrig, S., M, O. S., Eglin, D. & Jenal, U. Identification of the protease and the turnover signal responsible for cell cycle-dependent degradation of the *Caulobacter* FliF motor protein. *J Bacteriol* **186**, 4960-4971 (2004).
- Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., Kapur, V., Alt, D. P. & Olsen, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* **187**, 2715-2726 (2005).
- Hecht, G. B. & Newton, A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **177**, 6223-6229 (1995).
- 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**, 111-120 (1999).
- Jacobs-Wagner, C. Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol Microbiol* **51**, 7-13 (2004).
- Jenal, U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol* **7**, 185-191 (2004).
- Jenal, U. & Fuchs, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J* **17**, 5658-5669 (1998).
- 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**, 167-176 (2002).
- Jones, B. D., Lee, C. A. & Falkow, S. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* **60**, 2475-2480 (1992).
- Kimura, S., Chen, H. P., Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr. & Itoh, T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* **183**, 5668-5674 (2001).
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176 (1995).
- Matthysse, A. G., White, S. & Lightfoot, R. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **177**, 1069-1075 (1995).
- Michaux-Charachon, S., Foulongne, V., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. [*Brucella* at the dawn of the third milenium: genomic organization and pathogenesis]. *Pathol Biol (Paris)* **50**, 401-412 (2002).
- Moreno, E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-275 (1998).

- Ohta, N. & Newton, A. The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* **185**, 4424-4431 (2003).
- Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami, M. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* **147**, 217-226 (1981).
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**, 715-727 (2004).
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L. M., Beanan, M. J., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Nelson, W. C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S. E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S. R., White, O., Salzberg, S. L., Hoover, D. L., Lindler, L. E., Halling, S. M., Boyle, S. M. & Fraser, C. M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13148-13153 (2002).
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L. & Gorvel, J. P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* **66**, 2387-2392 (1998).
- Romling, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**, 205-212 (2002).
- Romling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. & Reinkoster, J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**, 10-23 (2000).
- Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**, 35-58 (1991).
- Sciochetti, S. A., Lane, T., Ohta, N. & Newton, A. in *J Bacteriol* 6037-6049 (2002).
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-337 (2004).
- Sommer, J. M. & Newton, A. Turning off flagellum rotation requires the pleiotropic gene pleD: pleA, pleC, and pleD define two morphogenic pathways in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **171**, 392-401 (1989).
- Sommer, J. M. & Newton, A. Pseudoreversion analysis indicates a direct role of cell division genes in polar morphogenesis and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Genetics* **129**, 623-630 (1991).
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P. & Benziman, M. Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* **180**, 4416-4425 (1998).

- Tominaga, A., Mahmoud, M. A., Mukaihara, T. & Enomoto, M. Molecular characterization of intact, but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Mol Microbiol* **12**, 277-285 (1994).
- Uhl, M. A. & Miller, J. F. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**, 33176-33180 (1996a).
- Uhl, M. A. & Miller, J. F. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *Embo J* **15**, 1028-1036 (1996b).
- Umelo, E. & Trust, T. J. Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *J Bacteriol* **179**, 5292-5299 (1997).
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhoute, J. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**, 739-746 (2003).
- Vieira, J. & Messing, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268 (1982).
- West, A. H. & Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376 (2001).
- Wheeler, R. T. & Shapiro, L. Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 683-694 (1999).
- Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoon, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D. H., Meade, J. H., Emerick, A. W. & et al. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8130-8134 (1990).
- 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**, 13068-13073 (1999).
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Romling, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**, 1452-1463 (2001).