



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'expression des gènes du locus OMP2 chez *Brucella melitensis* 16M

Deschamps, Chantal

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES DU LOCUS *OMP2* CHEZ
BRUCELLA MELITENSIS 16M**

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

Chantal Deschamps

Juin 2000

Etude de l'expression des gènes du locus *omp2* chez *Brucella melitensis* 16M

Deschamps Chantal

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude de la régulation de l'expression de deux gènes, *omp2a* et *omp2b* du locus *omp2* chez *B. melitensis* 16M. Ces deux gènes encodent les porines Omp2a et Omp2b dont l'activité pore-formatrice est différente. L'organisation du locus *omp2* est très conservée chez les différentes espèces de *Brucella*. Les deux gènes sont orientés de manière opposée et séparés par une région d'environ 830bp contenant un promoteur actif, le promoteur du gène *omp2b*. L'Omp2b est exprimée chez *Brucella* tandis que la protéine Omp2a n'y a jamais été détectée mais on ne peut exclure qu'un promoteur actif en amont du gène *omp2a* soit fonctionnel à un moment du cycle de vie de la bactérie. Le but de ce travail est d'étudier l'expression de ces deux gènes chez *B. melitensis* 16M, puis lors d'une infection en macrophages bovins et en cellules HeLa. Nous avons utilisé un outil génétique, le gène rapporteur *gfpmut3a*, encodant la protéine fluorescente verte, la GFP. Ce gène rapporteur a été placé en aval des promoteurs des gènes *omp2a* et *omp2b*. Nous avons tout d'abord montré l'activité du promoteur du gène *omp2b* chez *B. melitensis* en culture liquide en milieu riche, alors que le promoteur potentiel du gène *omp2a* est inactif dans les mêmes conditions. Lors d'infections en macrophages bovins et en cellules HeLa, la fluorescence de la GFP n'a été détectée que lorsque le gène rapporteur se trouve en aval du promoteur du gène *omp2b*.

Enfin, une étude des effets potentiels de la surexpression des deux gènes sur la virulence de *B. melitensis* 16M a été réalisée grâce à deux plasmides permettant la production accrue des porines Omp2a ou Omp2b.

Cher mémoire,

A ce stade de ta rédaction, je tiens à t'adresser cette missive porteuse de souvenirs et de gratitude. J'avoue que des frayeurs, des sueurs, du labeur et quelques bonheurs tu m'as conférés. Quels bonheurs me diras-tu ? Bonheurs professionnels, familiaux, amicaux... Pour tout ceux-là, je remercierai tour à tour Steph et Jean-Yves mes tuteurs et piliers importants dans ta concrétisation, Monsieur Letesson un hôte de qualité, un boss qualifié..., les doctorants, Calou, Zette, Rose-May, Bernard, David, Kataline, thierry ainsi que les mémorants qui ont rendu cette aventure plus facile à vivre de par le microclimat de confiance et de bonne humeur qu'ils ont instauré. Je n'oublie certainement pas les plus expérimentés, Poss, Anne, Xavier et Luc, toujours là quand j'avais besoin de leurs conseils, ni les techniciens, Christian et Val, pour leur précieux appui.

Tout ces gens, tu les as cotoyés au quotidien, physiquement.

D'autres par contre te connaissent moins mais ont entendu parlé de toi. Qui ?

Il y a Sophie, ma chère amie campée et gelée ces 6 mois à Rouyn (Québec) et avec qui j'ai partagé de nombreuses et enrichissantes heures de conversation sur le net. Elle et moi c'est une longue et belle histoire qui s'est encore renforcée malgré les milliers de kilomètres nous séparant. Combien de temps dépensé à papoter à ton sujet, à chercher des solutions visant à t'améliorer et à temporiser le stress que tu m'as donné. Sophie fait partie intégrante de notre vie, elle a mis toute sa confiance dans cette aventure !

Parlons de confiance... Confiance d'une maman et d'une sœur toujours sur le qui vive, toujours à l'écoute. Elles ont su croire en moi et méritent bien que je leur dédie mon travail. Sans elles, je n'y serais probablement pas arrivé. (maman, je te dispense de la lecture du mémoire...)

Si je dois te remettre le 16 et me séparer de toi quelques instants, c'est pour de nobles causes : « Bon anniversaire maman », et rencontre via écran interposé avec ma ou mon futur(e) filleul(e)...

Je souhaite à d'autres de connaître le même « happy end », à mes amies Charlotte, Gene, Cath, Marmotte. Courage les filles, vous en sortirez vivantes croyez-moi.

La page des remerciements étant tournée, je tiens à terminer en présentant mes excuses pour les travers de ma personnalité qui- je l'avoue- ne sont guère faciles à vivre ! N'oublions cependant pas les côtés positifs de celle-ci... oui oui il y en a !!

C'est avec beaucoup d'émotions que je te quitte et que je te confie aux membres du jury à qui j'adresse mes remerciements pour avoir bien voulu te lire et te rendre digne d'intérêt...

Le 16 juin 2000 Chantal Deschamps

Abbreviations

rpm :	rotation par minutes.
OMP :	Outer Membrane Protein
bp :	paire de base
Kb :	Kilobase
kDa :	kilodalton
ORF :	Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
PCR	polymerisation Chain Reaction
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
wt :	wild type
IR :	Inverted Repeat
SD :	Shine Dalgarno
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
DO	Densité optique
Asp :	aspartate
Phe :	phénylalanine
Ser :	sérine
Tyr :	tyrosine
Gly :	glycine
Val :	valine
Glu :	acide glutamique

1.	INTRODUCTION.....	1
1.1.	INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.2.	ORGANISATION DE L'ENVELOPPE DES BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES	2
1.2.1.	<i>Description de l'enveloppe bactérienne.....</i>	2
1.2.1.1.	La membrane interne	2
1.2.1.2.	Le périplasme.....	2
1.2.1.3.	La membrane externe	3
1.2.1.4.	Composition protéique de la membrane externe	4
1.2.2.	<i>Les protéines de la membrane externe chez Brucella.....</i>	6
1.3.	LE LOCUS <i>OMP2</i>	7
1.3.1.	<i>Organisation du locus.....</i>	7
1.3.2.	<i>Variations génétiques du locus chez les différentes espèces</i>	8
1.3.2.1.	Polymorphisme au niveau de la séquence nucléotidique	8
1.3.2.2.	Variation de la séquence protéique encodée.....	9
1.3.3.	<i>Expression d'omp2b et d'omp2a chez E. coli et chez Brucella.....</i>	9
1.3.4.	<i>Activité pore-formatrice et structure des porines Omp2a et Omp2b.....</i>	12
1.3.5.	<i>Existe-t-il un lien entre des porines et la virulence chez Brucella ?</i>	13
1.4.	LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES PORINES.....	15
1.4.1.	<i>Généralités.....</i>	15
1.4.2.	<i>La régulation transcriptionnelle : le système EnvZ-OmpR.....</i>	15
1.4.3.	<i>La régulation post-transcriptionnelle : le rôle de micF en tant qu'ARN antisens</i>	17
1.5.	LE GÈNE RAPPORTEUR <i>GFP</i>	18
1.5.1.	<i>Définition et utilisation</i>	18
1.5.2.	<i>Structure de la protéine GFP et de son chromophore.....</i>	19
1.5.3.	<i>Mutagenèse de la gfp.....</i>	20
2.	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	21
3.	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	22
3.1.	ETUDE DE LA RÉGULATION DU LOCUS <i>OMP2</i> À L'AIDE DU GÈNE RAPPORTEUR <i>GFP</i> <i>MUT3A</i>	22
3.1.1.	<i>Constructions préliminaires : les plasmides pTB1 et pTB2</i>	23
3.1.2.	<i>Construction du plasmide pTB2b</i>	23
3.1.3.	<i>Construction du plasmide pTB2a</i>	24
3.1.4.	<i>Vérification de la fonctionnalité du gène rapporteur gfpmut3a chez E.coli en microscopie et en fluorimétrie</i>	25

3.1.5.	<i>Intégration des plasmides pTB2a et pTB2b dans le génome de B.melitensis 16M.....</i>	27
3.1.5.1.	Sélection des intégrants	28
3.1.5.2.	Vérification de l'intégration des plasmides par Southern blot.....	28
3.1.5.3.	Etude de la variation de l'expression de la <i>gfpmut3a</i> chez <i>B. melitensis</i> en microscopie à fluorescence 29	
3.1.6.	<i>Régulation de l'expression des gènes du locus omp2 de B. melitensis lors d'infections de macrophages et de cellules HeLa.....</i>	30
3.2.	ETUDE DE L'EFFET DE L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DES ORF DU LOCUS <i>OMP2</i> SUR LA VIRULENCE DE <i>B.MELITENSIS</i>	32
3.2.1.	<i>Les plasmides pBB2a et pBB2b.....</i>	33
3.2.2.	<i>Vérification de la surproduction des porines par les plasmides pBB2a et pBB2b chez B. melitensis</i> 34	
3.2.3.	<i>Infection de macrophages par les clones B. melitensis pBB2a, B. melitensis pBB2b et B. melitensis</i> 35	
4.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	37
5.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	41
5.1.	MATÉRIELS.....	41
5.1.1.	<i>Solutions et milieux</i>	41
5.1.1.1.	Solutions d'antibiotiques et autres	41
5.1.1.2.	Milieu de culture.....	41
5.1.2.	<i>Souches bactériennes et plasmides.....</i>	42
5.1.2.1.	Souches bactériennes	42
5.1.2.2.	Plasmides.....	43
5.2.	MÉTHODES	45
5.2.1.	<i>Techniques relatives à l'ADN.....</i>	45
5.2.1.1.	Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes.....	45
5.2.1.2.	Transformations de bactéries CaCl ₂ compétentes	45
5.2.1.3.	Extraction d'ADN plasmidique.....	46
5.2.1.4.	restriction d'ADN plasmidique purifié.....	48
5.2.1.5.	Electrophorèse en gel d'agarose.....	49
5.2.1.6.	Extraction d'ADN d'un gel d'agarose	51
5.2.1.7.	Réaction de ligation	51
5.2.1.8.	Purification d'ADN.....	52
5.2.1.9.	Polymerase Chain Reaction :PCR.....	53

5.2.2.	<i>La conjugaison bactérienne</i>	58
5.2.3.	<i>Analyse de l'ADN génomique de Brucella sp par Southern blot</i>	60
5.2.3.1.	Extraction de l'ADN génomique de <i>Brucella sp</i>	60
5.2.3.2.	Analyse de l'ADN restreint par Southern blot	61
5.2.4.	<i>Observation de l'émission de la fluorescence par la protéine GFP en microscopie à fluorescence</i>	66
5.2.4.1.	Protocole.....	66
5.2.4.2.	Solutions et matériel	67
5.2.5.	<i>Technique relative aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western blot</i>	68
5.2.5.1.	BCA.....	68
5.2.5.2.	SDS PAGE.....	70
5.2.5.3.	Western blot	72
5.2.6.	<i>Infections en macrophages bovins et en cellules HeLa</i>	76
5.2.6.1.	Etude de la virulence: modèle cellulaire.....	76
5.2.6.2.	Analyse de la fluorescence en condition d'infection.	78
6.	BIBLIOGRAPHIE	79

INTRODUCTION

1. Introduction

1.1. Introduction générale

Brucella est une bactérie pathogène qui infecte principalement des cellules phagocytaires de l'hôte dans lesquelles elle pénètre et se multiplie. Vu cette capacité à survivre à l'intérieur de cellules eucaryotes, il est intéressant d'étudier les relations qu'entretient cette bactérie Gram négative avec son environnement.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes concentrés sur la régulation de l'expression de deux gènes encodant les porines Omp2a et Omp2b chez *Brucella*. Ces porines sont localisées dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein) et forment des canaux hydrophiles permettant la diffusion de petits solutés tels que les sucres et ions. Les porines Omp2a et Omp2b de *Brucella* diffèrent par leur activité pore formatrice : l'Omp2a permet une meilleure diffusion des sucres et des ions que l'Omp2b (J-Y. Paquet, 1999). La bactérie pourrait ainsi modifier la perméabilité de sa membrane externe en modulant l'expression de l'une ou l'autre porine. La survie dans les cellules eucaryotes nécessite peut-être cette modification adaptative de la perméabilité de la membrane externe.

Afin de mieux comprendre en quoi ces deux porines sont importantes pour la bactérie, nous évoquerons dans un premier temps l'organisation de l'enveloppe bactérienne avant de détailler les différentes protéines de la membrane externe de *Brucella*. Ensuite nous décrirons le locus *omp2* ainsi que la structure et la fonction des deux porines Omp2a et Omp2b encodées par celui-ci. Enfin, nous évoquerons un modèle de régulation de porines bien connu chez *Escherichia coli*.

1.2. Organisation de l'enveloppe des bactéries Gram négatives

1.2.1. Description de l'enveloppe bactérienne

Les bactéries Gram négatives possèdent une enveloppe constituée de différentes couches que nous détaillerons ci-dessous de l'intérieur de la bactérie vers l'extérieur. (Figure I.1.)

1.2.1.1. La membrane interne

La membrane cytoplasmique, également appelée membrane interne, est une bicouche phospholipidique (dont la composition est de 70 à 80% de phosphatidyléthanolamine, 15 à 25% de phosphatidylglycérol et 5 à 10% de cardiolipine) similaire à la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. Cependant, chez les bactéries Gram négatives, elle contient un plus grand nombre de constituants protéiques devant supporter les nombreuses fonctions effectuées chez les cellules eucaryotes par des protéines réparties dans les membranes des organelles. La membrane interne est impliquée dans de nombreux aspects de la croissance ainsi que du métabolisme bactérien tels que la génération d'énergie, le transport de nutriments, la translocation des constituants de l'enveloppe ainsi que la division et la ségrégation chromosomique (Neidhart, 1996).

Une simple couche de muréine, également appelée peptidoglycan, protège la membrane interne et confère à la bactérie un support mécanique et rigide. Le peptidoglycan est un hétéropolymère constitué de sucres et d'acides aminés. Cette molécule fortement polaire empêche le passage de composés hydrophobes mais est très perméable aux petits solutés hydrophiles tels que les sucres et acides aminés.

1.2.1.2. Le périplasme

La membrane interne et la membrane externe, décrite plus loin, délimitent un espace appelé périplasme. Dans cet espace se trouve la simple couche de muréine mais également toute une série de protéines. Certaines sont associées soit à la membrane interne soit à la

membrane externe, tandis que d'autres peuvent diffuser dans la phase aqueuse de l'espace périplasmique. Les protéines du périplasma peuvent être réparties en différentes catégories suivant leur fonction. Citons quelques exemples : (i) des enzymes cataboliques dégradant des composés complexes en molécules plus simples pouvant traverser la membrane interne ; (ii) des enzymes détoxifiantes protectrices de la bactérie (β lactamase); (iii) des enzymes intervenant dans la biogenèse des constituants de l'enveloppe ; (iv) des protéines liant des solutés tels que des vitamines, sucres, acides aminés ou ions ; (v) des chaperones périplasmiques intervenant dans les diverses voies de sécrétion des protéines (Neidhart, 1996).

1.2.1.3. La membrane externe

La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique qui comporte deux types de lipides. Le feuillet interne se compose de phospholipides classiques enrichis en phosphatidyléthanolamines tandis que le feuillet externe possède un composé spécifique et unique à cette membrane, le LPS (lipopolysaccharide) (Vaara, 1987). (Figure I.2.)

Le LPS est une molécule amphiphile constitué de 3 parties : (i) une portion hydrophobe, le lipide A ; (ii) une portion hydrophile, la chaîne O et (iii) connectant ces deux régions, le core.

Le lipide A constitue l'ancrage membranaire et se compose d'un dimère phosphorylé de glucosamines sur lequel sont greffées des molécules d'acides gras généralement saturés.

Le core est un oligosaccharide attaché sur un des sucres aminés du lipide A et permet la connexion entre le lipide A et la chaîne O.

La chaîne O, localisée à la surface bactérienne, est un polysaccharide qui, par son absence ou sa présence, détermine le phénotype Rough (rugueux) ou Smooth (lisse) respectivement de la bactérie (Nikaido and Vaara, 1985). Des mutants rugueux de bactéries pathogènes sont généralement moins virulents. Le LPS est, en raison de sa localisation, une cible majeure de la réponse humorale de l'hôte.

Des interactions très fortes entre les molécules de LPS contribuent à la stabilisation ainsi qu'à la faible perméabilité du feuillet externe de la membrane et empêchent ainsi la pénétration de substances potentiellement toxiques telles que les antibiotiques.

1.2.1.4. Composition protéique de la membrane externe

La composition protéique de la membrane externe est très différente de celle de la membrane interne. Les deux familles de protéines de la membrane externe les plus abondantes sont les lipoprotéines et les porines.

Les lipoprotéines sont des protéines de faibles masses moléculaires insérées dans le feuillet interne. Certaines de ces protéines forment des liaisons fortes (covalentes ou non covalentes) avec le peptidoglycan sous-jacent et sont appelées PAL (Peptidoglycan Associated Lipoprotein).

Parce que la membrane externe est la région directement en contact avec l'environnement de la bactérie, elle doit posséder des structures lui permettant d'effectuer les échanges avec l'environnement. Pour permettre les passages de molécules hydrophiles, la membrane externe est parsemée de porines (Jap and Walian, 1996). Les porines forment des pores transmembranaires permettant entre autre la diffusion de sucres et de peptides dont la masse moléculaire avoisine les 600 Da mais également de cations et d'anions.

La résolution de structures tridimensionnelles de différentes porines (ex : OmpF et PhoE d'*E.coli*) par des méthodes telles que la cristallisation de protéines suivie de la diffraction de rayons X par le cristal ou la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sur la protéine solubilisée a permis de décrire l'architecture de ces porines et de caractériser les relations structure-fonction de ces protéines.

La structure de base commune aux porines est un tonneau transmembranaire formé de 16 brins β anti parallèles reliés entre eux par de longues boucles d'une dizaine d'acides aminés (loops) du côté externe et des coudes courts de 1 à 4 acides aminés (turns) du côté périplasmique. L'unité fonctionnelle de la porine, formée par l'association de trois tonneaux

β , est un homotrimère très stable face à la température et à la présence de SDS (Welte *et al.*, 1995). (Figure I.3.)

La présence et la distribution des résidus chargés dans la lumière du pore détermine la sélectivité de celui-ci. Trois régions sont définies dans un pore : (i) l'entrée du vestibule ; (ii) la zone de constriction ; (iii) le vestibule interne. L'entrée du vestibule se trouvant à la surface extracellulaire de la bactérie est rendue étroite par la présence des longs loops assurant la connection entre les brins β antiparallèles. La zone de constriction est une zone de rétrécissement du canal due au repliement d'un loop, le loop L3. Cette zone procure ainsi une sélection vis à vis des solutés, de par l'étroitesse du passage mais également à cause de l'arrangement des résidus à ce niveau. En effet, les résidus chargés positivement sont situés sur un côté du canal et plus précisément au niveau du loop, et les résidus chargés négativement sur le côté opposé. Cette ségrégation de charges facilite l'entrée de molécules polaires dans la porine. Enfin, s'ouvrant vers le périplasma, le vestibule interne est la partie la plus large du canal. (figure I.4.)

La plupart des porines de structures connues possèdent 16 brins β et sont aspécifiques, mais certaines porines, dites spécifiques parce qu'elles facilitent la diffusion d'un soluté particulier, possèdent 18 brins β par tonneaux (exemple : la maltoporine LamB d'*E.coli*).

Hormis les porines, d'autres protéines comme l'OmpA, FepA et FhuA, utilisent une structure en tonneau β pour traverser la membrane externe. L'OmpA, constituée de 8 brins β anti parallèles, est une protéine très abondante dans la membrane externe. Elle est moins stable que les porines en présence de détergent. Les fonctions de cette OMP ne sont pas encore bien définies mais elle intervient dans les phénomènes de conjugaison bactérienne et joue le rôle de récepteur aux bactériophages (Pautsch and Schulz, 1998) . (Figure I.5.)

FhuA et FepA, des tonneaux β constitués de 22 brins β anti parallèles, sont des récepteurs de haute affinité pour des sidérophores, le ferrichrome et l'entérobactine ferrique respectivement, chélatant l'ion Fe^{3+} . Ces récepteurs sont des transporteurs actifs et spécifiques pour leur substrat qui permettent la translocation de substances existant en

concentrations faibles à l'extérieur de la bactérie, en l'occurrence l'ion Fe^{3+} (Postle, 1999). Ce transport actif nécessite de l'énergie qui est transférée de la membrane cytoplasmique à la membrane externe par une protéine, la protéine TonB. Celle-ci forme avec deux autres protéines, ExbB et ExbD, un complexe au niveau de la membrane cytoplasmique permettant de coupler l'énergie engendrée par la force proton motrice de la membrane cytoplasmique au transport des complexes sidérophores- Fe^{3+} à travers la membrane externe (Letain and Postle, 1997). (Figure I.6.)

1.2.2. Les protéines de la membrane externe chez *Brucella*

Chez *Brucella*, les protéines de la membrane externe sont réparties en plusieurs groupes en fonction de leur masse moléculaire apparente après une électrophorèse en conditions dénaturantes dans un gel SDS polyacrylamide (SDS PAGE) : (i) le groupe 1 (88 à 94kDa); (ii) le groupe 2 (35 à 39kDa) et (iii) le groupe 3 (25 à 31kDa) (Verstrete *et al.*, 1982).

Le groupe 1 comprend une OMP, l'Omp89, également appelée Omp1, dont la fonction est inconnue (S.Genevrois, 1999).

Les protéines du groupe 2 sont les OMP ayant une activité pore formatrice, Omp2b et Omp2a, dont nous reparlerons dans la suite de ce travail.

L'Omp25 et l'Omp31 appartiennent au groupe 3. La séquence de l'Omp25 est conservée chez les différentes espèces de *Brucella* et présente 43% d'identité avec RopB, une protéine de la membrane externe associée au peptidoglycan de *Rhizobium leguminosarum* (Cloeckaert *et al.*, 1996). L'Omp31 possède 35% d'identité avec RopB mais ne semble pas être associée au peptidoglycan (Cloeckaert *et al.*, 1996). Les fonctions de ces deux protéines sont inconnues.

D'autres OMP peu abondantes dans la membrane externe ont été identifiées : l'Omp10, 16 et 19 sont des lipoprotéines (Tibor *et al.*, 1999). Une similarité de séquence avec des PAL (peptidoglycan associated lipoprotein) a été détectée dans le cas de l'Omp16 et son association avec le peptidoglycan a été montré expérimentalement (Cloeckaert *et al.*, 1992).

Aucune fonction n'est connue pour l'Omp 16, mais une délétion de celle-ci fragilise la paroi bactérienne.

1.3. Le locus *omp2*

Le locus *omp2* est la partie du génome de *Brucella* encodant les deux protéines à activité pore formatrice du groupe 2, Omp2a et Omp2b.

1.3.1. Organisation du locus

Le locus *omp2*, dont la longueur est de 3,5Kb, a tout d'abord été cloné et séquencé chez *B abortus* 2308. Il comporte deux gènes partageant plus de 85 % d'identité de séquences (Ficht *et al.*, 1989).

L'un de ces gènes encode l'Omp2b qui a été identifiée comme étant la porine de 36kDa du groupe 2.

Le second gène est un homologue d'*omp2b*, appelé *omp2a*, dont l'expression n'a encore jamais été rapportée chez *Brucella*.

Les deux gènes, *omp2a* et *omp2b*, sont orientés de manière opposée et séparés par 832 bp (Ficht *et al.*, 1989).

Les 287 premières paires de base des deux gènes sont totalement identiques : cette séquence est donc présente en répétition exactement indirecte. Ces 2 IR (inverted repeat) commencent en amont des 2 motifs Shine Dalgarno (SD) ou RBS dont le motif consensus est GGAGG située 7 bp en amont des codons start des 2 ORFs. Les 2 protéines potentiellement encodées par ces 2 ORFs sont donc identiques pour les 95 premiers acides aminés comprenant un peptide signal de 22 acides aminés (Ficht *et al.*, 1989). (Figure I.7.)

Des terminateurs de transcription ρ indépendants ont été définis dans les deux gènes du locus.

Une troisième ORF, *orfC*, dont la fonction est inconnue, est localisée sur le brin complémentaire à l'*omp2b*. Tout comme les séquences protéiques des porines, la protéine potentiellement encodée par cette ORF possède une phénylalanine carboxyterminale. Cet acide aminé intervient dans l'ancrage des porines en membrane. Ajoutons qu'aucun motif SD n'a été identifié en amont du codon start, et qu'il n'y a pas de terminateur de transcription prédit entre la fin d'*orfC* et le début d'*omp2a*.

Si un ARN messager correspondant à cette ORF était produit, il pourrait constituer un ARN antisens de l'ARN messager *omp2b*. Nous en reparlerons dans la suite de ce travail.

1.3.2. Variations génétiques du locus chez les différentes espèces

On distingue dans le genre *Brucella* au moins 6 espèces : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. suis* et *B. ovis*. Cette classification se base sur des propriétés phénotypiques caractérisant *Brucella* et sur la spécificité de l'hôte infecté. Trois des 6 espèces citées ci-dessus (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) sont subdivisées en biovars (ensemble de souches présentant les mêmes caractères phénotypiques).

L'analyse du polymorphisme des longueurs des fragments obtenus lors de restrictions des gènes *omp2a* et *omp2b* amplifiés par PCR constitue un outil de typage moléculaire des différentes souches de *Brucella*.

1.3.2.1. Polymorphisme au niveau de la séquence nucléotidique

Chez les différentes espèces du genre *Brucella*, l'agencement du locus *omp2* est très conservé. Des différences existent cependant au niveau de la séquence nucléotidique et peuvent être utilisées pour classer les six espèces en cinq groupes : (i) le groupe 1 : les biovars 1, 2 et 4 de *B. abortus* ; (ii) le groupe 2 : les biovars 3, 5, 6 et 9 de *B. abortus* ; (iii) le groupe 3 : *B. melitensis* ; (iv) le groupe 4 : *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* ; (v) le groupe 5 : *B. ovis*.

Cette classification a été réalisée sur base de RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Cloeckaert *et al.*, 1995). (figure I.8.)

La taille des gènes *omp2a* et *omp2b* est fort similaire chez toutes les espèces de *Brucella* excepté pour l'*omp2a* de *B. abortus* 2308, ce gène ayant subi une délétion de 120bp.

La souche de référence de *B. ovis* présente la particularité de posséder une copie d'*omp2b* presque identique à *omp2a*.

1.3.2.2. Variation de la séquence protéique encodée

L'analyse de préparations d'enveloppes cellulaires par Western blot en utilisant un antisérum anti Omp2 a révélé un polymorphisme dans le pattern des protéines exprimées (Ficht *et al.*, 1990). (Figure I.9.)

B. abortus et *B. melitensis* expriment chacune une seule protéine de 36 kDa ; les espèces du groupe 4 (*B. suis*, *B. neotomae* et *B. canis*) expriment 2 protéines de 36 et 38 kDa et *B. ovis* une protéine de 40 kDa.

L'observation d'une seule bande à 36 kDa chez *B. abortus* est cohérente avec l'activité démontrée du gène *omp2b* qui exprime une porine de 36kDa. Ce résultat n'exclut cependant pas la possibilité d'expression des 2 gènes chez *B. abortus* et *B. melitensis*.

Le groupe 4 exprime deux formes de porines. Ceci pourrait s'interpréter comme résultant de l'expression des gènes *omp2a* et *omp2b*. Il est également possible qu'il existe une régulation post-traductionnelle aboutissant à deux tailles différentes pour une même protéine exprimée. En se référant aux séquences des deux gènes *omp2a* et *omp2b*, la première hypothèse semble compromise vu qu'une différence de seulement 15bp entre ces deux gènes ne peut engendrer une variation de 2 kDa entre les deux protéines potentiellement exprimées.

1.3.3. Expression d'*omp2b* et d'*omp2a* chez *E. coli* et chez *Brucella*

Dans le Western blot décrit précédemment, une seule protéine de 36kDa a été détectée chez *B. abortus*. Vu ces résultats, il est intéressant de savoir si les deux gènes du locus *omp2* sont fonctionnels.

Nous décrivons brièvement ci-dessous deux expériences réalisées afin de savoir si le locus contient un ou deux promoteurs actifs et si l'ORF *omp2a* encode une protéine fonctionnelle.

Par une restriction *Pst*I, deux fragments ont été extraits de la région contenant le promoteur d'*omp2b* : un fragment de 355bp se trouvant dans l'orientation d'*omp2b* et juste en amont de cette ORF ; et un autre de 550bp se trouvant dans l'orientation et en amont de l'ORF *omp2a*. Ces fragments ont été clonés dans leurs deux orientations possibles dans un plasmide en amont d'un gène *lacZ* dépourvu de son promoteur. Cette fusion transcriptionnelle a ainsi permis de mesurer l'activité de la β galactosidase chez *E. coli* (Ficht *et al.*, 1989).

Dans le cas de la fusion impliquant le segment de 355bp, il y a activation de la β galactosidase lorsque ce fragment se trouve dans la situation du promoteur de l'Omp2b, mais dans le cas des trois autres fusions, aucune activité n'est détectée. (Figure I.10.)

Cette donnée suggère la présence d'un seul promoteur fonctionnel, dans le cas présent le promoteur d'*omp2b*, capable d'induire une activité chez *E. coli* mais n'exclut pas une activité possible du fragment de 550bp chez *B. abortus* à un moment défini de son cycle de vie. Il est aussi possible qu'un éventuel promoteur présent dans le fragment 550 ne soit pas fonctionnel chez *E. coli* dans les conditions de croissance utilisées.

Une deuxième expérience consistant à retourner la partie du locus comprise entre les 2 IR permet d'exprimer la protéine de 33 kDa Omp2a de *B. abortus* 2308. En effet, dans cette situation, l'ORF du gène *omp2a* se trouve en aval du promoteur d'*omp2b*. Cette inversion a été réalisée artificiellement mais des phénomènes d'inversion de segments d'ADN existent chez les bactéries Gram négatives.

Le locus *omp2* de *Brucella* est donc composé de deux régions homologues. Une de ces régions contient le gène *omp2b* qui est actif chez *E.coli* et encode une protéine de 36 kDa. L'autre région contient une ORF, appelée *omp2a*, qui est homologue d'*omp2b* mais ne semble pas exprimée chez *E.coli*. Comme cela a été montré dans les expériences décrites ci-dessus, si cette ORF est fusionnée à un promoteur actif, elle encode une protéine qui possède une

composition en acides aminés et des caractéristiques de structure similaires à la porine Omp2b. Cependant, il n'y a aucune preuve qu'une telle protéine puisse être détectée chez *Brucella*.

L'explication la plus vraisemblable pour expliquer la conservation de l'arrangement de ce locus chez toutes les espèces de *Brucella* est que l'expression d'*omp2a* et d'*omp2b* pourrait être régulée par certaines conditions environnementales comme cela est le cas pour l'OmpC et l'OmpF d'*E. coli* (voir point 1.4.). La nature de ces conditions environnementales n'est pas connue mais serait probablement liée à la capacité de *Brucella* à survivre à l'intérieur des phagocytes professionnels. Vu la présence des deux IR de part et d'autre de la région contenant le promoteur actif d'*omp2b*, la régulation des deux gènes du locus pourrait utiliser un mécanisme d'inversion (switch) afin de placer le promoteur fonctionnel dans l'alignement de l'ORF *omp2a*, ce qui a été réalisé artificiellement dans une expérience décrite précédemment.

Des régulations dans l'expression d'un phénotype bactérien peuvent en effet impliquer des réarrangements d'ADN. Les meilleurs exemples connus sont des variations d'expression des gènes encodant pour des structures de surface telles que les flagelles, les fimbria et des protéines de la membrane externe. Un des mécanismes permettant la régulation de gènes par réarrangement du génome consiste à inverser un segment d'ADN contenant un promoteur. Pour illustrer ce mécanisme nous décrirons brièvement le cas de la régulation de deux protéines flagellaires, H1 et H2, chez *Salmonella typhimurium*. (Henderson *et al.*, 1999). *Salmonella* peut exprimer deux variétés de gènes flagellaires, H1 et H2, mais n'en exprime jamais qu'une seule à la fois. Au cours de la prolifération d'un clone, certaines bactéries commutent spontanément l'expression de leur protéine flagellaire vers l'autre variété. Ce processus s'appelle "*variations de phase*", la phase une exprimant une protéine flagellaire et la phase deux exprimant l'autre variété, et met en jeu l'inversion d'un segment d'ADN se trouvant entre deux IR et comprenant le promoteur. Une recombinase spécifique d'une cible unique effectue la recombinaison entre les deux IR et inverse ainsi la région contenant le

promoteur. Le promoteur change donc d'orientation et allume le gène flagellaire de la nouvelle phase.

1.3.4. Activité pore-formatrice et structure des porines Omp2a et Omp2b

L'activité pore formatrice des porines Omp2a et Omp2b a été démontrée par l'utilisation de protéoliposomes. Le test utilisé consiste en l'incorporation de porines purifiées dans des liposomes reconstitués à partir de phospholipides. Ces liposomes contiennent du dextran et sont dilués dans des solutions isotoniques de différents sucres ayant des masses moléculaires différentes et donc des tailles différentes. Le sucre en solution peut alors diffuser à travers les porines. La concentration en sucre à l'intérieur du liposome augmentant et le dextran ne pouvant pas sortir, de l'eau pénètre dans les liposomes pour maintenir l'isotonie. Un taux de gonflement des liposomes quantifié par turbidimétrie permet d'évaluer un coefficient de perméabilité de la porine. Il est ainsi possible d'évaluer un taux de pénétration qui est fortement influencé par la taille de la molécule même si celle-ci se trouve dans la limite d'exclusion du pore se trouvant aux alentours de 600Da. Cette technique a permis de montrer une différence de perméabilité entre l'Omp2a et l'Omp2b chez *B. melitensis* (J-Y. Paquet, 1999). (figure I.11.). L'Omp2a est dans cette souche plus perméable que l'Omp2b.

Afin de comprendre les relations structure-fonction des porines Omp2a et Omp2b, un modèle a été élaboré par des méthodes de prédictions de structures secondaires.

Selon des prédictions théoriques, l'Omp2b serait constituée de trois tonneaux transmembranaires contenant chacun 16 brins β antiparallèles. Concernant l'Omp2a, une hypothèse émise par Jean-Yves Paquet tient compte du fait que l'on n'a pas pu montrer la trimérisation de l'Omp2a chez *B. abortus* et qu'une délétion de 43 résidus au niveau de l'Omp2a pourrait impliquer deux brins β de part et d'autre d'un loop, le loop L4, ce qui forcerait cette porine à constituer un tonneau β de 14 brins (Jean-Yves Paquet, 2000). (Figure I.12.).

1.3.5. Existe-t-il un lien entre des porines et la virulence chez

Brucella ?

Brucella étant une bactérie capable d'infecter les cellules eucaryotes, nous pouvons nous interroger sur les mécanismes lui permettant d'infecter et de survivre dans la cellule hôte. Dans notre cas, la question posée est la suivante : « des protéines de la membrane externe telles que l'Omp2a et l'Omp2b peuvent-elles avoir un rôle à jouer dans des phénomènes d'infection et de virulence ? ». Le rôle des porines de *Brucella* dans la virulence n'ayant jamais été investigué, nous aborderons cette question en décrivant très brièvement le rôle d'OMP, homologues ou non des porines Omp2a et Omp2b de *Brucella*, impliquées dans la virulence de différentes bactéries.

Les espèces du genre *Bartonella* sont des bactéries provoquant la prolifération des cellules endothéliales de petits vaisseaux sanguins ainsi que l'angiogenèse par des mécanismes encore très peu connus. La pénétration de *Bartonella henselae* dans la cellule endothéliale stimulerait peut-être la prolifération de ces cellules. Une OMP de 43kDa, l'Omp43, est impliquée dans le phénomène d'adhésion de la bactérie à des cellules endothéliales de cordons ombilicaux humains (Burgess and Anderson, 1998).

Un autre lien peut être établi avec la bactérie *Rhizobium leguminosarum* appartenant au même groupe des $\alpha 2$ Protéobactéries que *Brucella* (Moreno *et al.*, 1990). Durant l'établissement de la symbiose, cette bactérie symbiotique des plantes légumineuses subit de nombreux changements résultant en la formation de bactéroïdes dans le cytoplasme de la cellule végétale. Les OMP de *Rhizobium* sont divisés en 4 groupes d'antigènes prédominants désignés I, II, III et IV. Deux de ces groupes, les groupes II et III, présentent une forte diminution d'expression durant la symbiose (Roest *et al.*, 1995). Les gènes *ropA* et *ropA2* sont responsables de l'expression de l'antigène du groupe III, et la diminution de l'expression de celui-ci durant le développement du bactéroïde se fait au niveau transcriptionnel. Des alignements de séquences des gènes *ropA* et *ropA2* dans une banque de données ont révélé de fortes similarités avec deux gènes de *B. abortus*, *omp2a* et *omp2b* (Roest *et al.*, 1995).

Chez une autre espèce pathogène *Salmonella typhimurium*, la régulation de deux porines, OmpC et OmpF, par un système de régulation à deux composantes (EnvZ-OmpR, voir point 1.4.3.) s'avère indispensable pour la virulence de la bactérie (Chatfield *et al.*, 1991).

Neisseria gonorrhoeae, une bactérie pathogène extracellulaire, possède plusieurs facteurs jouant un rôle dans l'infection des cellules eucaryotes. Parmi ces facteurs, un pili permet l'adhérence de la bactérie à la cellule eucaryote, des protéines Opa interviennent dans l'adhésion et la pénétration de la bactérie et une porine, PorB, déclenche l'apoptose de la cellule hôte. PorB est une porine capable de passer de la membrane externe de la bactérie dans la membrane de la cellule eucaryote et de produire un effet apoptotique similaire au facteur TNF α . Le mécanisme par lequel la porine de *Neisseria* induit l'apoptose dépend de ses propriétés à former des canaux sélectifs pour les ions dans les membranes des cellules eucaryotes. En effet, PorB provoque une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium cytosolique qui active des cystéines protéases, les caspases, impliquées dans l'apoptose (Muller *et al.*, 1999). Le même phénomène se produit chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Buommino *et al.*, 1999).

Ajoutons que, comme beaucoup d'organismes pathogènes intracellulaires, *Brucella* possède des motifs RGD (Arg-Gly-Asp) capables d'interagir avec de nombreuses intégrines des cellules phagocytaires pour faire adhérer la bactérie et ensuite pénétrer dans la cellule hôte. L'adhésion de *Brucella* dépend en partie de la liaison de motifs RGD présents sur des protéines de la membrane externe, Omp2a, Omp2b et Omp1, à des intégrines (Campbell *et al.*, 1994).

Ces quelques exemples suggèrent que les deux porines Omp2a et Omp2b de *Brucella* pourraient être impliquées dans des phénomènes d'adhésion et de virulence et pourraient donc subir des régulations durant le cycle de vie de la bactérie.

1.4. La régulation de l'expression des porines

1.4.1. Généralités

Après avoir décrit la structure de la membrane externe des bactéries Gram négatives ainsi que les caractéristiques du locus *omp2* de *Brucella* et des porines qu'il encode, nous décrivons ci-dessous une régulation connue de l'expression de deux porines, OmpF et OmpC, chez *E. coli*.

Ces deux porines, résultant probablement de la duplication d'un gène, permettent à la bactérie de s'adapter aux variations de son environnement extérieur et notamment aux fluctuations osmotiques et thermiques grâce à leurs propriétés de diffusion différentes.

E. coli est une bactérie pouvant vivre dans deux environnements très différents, les intestins et le milieu extérieur. Elle doit donc pouvoir distinguer et s'adapter aux différentes conditions de ces deux milieux, à savoir : une température très élevée, des nutriments abondants, des sels biliaires très concentrés et une osmolarité très élevée dans les intestins ; une température plus basse, des nutriments rares et une faible osmolarité dans le milieu extérieur.

L'osmolarité et la température servent d'indicateurs à la bactérie et permettent des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles des gènes encodant les deux porines.

1.4.2. La régulation transcriptionnelle : le système EnvZ-

OmpR

L'OmpC et l'OmpF partagent 69% d'identité au niveau de la séquence en acides aminés et 58% de similarité. Cependant, le taux de diffusion à travers l'OmpF est 10 fois plus élevé qu'à travers l'OmpC.

Sous des conditions de faible osmolarité, la production d'OmpF est favorisée alors que dans des conditions de haute osmolarité, comme dans les intestins, c'est la production de

l'OmpC qui prédomine. En effet, cette dernière diminue la perméabilité membranaire de la bactérie pour les petits nutriments et rend le passage plus difficile pour des molécules plus grosses, hydrophobes et chargées négativement comme par exemple les sels biliaires.

La régulation de la production de ces deux porines se fait essentiellement au niveau transcriptionnel et implique trois loci : *ompF* et *ompC* encodant les protéines OmpF et OmpC respectivement et l'opéron *ompB* qui est le locus de régulation des gènes *ompF* et *ompC* (Silhavy, 1995). Celui-ci encode les protéines EnvZ et OmpR toutes les deux impliquées dans la régulation de l'expression des deux porines. Les protéines EnvZ et OmpR constituent l'archétype d'un système de régulation à deux composantes. (Figure I.13.)

Un système de régulation à deux composantes est un système de régulation dans lequel une information extérieure est captée par un senseur puis transmise à un effecteur via une phosphorylation.

EnvZ, le senseur du système, est une protéine de 450 acides aminés que l'on trouve en membrane externe. Elle est constituée d'un domaine N terminal périplasmique, de deux portions transmembranaires et d'un domaine C terminal cytoplasmique. La nature du signal permettant à EnvZ de détecter les variations de l'osmolarité n'est pas connue et la région captant celui-ci n'est pas encore définie (Silhavy, 1995). Une fois le signal d'osmolarité perçu, EnvZ s'autophosphoryle sur une histidine en présence d'ATP et acquiert les activités kinase et phosphatase. Elle peut alors transférer son groupement phosphate sur un résidu d'aspartate de l'effecteur OmpR.

OmpR, l'effecteur du système, est une molécule monomérique constituée d'un domaine C terminal pouvant se lier à l'ADN (DNA binding domain) et d'un domaine N terminal sur lequel s'effectue la phosphorylation au niveau d'un résidu aspartate (Silhavy, 1995). OmpR est appelé « modulateur » car elle intervient dans l'activation et /ou la répression des gènes *ompF* et *ompC*.

Suivant le signal transmis par EnvZ à l'OmpR, ce dernier va soit favoriser l'expression d'*ompF* dans des conditions de faible osmolarité, soit augmenter l'expression d'*ompC* et réprimer *ompF* dans des conditions de haute osmolarité. La concentration intracellulaire de

l'OmpR phosphorylée (OmpR-P) est régulée par les activités kinase et phosphatase d'EnvZ (Russo and Silhavy, 1991). Cette concentration se maintient à des valeurs relativement basses dans des conditions de faible osmolarité et augmente lorsque la bactérie passe dans un milieu de haute osmolarité. Lorsque le taux de l'OmpR-P est bas, le gène *ompF* est préférentiellement exprimé, par contre, lorsque le taux de l'OmpR-P est élevé, il y a répression d'*ompF* et augmentation de l'expression d'*ompC*. (Figure I.14.)

1.4.3. La régulation post-transcriptionnelle : le rôle de *micF* en tant qu'ARN antisens

Hormis l'osmolarité, d'autres paramètres environnementaux sont capables de moduler l'expression du gène *ompF*. En effet, le taux d'OmpF dans la membrane externe fluctue en réponse à des variations osmotiques mais également à des changements de température et de pH ainsi qu'aux stress oxydatifs.

La régulation de l'expression d'*ompF* face à des changements de température, des stress oxydatifs mais également des variations d'osmolarité est médiée par un ARN : l'ARN *micF* (mRNA interfering complementary RNA). Celui-ci est un ARN antisens qui régule le taux d'OmpF en agissant post-transcriptionnellement (Silhavy, 1995).

Les ARN antisens sont des petites molécules d'ARN dont la taille ne dépasse pas 200 nucléotides chez les bactéries. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, comme leur nom l'indique, ces ARN peuvent s'hybrider partiellement sur un ARN messager qui lui est complémentaire. Cette hybridation permettant notamment de masquer le RBS (Ribosome Binding Site) et le codon start AUG empêchant ainsi la traduction.

La plupart des ARN antisens connus sont encodés dans le même locus que leur ARN cible ; ils sont appelés ARN antisens *cis* encodés. Cependant, il existe une autre classe d'ARN, les ARN antisens *trans* encodés, qui sont encodés dans un locus différent de leur ARN cible (Delihias, 1995).

L'ARN *micF* fait partie de ce dernier groupe. Il est encodé par un gène de 300 bp ne possédant pas d'ORF et se trouvant juste en amont du gène *ompC*.

Pour réguler le taux d'OmpF, l'ARN *micF* s'hybride à l'extrémité 5' du messager de l'OmpF et masque ainsi le RBS et le codon start AUG, inhibant ainsi la traduction. En plus d'inhiber la traduction de l'ARN messager, l'ARN *micF* participe également à sa déstabilisation.

OmpR et SoxS sont deux régulateurs connus de la transcription de *micF* qui peuvent se lier aux séquences régulatrices du gène *micF*. OmpR est le régulateur impliqué dans la réponse de la variation d'osmolarité et SoxS est impliqué dans la réponse du stress oxydatif. Quant au facteur responsable de la régulation thermique, il n'a pas encore été identifié.

1.5. Le gène rapporteur *gfp*

1.5.1. Définition et utilisation

Afin de suivre l'expression des deux gènes d'intérêt, *omp2a* et *omp2b*, nous utilisons un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente verte, la GFP (Green Fluorescent Protein).

Avant de décrire cette protéine et de citer les avantages de son utilisation, rappelons brièvement l'utilité d'un gène rapporteur.

Un gène rapporteur est un outil génétique permettant d'étudier l'expression de gènes. Ce gène, dépourvu de son promoteur, est placé en aval du promoteur d'intérêt et permet ainsi de détecter l'activité de ce dernier. L'ORF du gène rapporteur code pour une protéine dont l'expression est facilement détectable ou quantifiable. (Figure I.15.). Il existe de nombreux gènes rapporteurs codant pour une enzyme ou une protéine dont l'activité est détectable : voici quelques exemples : le gène *lacZ* codant pour la β galactosidase, des gènes conférant à l'organisme un avantage sélectif comme une résistance à un antibiotique (*bla*, *kan*), des gènes encodant des protéines ou des enzymes dont l'activité peut être visualisée (*gfp*, *lux*).

La fusion plaçant le promoteur d'intérêt en amont de l'ORF du gène rapporteur est dite transcriptionnelle lorsque cette ORF possède sa propre séquence d'initiation de la traduction (RBS ou SD), ou traductionnelle si l'ORF ne porte pas cette séquence et nécessite, en plus de l'apport des signaux d'initiation de la transcription, les signaux d'initiation à la traduction.

1.5.2. Structure de la protéine GFP et de son chromophore

La GFP est une protéine qui fluoresce spontanément et qui provient d'organismes marins tels que les Cnidaires (*Aequorea victoria*). Cette protéine est encodée par le gène *gfp* et contient 238 acides aminés pour une masse moléculaire d'environ 31 kDa. Sa structure est un tonneau β ayant un diamètre d'environ 30 Å, une longueur de 40 Å et constitué de 11 brins β (Phillips, 1997). (Figure I.16.)

Contrairement aux porines possédant également une structure en tonneau β , les deux extrémités du cylindre de la GFP sont fermées par des courtes sections d'hélices α et des loops. La GFP forme ainsi une sorte de boîte (β can) enfermant le chromophore procurant à la protéine sa fluorescence.

Le chromophore est formé par une modification post-traductionnelle cyclisant deux résidus se trouvant sur une hélice α localisée au centre du tonneau. Les deux résidus intervenant dans cette réaction de cyclisation sont la sérine 65 et la glycine 67 de la séquence primaire de la protéine (phe64-ser65-tyr66-gly67-val68-glu69). En plus de cette réaction de cyclisation, la tyrosine 66 subit une réaction de déshydrogénation par l'oxygène moléculaire qui nécessite donc des conditions aérobies.

La structure β can enfermant le chromophore lui procure une très grande stabilité face à la chaleur et aux dénaturants.

1.5.3. Mutagenèse de la *gfp*

La forme sauvage de la protéine GFP présente un pic d'absorption maximale (longueur d'onde d'excitation) à 395nm ainsi qu'un pic mineur à 470 nm, et sa longueur d'onde d'émission est de 510nm.

Bien que la GFP sauvage soit très stable et que son utilisation ne nécessite aucun cofacteur, elle présente néanmoins quelques inconvénients dont les deux suivants : (i) le spectre d'excitation de la GFP ne correspond pas aux longueurs d'onde d'excitation standard utilisées dans les techniques telles que le microscope confocale et le microscope à fluorescence ; (ii) la réaction de formation du chromophore est très lente (2 heures) et limite l'utilisation de la GFP sauvage comme protéine rapportrice dans des études de régulation de l'expression.

C'est notamment pour remédier à ces deux inconvénients que des mutants ponctuels de la GFP sauvage sont préférentiellement utilisés comme gènes rapporteurs. En effet, des mutations ponctuelles au niveau du chromophore amènent entre autres des variations dans les spectres d'émission et/ou d'absorption de la lumière par la protéine. Par exemple, chez le mutant *gfpmut3a* utilisé dans le cadre de ce mémoire, le résidu sérine 65 a été remplacé par une glycine et le résidu sérine 72 par une alanine (Cormack *et al.*, 1996). Ces substitutions permettent d'exciter la *gfpmut3a* à une longueur d'onde de 488nm. L'émission de la fluorescence se fait à une longueur d'onde oscillant entre 509 et 511nm et est jusqu'à 100 fois supérieure à celle de la GFP sauvage lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*. La formation du chromophore est également plus rapide (8 minutes).

Le protéine GFPmut3a sera donc notre outil principal durant ce mémoire en tant que protéine rapportrice et nous permettra d'étudier l'expression d'*omp2a* et d'*omp2b* chez *B.melitensis* 16M.

OBJECTIFS

2. Objectifs du travail

Au cours de ce mémoire, nous décidons d'aborder l'étude de la régulation génétique du locus *omp2* chez *B. melitensis*. Ce locus contient deux gènes, *omp2a* et *omp2b*, codant respectivement pour les porines, Omp2a et Omp2b. Ces protéines ont des activités pore-formatrice différentes. Une régulation dans l'expression de ces deux porines pourrait permettre à *Brucella* de varier sa perméabilité membranaire. Nous utiliserons comme outil génétique le gène rapporteur *gfpmut3a*. Les objectifs fixés au sein de ce travail peuvent se résumer en trois points:

- La construction de systèmes rapporteurs chez *B. melitensis* qui nous permettront de suivre la régulation de l'expression des deux gènes du locus *omp2* chez *B. melitensis*.

- La vérification de l'expression des deux gènes chez *B. melitensis* et l'analyse de la variation de leur expression au cours d'une infection en macrophages bovins et en cellules HeLa.

- L'étude des effets d'une production accrue des porines Omp2a et Omp2b sur la virulence de *B. melitensis* lors d'une infection en macrophages bovins.

RESULTATS ET
DISCUSSIONS

3. Résultats et discussions

3.1. Etude de la régulation du locus *omp2* à l'aide du gène rapporteur *gfpmut3a*

La régulation de l'expression des deux gènes *omp2a* et *omp2b* chez *B. melitensis* a été réalisée au moyen de deux systèmes rapporteurs, l'un pour étudier l'activité du promoteur du gène *omp2b* et l'autre pour étudier l'activité du promoteur potentiel du gène *omp2a*. Ces systèmes ont été construits en intégrant dans le génome de *B. melitensis* le gène rapporteur *gfpmut3a* en aval des deux promoteurs d'intérêts.

Deux plasmides, pTB2a et pTB2b, ont été construits afin d'intégrer le gène rapporteur dans le génome de *B. melitensis*. Cette intégration nécessitant une recombinaison homologe, la région située entre les deux ORF du locus *omp2* et contenant le promoteur d'*omp2b* ainsi que le promoteur potentiel d'*omp2a* a été amplifiée puis clonée dans un plasmide, pTB2, en amont du gène rapporteur *gfpmut3a*. La ligation de cette région a été réalisée dans les deux sens possible pour donner le plasmide pTB2b et pTB2a.

L'intégration du plasmide pTB2a a eu pour conséquence de placer le gène rapporteur *gfpmut3a* en aval du promoteur potentiel d'*omp2a* dans le génome de *B. melitensis* et l'intégration du plasmide pTB2b a eu pour conséquence de placer le gène rapporteur *gfpmut3a* en aval du promoteur d'*omp2b* dans le génome de *B. melitensis*.

Les plasmides pTB2a et pTB2b sont dérivés de deux autres plasmides, le pTB1 et le pTB2 dont les constructions sont décrites ci-dessous.

3.1.1. Constructions préliminaires : les plasmides pTB1 et pTB2

Le pTB1 est un plasmide dérivé du pBluescriptSK-oriT et du pFPV25 (Valdivia and Falkow, 1996). Le pFPV25 porte le gène *gfpmut3a* et le pBlueScriptSK-oriT est un vecteur répliquatif chez *E.coli* mais pas chez *Brucella*, ce qui en fait un vecteur suicide chez *Brucella*. Ce vecteur encode le gène de résistance à l'ampicilline, *bla* ou *AmpR*.

Le plasmide pFPV25 a été restreint par les deux enzymes *Bam*HI et *Pst*I pour libérer un fragment de 750bp contenant la séquence encodant la protéine GFP dépourvue de son promoteur. Ce fragment a été cloné en *Bam*HI/*Pst*I dans le plasmide pBluescriptSK-oriT en aval du promoteur du gène *lacZ* pour donner le pTB1.

Le pTB2 est un plasmide dérivé du pTB1. Il possède le gène de résistance à la kanamycine, *kanR*. Ce gène a été extrait du plasmide pUC4K (Pharmacia) par l'enzyme *Sal*I et, après purification, a été cloné au site *Sal*I du plasmide pTB1 pour donner le plasmide pTB2. (Thomas Brichet, mémoire 1997) (Figure III.1.)

3.1.2. Construction du plasmide pTB2b

La région contenant le promoteur du gène *omp2b* a été clonée en amont de l'ORF *gfpmut3a* dans le plasmide pTB2 (Benoît Parmentier DES 1998). Ce plasmide est nommé pTB2b et permet l'intégration du gène rapporteur en aval du promoteur *omp2b* dans le génome de *B. melitensis*.

La région se trouvant entre les deux ORF *omp2a* et *omp2b* du locus *omp2* et que nous appellerons dorénavant « la région intergénique » a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de *B. melitensis* par l'oligonucléotide RI s'hybridant sur les inverted repeat du locus *omp2*. Cette amorce possède à son extrémité 5' un site de restriction *Bam*HI qui a permis le clonage de la région intergénique en amont de l'ORF *gfpmut3a* du plasmide pTB2. Ainsi, le gène rapporteur *gfpmut3a* est, dans le plasmide pTB2b, sous la dépendance du promoteur d'*omp2b*. (Figure III.2.)

3.1.3. Construction du plasmide pTB2a

Nous avons commencé notre travail à ce stade par la construction du plasmide pTB2a. Ce plasmide contient l'ORF *gfpmut3a* sous le contrôle du promoteur potentiel d'*omp2a* et nous a permis d'intégrer le gène rapporteur en aval du promoteur potentiel d'*omp2a* dans le génome de *B. melitensis*.

La construction de ce plasmide a été réalisée en retournant la région intergénique du pTB2b. Cette région intergénique a été restreinte du plasmide pTB2b par l'enzyme *Bam*HI puis religuée avec la matrice plasmidique du pTB2b résultant de cette restriction. Cette ligation, réalisée par la T4 ligase, peut s'effectuer dans les deux sens possibles pour redonner le plasmide pTB2b ou donner le plasmide pTB2a. (figure III.2) Cette ligation a été réalisée après une purification par précipitation au phénol/chloroforme de l'ADN correspondant à la région intergénique et à la matrice plasmidique pTB2b. Des *E.coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont été transformées avec le produit de ligation puis cultivées sur un milieu sélectif contenant les antibiotiques ampicilline et kanamycine. Des minipréparations d'ADN plasmidique ont été réalisées sur 24 colonies issues de la transformation.

Une première restriction diagnostique *Bam*HI sur les préparations d'ADN plasmidique nous a permis de sélectionner 4 clones, les clones 1, 4, 7 et 19, chez lesquels la matrice plasmidique ne s'est pas refermée sur elle-même lors de la ligation.

Afin de vérifier le sens du clonage de la région intergénique, nous avons effectué des réactions PCR diagnostiques avec les oligonucléotides M13R, F et promo2b en prenant comme référence le plasmide pTB2b afin de comparer les différents profils des produits d'amplification PCR.

Les deux primers M13R et F amplifient la région intergénique du pTB2b.(Figure III.3.) L'amorce M13R s'hybride sur le site multiple de clonage du plasmide pTB2b juste en amont de la région intergénique et l'amorce F sur l'extrémité 3' de la région intergénique. Sur base des résultats obtenus lors de cette amplification, nous pouvons déduire grâce au contrôle pTB2b que dans les trois clones, 1, 7 et 19, la ligation s'est faite dans le même sens que

pTB2b. Par contre dans le cas du clone 4 il n'y a pas eu d'amplification avec les amorces M13R et F.

Nous avons effectué d'autres PCR avec les amorces M13R et promo2b. L'oligonucléotide promo2b s'hybride sur la région intergénique et permet avec le M13R l'amplification d'un fragment d'environ 500bp sur le pTB2a seulement. En effet dans ce plasmide, la région intergénique est retournée par rapport au pTB2b, et les deux oligonucléotides s'hybrident sur des brins opposés, permettant une amplification PCR. Il y a eu amplification dans la cas du clone 4. (Figure III.3.)

Pour confirmation, le fragment amplifié par les oligonucléotides M13R et Promo2b a été séquencé à partir de l'oligonucléotide M13R. Par la suite, les deux plasmides pTB2a et pTB2b ont été séquencés à partir de l'oligonucléotide M13R et des alignements de séquence avec la région intergénique du génome de *B. melitensis* nous ont permis de confirmer le sens de l'insert dans les deux ligations.

3.1.4. Vérification de la fonctionnalité du gène rapporteur *gfpmut3a* chez *E.coli* en microscopie et en fluorimétrie

Avant d'étudier la régulation des deux gènes *omp2a* et *omp2b* chez *B. melitensis*, nous avons vérifié la fonctionnalité du gène rapporteur *gfpmut3a* chez *E. coli* S17.

E. coli S17 a pour cela été transformé d'une part par les plasmides pTB2a et pTB2b et d'autres part par différents plasmides contrôles, le plasmide pTB2, le plasmide pBBR1mcs4*gfp* et le plasmide pBBR1mcs4. Ce dernier est un plasmide à faible taux de répllication chez *E. coli* et chez *Brucella* qui possède le gène de résistance à l'ampicilline, *bla*. Les deux contrôles positifs sont les plasmides pTB2 décrit précédemment et pBBR1mcs4*gfp*. Dans le plasmide pBBR1mcs4*gfp*, le gène rapporteur a été cloné en amont du promoteur du gène *lacZ*.

Les clones d'*E. coli* S17 ont été observés en microscopie à fluorescence. Des bactéries fluorescentes vertes produisant donc la protéine GFP ont été observées chez les clones *E. coli* S17 pTB2, *E. coli* S17 pBBR1mcs4gfp ainsi que *E. coli* S17 pTB2b. Les deux autres clones *E. coli* S17pTB2a et *E. coli* S17pBBR1mcs4 n'émettaient pas de fluorescence. (tableau III.1.) (photos non montrées)

La fluorescence émise par les différents clones d'*E. coli* a été quantifiée au moyen d'un fluorimètre. Chaque clone d'*E. coli* a été cultivé dans trois milieux liquides différents : (i) LB ; (ii) LB+glucose 2% et (iii) LB+IPTG 1mM. L'IPTG est un inducteur du promoteur du gène *lacZ* et le glucose réprime ce même promoteur.

Dans le cas du contrôle négatif *E. coli* S17 pBBR1mcs4, l'émission de fluorescence mesurée dans l'unité RFU (Relative Fluorescent unit) est inférieure à 10000 quelque soit les milieux de culture utilisés. Ce contrôle négatif nous a permis de déterminer un seuil d'émission de fluorescence à 9500 RFU. (Figure III.4)

Le contrôle positif *E. coli* S17 pBBR1mcs4gfp émet plus de fluorescence lorsque le clone est cultivé dans un milieu contenant de l'IPTG par rapport au milieu LB seul. Lorsqu'il est cultivé en présence de glucose, le promoteur du gène *lacZ* est réprimé et la fluorescence chute sous 10000. L'autre contrôle positif *E. coli* S17 pTB2 émet plus de lumière fluorescente qu'*E. coli* S17 pBBR1mcs4gfp. Le plasmide pTB2 est un plasmide à haut taux de réplication (plusieurs centaines de copies par bactérie) et le pBBR1mcs4gfp est un plasmide à faible taux de réplication(environ 25 copies par bactérie) ce qui explique la quantité différente de GFP produite.

Le clone *E. coli* S17 pTB2a, quelque soit le milieu de culture, n'exprime pas le gène rapporteur *gfpmut3a*. Dans ce dernier clone, le promoteur du gène *lacZ* et le promoteur potentiel du gène *omp2a* sont inactifs.

Le résultat obtenu dans le cas du clone *E. coli* S17 pTB2b ne nous apporte pas d'information quant à l'activité du promoteur du gène *omp2b*. En effet, lorsque du glucose est ajouté au milieu LB, il n'y a pas production de GFP. Nous ne pouvons pas dire si la

production de la GFP dans les deux milieux sans glucose est due à l'activité du promoteur du gène *lacZ* ou à l'activité du promoteur du gène *omp2b*.

En effet, le promoteur du gène *omp2b* est actif chez *E. coli* (Ficht *et al.*, 1989). Or, ces données de fluorimétrie nous indique que ce promoteur tout comme le promoteur du gène *lacZ* sont inactifs en présence de glucose.

Dans le cas du clone *E. coli* S17 pTB2a, l'activité du promoteur du gène *lacZ* est nul dans les trois milieux. Cela suggère que la région intergénique se trouvant entre le promoteur *lacZ* et le gène rapporteur dans les plasmides pTB2a et pTB2b pourrait perturber l'activité du promoteur *lacZ*.

Nous pouvons conclure de ces observations que la protéine GFP est fonctionnelle mais l'étude de l'activité du promoteur du gène *omp2b* et du promoteur potentiel d'*omp2a* par le système rapporteur *gfpmut3a* chez *E. coli* aurait dû être abordée avec d'autres plasmides dans lesquels la région intergénique n'aurait pas été cloné en aval d'un promoteur *lacZ*. Le but de l'utilisation des plasmides pTB2a et pTB2b dans ce travail étant d'intégrer le gène rapporteur *gfpmut3a* dans le génome de *B. melitensis*, nous n'avons pas réalisé ces autres constructions.

3.1.5. Intégration des plasmides pTB2a et pTB2b dans le génome de *B. melitensis* 16M

La régulation de l'expression des deux gènes *omp2a* et *omp2b* chez *B. melitensis* in vitro, puis lors d'une infection en macrophages bovins et en cellules HeLa a pu être étudiée grâce à l'intégration des plasmides pTB2a ou pTB2b dans le génome de la bactérie. Pour construire ces systèmes rapporteurs, des conjugaisons entre les bactéries donneuses *E. coli* S17 et *B. melitensis* ont été réalisées. Les différents clones d'*E. coli* S17 utilisés pour ces conjugaisons sont les suivants : *E. coli* S17 pTB2a ; *E. coli* S17 pTB2b.

3.1.5.1. Sélection des intégrants

Au cours de la conjugaison, le plasmide est mobilisé de la souche d'*E.coli* S17 donneuse à *B. melitensis* résistante à l'acide nalidixique (Nal^R). Ce transfert latéral de matériel génétique est réalisé grâce aux protéines encodées par le plasmide RP4 intégré dans le génome de la bactérie donneuse. Les plasmides pTB2a et pTB2b étant des plasmides non répliatifs chez *B.melitensis*, le seul moyen d'être maintenu dans cette souche est leur intégration dans le génome de la bactérie. Cette intégration se fait par recombinaison homologue entre la région intergénique des plasmides et sa copie chromosomique dans le locus *omp2* du génome de *B. melitensis*. Suite à l'intégration, le génome intégrant ne contient qu'une seule copie du plasmide intégré. La souche contenant le plasmide pTB2a intégré dans son génome est nommée *B. melitensis 2a* et celle contenant le plasmide pTB2b dans son génome, *B. melitensis 2b*.(Figure III.5.).

Après la conjugaison, les clones transconjugants ayant intégré le plasmide pTB2a ou pTB2b ont été sélectionnés sur un milieu contenant l'acide nalidixique pour *Brucella*, l'ampicilline et la kanamycine pour les intégrants.

Cette intégration a eu pour conséquence de placer le gène rapporteur *gfpmut3a* en aval du promoteur d'*omp2b* dans le cas de l'intégration du pTB2b dans le locus *omp2* ou en aval du promoteur potentiel d'*omp2a* dans le locus *omp2* dans le cas de l'intégration du pTB2a.

3.1.5.2. Vérification de l'intégration des plasmides par Southern blot

L'intégration des plasmides pTB2a et pTB2b dans le génome de *B. melitensis* a été vérifiée par un Southern blot. Le Southern blot est une méthode combinant la propriété d'hybridation des acides nucléiques d'une sonde marquée et la restriction d'ADN pour retrouver un fragment de restriction donné dans un mélange complexe de fragments d'ADN.

L'ADN génomique des *B. melitensis* transconjugantes a été restreint par l'enzyme *EcoRI*. Cette restriction engendre entre autre un fragment contenant le gène rapporteur *gfpmut3a* chez les transconjugants *B. melitensis 2a* et *B. melitensis 2b*. Dans le cas de l'intégration du

plasmide pTB2a, ce fragment a une taille de 2249bp et dans le cas de l'intégration du plasmide pTB2b, il mesure 1900bp. Afin de retrouver ce fragment parmi le mélange complexe engendré par la restriction *EcoRI* de l'ADN génomique, une sonde radiomarquée correspondant au gène rapporteur *gfpmut3a* a été utilisée. Les contrôles négatifs sont *B. melitensis* wild type et *B. melitensis* contenant le plasmide pBBR1mcs4 restreint par *EcoRI*. *B. melitensis* contenant le plasmide pBBR1mcs4*gfp* a été utilisé comme contrôle positif. Dans ce contrôle, le fragment allumé par la sonde est le plasmide linéarisé par la restriction *EcoRI* ayant une taille de 5689bp.

A partir du film autoradiographique du Southern blot nous avons pu déduire que les plasmides pTB2a et pTB2b ont été intégrés dans le génome de *B. melitensis*. (Figure III.6.)

3.1.5.3. Etude de la variation de l'expression de la *gfpmut3a* chez *B. melitensis* en microscopie à fluorescence

Le système rapporteur *gfpmut3a* construit lors de l'intégration des plasmides pTB2a et pTB2b dans le génome de *Brucella* va nous permettre de suivre l'activité du promoteur *omp2b* dans le clone *B. melitensis 2b*, et l'activité du promoteur potentiel *omp2a* dans le clone *B. melitensis 2a*.

Après avoir inactivé les *Brucella* au moyen d'une solution de paraformaldéhyde 3%, nous avons observé les bactéries fixées sur un coverslip au microscope à fluorescence. Le paraformaldéhyde est un polymère qui effectue des pontages entre les groupements amines et carboxyles sans affecter la stabilité de la protéine GFP. Nous avons observé l'émission de lumière fluorescente chez *B. melitensis 2b* confirmant l'activité du promoteur d'*omp2b*. Par contre, le clone intégrant *B. melitensis 2a* ne produit pas la protéine GFP. Nous ne pouvons cependant pas exclure le fait que le gène *omp2a* puisse être activé à un moment particulier du cycle de vie de la bactérie.

Après avoir inactivé les bactéries pathogènes en suspension avec du formol 5% ou du paraformaldéhyde 3%, nous avons mesuré l'émission de fluorescence des cultures liquides

des différents clones transconjugants de *Brucella* excité par une longueur d'onde de 485 nm au fluorimètre. Ces mesures ne nous ont rien révélé car la quantité de lumière émise par le contrôle positif était la même que pour le contrôle négatif. Nous avons réalisé les mêmes processus d'inactivation chez *E.coli* et avons obtenu les mêmes problèmes quant à la méthode d'inactivation des cellules en suspension et l'émission de la fluorescence par la GFP. Ce problème d'inactivation de la protéine GFP par le formol et la paraformaldéhyde dans les mesures effectuées par le fluorimètre est peut-être dû au fait que les bactéries sont en suspension alors que lors de l'observation au microscope, l'inactivation est effectuée sur les bactéries adhérant à des coverslips.

Les systèmes rapporteurs *B. melitensis 2a* et *B. melitensis 2b* nous ont permis de confirmer l'activité du promoteur d'*omp2b* et également le fait que le promoteur potentiel d'*omp2a* ne soit pas actif dans les conditions de cultures utilisées.

Jusqu'à présent, l'activité du promoteur *omp2b* a été démontrée par le gène rapporteur *lacZ* chez *E. coli* (Ficht *et al.*, 1989). Chez *B. abortus*, des Western blots réalisés sur des extraits protéiques totaux ont révélé la présence d'une protéine Omp2 de 36 kDa (Ficht *et al.*, 1988). Notre résultat permet de confirmer que la porine exprimée est bien l'Omp2b.

Pour vérifier en partie l'hypothèse d'une possible activation du promoteur potentiel du gène *omp2a* durant le cycle de vie de *Brucella*, nous avons infecté des cellules eucaryotes avec les clones de *Brucella* possédant le système rapporteur *gfpmut3a*. En effet, L'Omp2a permet une meilleure diffusion et son expression dans le milieu intracellulaire des cellules eucaryotes pourrait être bénéfique pour *B. melitensis*.

3.1.6. Régulation de l'expression des gènes du locus *omp2* de

B. melitensis lors d'infections de macrophages et de cellules

HeLa

Pour comprendre comment *Brucella* résiste à la destruction à l'intérieur des cellules phagocytaires, l'identification des produits de gènes réprimés ou activés durant la phase intracellulaire de la bactérie et les mécanismes de régulation de ceux-ci est importante.

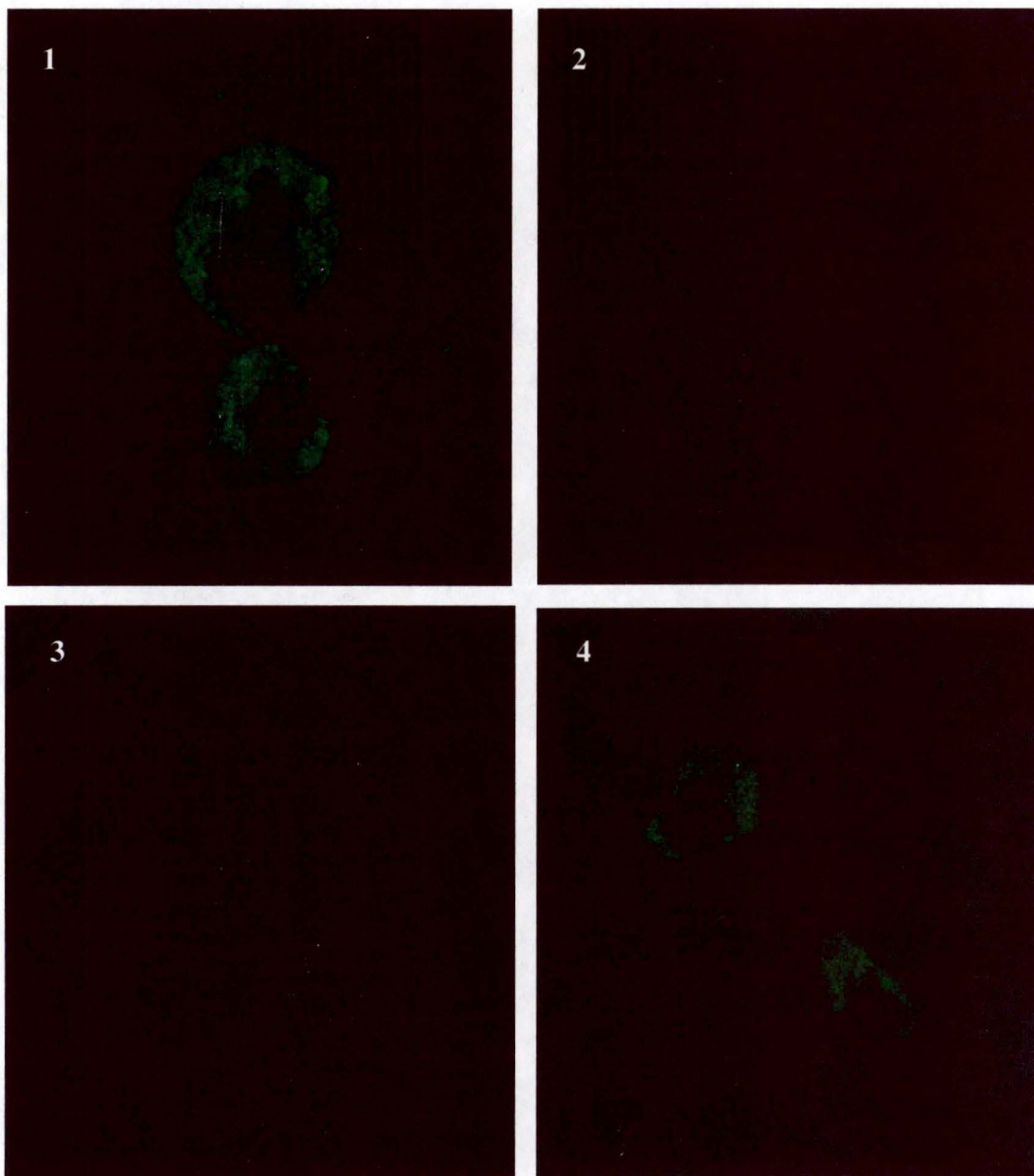


Figure III. 8 : Observation en microscopie confocale des cellules HeLa infectées par les souches suivantes

	<u>grossissements:</u>
1. <i>B. melitensis</i> 16M/ pBBR1mcs4gfp	100x
2. <i>B. melitensis</i> 16M/pBBR1mcs4	40X
3. <i>B. melitensis</i> 16M/2a	40X
4. <i>B. melitensis</i> 16M/2b	100X

Un des objectifs de ce travail étant de déterminer si l'expression des gènes encodant les porines Omp2a et Omp2b est régulée durant la croissance intracellulaire du cycle d'infection de *Brucella*, des infections de macrophages bovins et de cellules HeLa avec les clones transconjugants de *B. melitensis* ont été réalisées. En effet, dans l'environnement intracellulaire des cellules eucaryotes, *Brucella* pourrait faire face à des variations environnementales en régulant le niveau de l'expression de l'une ou l'autre porine. La perméabilité de l'Omp2a étant supérieure à celle de l'Omp2b, l'expression de l'Omp2a pourrait favoriser la survie de la bactérie dans un milieu où la concentration en nutriments est plus faible.

Les cellules eucaryotes infectées ont été observées au microscope à fluorescence ainsi qu'au microscope confocal à différents temps post infection : 4, 8, 24 et 48 heures. Aucun clones émettant de la fluorescence n'a été détecté aux points de contrôle 4, 8 et 24 heures.

48 heures après l'infection, les bactéries s'étant répliquées dans une vacuole de réplication, les cellules eucaryotes infectées par les clones *B. melitensis 2b* et *B. melitensis* PBBR1mcs4*gfp* émettaient de la lumière fluorescente. Le promoteur du gène *omp2b* est donc actif dans l'environnement intracellulaire des cellules eucaryotes. Par contre dans le cas de l'infection des cellules eucaryotes par le clone *B. melitensis 2a*, aucune fluorescence n'a été observée. (Figure III. 7 et III.8) Le promoteur potentiel d'*omp2a* n'est pas actif dans l'environnement intracellulaire des cellules eucaryotes 48 heures après l'infection.

3.2. Etude de l'effet de l'expression constitutive des ORF du locus *omp2* sur la virulence de *B.melitensis*

Afin d'établir des liens, s'ils existent, entre la virulence et l'expression des porines, nous avons réalisé une étude préliminaire sur les effets d'une expression accrue des porines Omp2a et Omp2b chez *B. melitensis* lors d'une infection en macrophages.

Pour observer les effets d'une expression constitutive des porines Omp2a et Omp2b ainsi que de l'*orfC* sur la virulence de la bactérie, nous avons amplifié les trois ORF du locus *omp2* de *B. melitensis* pour les cloner en aval du promoteur du gène *lacZ* dans un plasmide pBBR1mcs1. Ce plasmide est répliquatif chez *Brucella* et possède le gène de résistance au chloremphénicol.

L'amplification de ces trois fragments d'ADN a été réalisée en utilisant différents oligonucléotides : 2a5' et 2a3' pour amplifier *omp2a* ; 2b5' et 2b3' pour amplifier *omp2b* ; *orfCF* et 2b5' pour amplifier l'*orfC*. (Figure III. 9.) La polymérase que nous avons utilisé pour amplifier ces ORFs est la Pwo qui possède une activité proof reading, et effectue donc moins d'erreurs que la Taq dépourvue de cette activité. De plus la polymérase Pwo n'ajoute pas de dATP à la fin du fragment polymérisé.

Le plasmide pBBR1mcs1, a été restreint par l'enzyme *EcoRV*. La matrice ainsi obtenue a été déphosphorylée par la shrimp phosphatase afin de diminuer le taux de religation du plasmide sur lui-même. La ligation entre la matrice et les inserts à bouts francs a été réalisée par la T4 ligase. Des *E. coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont été transformées avec le produit de ligation puis cultivées sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique chloremphénicol. Le contrôle négatif utilisé est le pBBR1mcs1 linéarisé par la restriction *EcoRV* et déphosphorylé par la shrimp phosphatase à l'extrémité 5'.

La construction de ces plasmides a été abandonnée car différents problèmes ont été rencontrés durant les étapes de cette construction : (i) les amplifications PCR réalisées

plusieurs fois en utilisant différentes conditions d'amplification étaient aspécifiques pour certains oligonucléotides ce qui rendait, entre autre, l'extraction de l'ADN du gel difficile ; (ii) le contrôle négatif du produit de ligation, pBBR1mcs1 linéarisé et déphosphorylé, poussait sur le milieu sélectif signifiant que le plasmide n'avait pas été déphosphorylé et s'était refermé sur lui-même.

Une solution alternative a néanmoins été utilisée afin d'aborder l'étude de l'influence potentielle d'une production accrue des porines Omp2a et Omp2b chez *B. melitensis*. Nous avons utilisé des plasmides multicopy pBB2a et pBB2b.

3.2.1. Les plasmides pBB2a et pBB2b

Le pBB2b est un pBBR1mcs4 dans lequel le gène *omp2b* a été cloné dans le site *EcoRV*. Ce gène a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *B. melitensis* par deux amorces, promo2b et 2b3', avec la polymérase Pwo. Ce plasmide permet l'expression de l'Omp2b sous l'effet de son propre promoteur.

Le pBB2a a été construit à partir du pBB2b et contient l'ORF *omp2a* sous la dépendance du promoteur d'*omp2b*. Le fragment contenant le gène *omp2a* a été amplifié à partir du génome de *B. melitensis* par les deux amorces 2a3'-*HindIII* et 2a5' et après amplification a été restreint par *NcoI*. Un des deux fragments obtenu par cette restriction et contenant l'extrémité 3' du gène *omp2a* a été récupéré pour la ligation; l'autre fragment, contenant la répétition inverse commune aux deux gènes, est identique entre *omp2b* et *omp2a*. Le plasmide pBB2b a été restreint par l'enzyme *HindIII*. La matrice plasmidique linéarisée ainsi obtenue a été restreinte par *NcoI*. La ligation a ensuite été réalisée entre la matrice plasmidique et le produit de restriction *NcoI* contenant l'ORF *omp2a*. (Figure III.10)

Par rapport aux constructions désirées initialement, ces deux plasmides comportent néanmoins des inconvénients : les deux ORF *omp2a* et *omp2b* sont contrôlées par le promoteur d'*omp2b* au lieu d'être contrôlées par le promoteur *lacZ*. De plus, dans le plasmide pBB2b,

l'*orfC*, anticomplémentaire de l'ORF *omp2b*, se trouve en aval du promoteur du gène *lacZ* et son expression constitutive pourrait avoir un effet sur la régulation post transcriptionnelle d'*omp2b* ou directement sur la virulence de *Brucella*.

Des transferts conjugatifs entre des *E. coli* S17 transformées par les plasmides pBB2a et pBB2b et des *B. melitensis* ont été réalisés. Les clones transconjugants ont été sélectionnés sur un milieu contenant l'acide nalidixique et l'ampicilline.

3.2.2. Vérification de la surproduction des porines par les plasmides pBB2a et pBB2b chez *B. melitensis*

L'expression des porines Omp2a et Omp2b par les plasmides pBB2a et pBB2b chez *B. melitensis* a été vérifié en réalisant un Western blot avec les souches *B. melitensis* pBB2a, *B. melitensis* pBB2b et *B. melitensis* wt.

Le Western blot est une méthode combinant la spécificité d'un anticorps et l'électrophorèse en gel SDS PAGE pour retrouver une protéine dans un mélange complexe. Pour ce Western blot, nous avons utilisé un anticorps polyclonal, 8D8 (A63/08D08/C07) reconnaissant à la fois l'Omp2a et l'Omp2b. Ce Western a confirmé la production accrue de la porine Omp2b dans le clone *B. melitensis* pBB2b ainsi que la production de la porine Omp2a dans le clone *B. melitensis* pBB2a en utilisant comme contrôle *B. melitensis* wt. Cependant, la production de la porine Omp2a sous l'effet du promoteur du gène *omp2b* est moindre que la production de la porine Omp2b par le même promoteur. (figure III.11). L'ARN messager de la porine Omp2a serait peut-être peu stable ce qui expliquerait une moindre production par rapport à l'Omp2b par le même promoteur.

3.2.3. Infection de macrophages par les clones *B. melitensis* pBB2a, *B. melitensis* pBB2b et *B. melitensis*

Des macrophages bovins ont été infectés par les trois souches *B. melitensis* pBB2a, *B. melitensis* pBB2b et *B. melitensis* wt afin de savoir si une quantité plus importante de porines dans la membrane externe de *Brucella* pourrait avoir une influence sur la virulence de la bactérie. Pour connaître le nombre de bactéries engagées dans l'infection, nous avons calculé les doses infectantes des différentes souches, les CFU (Colony Forming Unit). Les cellules eucaryotes ont été infectées par les bactéries dans des plaques multipuits. Douze puits ont été utilisés pour chaque souche. Une heure après le début de l'infection, les bactéries extracellulaires sont éliminées au moyen de l'antibiotique gentamycine. 48 heures après le début de l'infection, les cellules eucaryotes sont lysées et les bactéries intracellulaires sont récupérées. Différentes dilutions sont réalisées sur les suspensions bactériennes et chaque dilution est étalée sur boîte 2YT pour comptabiliser trois jours plus tard les CFU. En comparant les CFU des bactéries récupérées avec les doses infectantes, nous pouvons tirer des résultats préliminaires quant à l'atténuation des différentes souches en macrophages. Une différence de virulence est observée entre les trois souches. (Figure III. 12)

Pour déterminer si ces différences sont significatives, nous avons réalisé un test ANOVA 2 hiérarchisé mixte. Les deux critères de ce test sont le critère fixe ; les souches, et le critère variable hiérarchisé au critère souches, les lignes des puits dans lesquelles ont été réalisées les infections. Ce test nous permet d'affirmer que la différence entre les moyennes des trois souches est significative ($p \leq 0,05$). Une différence significative est également observée entre les différentes lignes. Des tests de contrastes orthogonaux ont révélé une différence significative entre les deux souches possédant l'un ou l'autre plasmide et le souche sauvage. (cfr annexe 1 pour détails du test).

Cette première expérience d'infection est préliminaire et nous permet de conclure qu'il y a un effet de la surproduction des porines sur la virulence de la souche *B. melitensis*.

Grâce au Western blot, nous savons que la quantité de porines Omp2b de la souche *B. melitensis* pBB2b est plus importante que celle des porines Omp2a dans l'autre souche contenant le plasmide pBB2a. Néanmoins, la surproduction de l'Omp2a a un effet sur la capacité de survie de la bactérie dans le macrophage.

La souche *B. melitensis* utilisée lors de ce mémoire est la souche de référence utilisée pour l'étude de la virulence. Cependant, des immuno empreintes réalisées sur la souche de *B. melitensis* rough B115 au moyen d'anticorps monoclonaux dirigés contre les OMP de *Brucella* (Cloekaert *et al.*, 1990) n'ont pas révélé les protéines à activité pore-formatrice du groupe 2 chez cette souche (Gallot-Lavallee *et al.*, 1995). En effet, les protéines du groupe 2 sont des OMP majeures chez toutes les espèces de *Brucella* excepté chez la souche *B. melitensis*. Il serait donc utile de recommencer cette expérience afin de préciser les résultats préliminaires décrits ci-dessus, mais également de réaliser ces infections avec d'autres souches où les protéines du groupe 2 sont majeures.

CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

4. Conclusions et perspectives

Durant ce travail, nous avons abordé l'étude de l'expression des deux gènes, *omp2a* et *omp2b*, encodant respectivement les porines Omp2a et Omp2b chez *B. melitensis*. La présence conservée des deux gènes, encodant des porines fonctionnellement différentes, Omp2a et Omp2b, et la régulation fine de l'expression des porines chez d'autres bactéries nous suggère l'existence d'un système de régulation de l'expression de ces gènes chez *Brucella*.

La régulation des porines pourrait être mise en relation avec la capacité de l'organisme à survivre dans les cellules eucaryotes. En effet, en modulant l'expression de ses porines, une bactérie peut faire varier sa perméabilité membranaire. Cette perméabilité dépend en effet des propriétés des pores formés par les porines et par l'abondance de celles-ci. La bactérie peut ainsi s'adapter à différentes conditions environnementales. Le meilleur exemple est la régulation de l'expression des porines majeures OmpC et OmpF par un système à deux composantes chez *E. coli* en fonction des conditions osmotiques du milieu.

Nous avons posé dès le départ de notre travail l'hypothèse que la bactérie module l'expression des gènes de porines pour faire varier la perméabilité membranaire afin de soit se protéger des substances toxiques, soit d'augmenter sa perméabilité vis à vis des nutriments vitaux. Dans le cas des porines de *Brucella*, on sait que l'Omp2a est plus perméable que l'Omp2b vis à vis des sucres mais la sélectivité que possède l'Omp2a et l'Omp2b pour les ions n'est pas bien connue.

Pour étudier l'expression des deux porines et mettre à jour une éventuelle régulation chez *Brucella*, nous avons construit un système rapporteur basé sur la protéine GFP. Ce système rapporteur *gfp*, intégré dans le génome de *Brucella* en amont des promoteurs de porines nous a permis d'élucider l'expression des porines dans des conditions *in vitro*. Nous avons ainsi montré que le promoteur du gène *omp2b* est actif chez *B. melitensis* et que le

promoteur potentiel du gène *omp2a* n'est pas actif dans les conditions de culture utilisées. Il n'est cependant pas exclu que ce promoteur soit activé à un moment particulier du cycle de vie de *Brucella*.

Afin de savoir si le gène *omp2a* est activé lors de la croissance intracellulaire de la bactérie, nous avons réalisé des infections en cellules HeLa et en lignée de macrophages bovins avec les mêmes souches de *Brucella*, possédant le rapporteur *gfp*. L'activité du promoteur potentiel *omp2a* n'a pas non plus été détectée dans les conditions intracellulaires. L'expression d'*omp2b* ne semble pas non plus avoir diminué.

Lors de ce travail nous nous sommes également proposé d'aborder les effets potentiels de la surexpression constitutive des porines Omp2a et Omp2b sur la virulence de *B. melitensis*. Cette étude préliminaire indique qu'une production accrue de l'Omp2a ou de l'Omp2b dans des souches de *B. melitensis* par des plasmides avait un effet significatif sur la survie en macrophages par rapport à la souche sauvage de *B. melitensis*. La surexpression de l'Omp2b et, dans la moindre mesure, de l'Omp2a entraîne une faible atténuation de la virulence de la bactérie lors d'infections en macrophages bovins.

Afin de poursuivre l'étude de la régulation et de savoir si certaines conditions environnementales pourraient activer l'expression d'*omp2a*, l'expression de *gfp* dans l'intégrant cultivés dans différentes conditions de culture mimant les stress rencontrés dans le milieu intracellulaire des cellules phagocytaires devraient être réalisées. Les milieux intéressants à tester seraient des milieux minimum ainsi que des milieux de différents pH et des milieux de diverses osmolarités.

La structure du locus *omp2* contient deux IR (répétitions inverses) bordant la région intergénique contenant le promoteur actif d'*omp2b*. Chez *Salmonella*, des recombinaisons spécifiques reconnaissant des IR permettent d'inverser la région comprise entre ces deux IR pour aligner un promoteur actif avec une ORF codant pour un gène flagellaire. Cette ORF est alors exprimée à la place d'un autre gène flagellaire. Si, dans le cas du locus *omp2* de *Brucella*, la région se trouvant entre les deux IR était inversée, le gène *omp2a* serait sous le contrôle du promoteur *omp2b* et pourrait être exprimée à la place d'*omp2b*. Aucune séquence

consensus claire de promoteur n'ayant été décrite dans la région située entre les deux ORFs du locus, mais l'*omp2b* possédant visiblement un promoteur actif, une possibilité de régulation d'expression par inversion de la région intergénique au moyen de recombinaisons spécifiques des IR du locus pourrait être réalisée chez *Brucella*. Pour vérifier cette éventuelle hypothèse, un gène de résistance à un antibiotique pourrait être cloné à la place de l'ORF *omp2a* juste en aval de l'IR. Cet antibiotique permettrait de sélectionner les bactéries au sein d'une culture de *Brucella* chez lesquelles une inversion de la région intergénique aurait eu lieu. Un Southern blot permettrait ensuite de vérifier que l'inversion de la région est responsable de l'acquisition de la résistance.

Afin d'aborder l'étude de l'implication des porines dans la virulence de *Brucella*, le clonage des trois ORFs du locus sous la dépendance de promoteur de forces différentes nous permettrait de mieux cerner quelles sont les effets d'une surexpression des porines ou de l'*orfC* sur la virulence de la bactérie. Une autre manière d'aborder l'implication des porines *Omp2a* et *Omp2b* dans la virulence de *B. melitensis* serait de déléter les deux gènes encodant pour ces protéines afin de vérifier si ceux-ci sont essentiels pour la mise en place de l'infection.

Une troisième ORF, l'*orfC*, dont la fonction est encore inconnue, est décrite dans le locus *omp2* et pourrait encoder une protéine d'environ 350 acides aminés. Un Northern blot a été réalisé au laboratoire sur l'ARN de *B. abortus* en utilisant une sonde à ARN correspondant à l'*orfC*. L'ARN messager porteur de l'*orfC* n'a pas été détecté chez *B. abortus in vitro*. Cependant il est possible que le gène exprimant l'*orfC* soit activé dans d'autres conditions, comme les conditions intracellulaires. Cette ORF étant anticcomplémentaire d'*omp2b*, l'ARN messager de l'*orfC* est un ARN antisens de celui d'*omp2b* et pourrait être impliqué dans la régulation traductionnelle d'*omp2b*. Pour investiguer le rôle de cette ORF et savoir si elle est exprimée sous différentes conditions de culture et si elle pourrait avoir un rôle à jouer dans la survie de *Brucella* en milieu intracellulaire, le clonage de la région directement en amont d'*orfC* dans un plasmide en amont du gène rapporteur *gfpmut3a* est à envisager.

Nous avons donc abordé durant ce travail l'étude de la régulation de deux gènes encore très peu connue chez *Brucella*. Différents systèmes de régulateurs à deux composantes ont été récemment identifiés chez *Brucella*, notamment *CtrA*, mais les gènes régulés par ces systèmes sont encore peu connus. De plus, de nombreux gènes de virulence ont été mis en évidence et savoir comment ceux-ci sont régulés est une des étapes qui suit leur identification. Nous avons montré dans ce travail que *gfp* est un bon rapporteur de l'expression de gènes de *Brucella* en conditions intracellulaires. Au delà de la régulation des porines, cette observation conduit donc à des perspectives intéressantes dans le cadre de l'étude de la régulation de gènes de virulence de *Brucella*.

MATERIELS ET
METHODES

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériels

5.1.1. Solutions et milieux

5.1.1.1. Solutions d'antibiotiques et autres

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale
Acide nalidixique / Nal	NaOH 0,2N	25mg/ml	25µg/ml
Kanamycine / Kan	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Ampicilline / Amp	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Streptomycine/ Sm	H ₂ O	10mg/ml	10µg/ml
Chloremphénicol / Cm	EtOH 100%	30mg/ml	10µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside/ IPTG	H ₂ O	1M	1mM

5.1.1.2. Milieux de culture

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

-Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL) 1g/100ml

-NaCl 0,5g/100ml

-Yeast extract 0,5g/100ml

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

-Agar 1,5% si l'on désire du LB solide.

Le milieu est refroidi à 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

Milieus riches pour *Brucella*

Le milieu 2YT

Ce milieu a la même composition de base que le LB mais la concentration en Yeast extract est 2 fois plus élevée.

- NaCl 0,5g/100ml
- Yeast Extract 1g/100ml
- Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL) 1g/100ml
- Agar 2g/100ml si l'on désire du 2YT solide

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C

Le milieu TSAYE

- Tryptic soy agar 40g/l
- Yeast extract 0,1g/100ml

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

5.1.2. Souches bactériennes et plasmides

5.1.2.1. Souches bactériennes

E.coli DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation pas divers plasmides ou produits de ligation, dans les différentes étapes de clonage.

Son génotype est le suivant : F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ.

E.coli S17

La souche d'*E.coli* S17 est résistante à la streptomycine (Sm^R), septinomycine (Sp^R) et la triméthoprim (Tp^R). Cette souche d'*E.coli* possède notamment les caractéristiques d'intérêt suivantes :

RP4⁺ : l'intégration du plasmide RP4 dans le chromosome bactérien permet le transfert conjugatif d'un plasmide mobilisable (contenant une origine de transfert) de la bactérie S17 vers une bactérie receveuse.

λpir: la bactérie produit la protéine π qui permet la répllication de tout plasmide possédant l'origine de répllication ori R6K.

Génotype : (*recA thi pro hsdR*^{M+} RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenised with λpir phage)

Brucella sp

La souche de *B. melitensis* 16M est représentative de l'espèce *B. melitensis*. *B. melitensis* 16M est une souche de phénotype lisse, l'agglutination se produit avec un anti-sérum M. Cette souche est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal^R) n° ATCC 23456, Docteur J.-M. Verger, INRA, Tours, France.

5.1.2.2. Plasmides

pBluescript SK-oriT

Le plasmide pBluescript SK-oriT (Stratagène) est un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 3,17Kb. Il porte une origine de répllication pour *E.coli* (ColEI oriI) et l'origine de répllication phagienne fl a été remplacée par un fragment contenant la même origine de répllication fl ainsi que l'origine de transfert (oriT) du plasmide RK2. Il porte aussi le gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline, afin de sélectionner les clones transformants. Il possède une série de sites de restriction uniques (MCS : multiple cloning sites). Ce MCS est inclu dans le gène *lacZ*.

pFPV25

Le plasmide pFPV25 contient dans un MCS le gène rapporteur *gfpmut3a* d'environ 750bp codant pour un mutant de la protéine fluorescente GFP. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, une origine de répllication chez *E. coli* et une séquence Mob qui contient les signaux nécessaires au transfert conjugatif. Sa taille est de 4764bp. (Dr. Valvidia, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, California, USA)

pUC4K

Ce plasmide de 3914bp (Pharmacia) porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (Kan^R). Il contient une origine de répllication ColE1 et porte un gène de résistance à l'ampicilline. Le gène Kan^R est bordé de part et d'autre par 4 sites de restriction (*EcoRI*, *BamHI*, *SalI* et *PstI*).

pBBR1mcs4

Ce plasmide de 4950 pb contient le gène *bla*, le gène REP requis pour la répllication du plasmide et compatible avec la machinerie de répllication de *Brucella*, un site multiple de clonage (MCS) inclu dans le gène *lacZ* et la région MOB correspondant au gène requis pour le transfert du plasmide

pBBR1mcs1

Ce plasmide possède les mêmes caractéristiques que le pBBR1mcs4, le gène *bla* a été remplacé par le gène de résistance au chlorempénicol (*cat*).

(Figure V. 1)

5.2. Méthodes

5.2.1. Techniques relatives à l'ADN

5.2.1.1. Préparation de cellules CaCl_2 compétentes

- Lancer une préculture: Ensemencer 20 ml de LB avec une colonie de cellules DH10B et laisser incubé une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin, inoculer 400 ml de LB avec 20 ml de la préculture et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,3 à 0,4.
- Laisser la culture 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm afin de culoter les cellules. Éliminer le surnageant.
- Resuspendre les bactéries culotées dans 80ml final de CaCl_2 60mM + glycérol 15% stérile et froid.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm. Éliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 90ml final de CaCl_2 60 mM + glycérol 15% froid.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm.
- Resuspendre dans 16 ml final de CaCl_2 +glycérol15%.
- Aliquoter en 0.2 ml et 0,4ml et stocker à -80°C.

5.2.1.2. Transformations de bactéries CaCl_2 compétentes

Le but de l'opération est de faire pénétrer un plasmide à l'intérieur d'une bactérie (*Escherichia coli*), grâce à un lavage préalable avec une solution de CaCl_2 qui fragilise la paroi bactérienne.

La souche utilisée pour cette manipulation sont DH10B.

- Ajouter 1 à 10 μl de la solution contenant le plasmide (mélange de ligation, ADN préparé, mélange de mutagenèse, etc.) à 100 μl de cellules compétentes de la souche désirée.

- Laisser sur glace pendant environ 35 minutes.
- Opérer un choc thermique: plonger les cellules dans un bain à 42°C pendant 2 minutes, puis les remettre directement sur la glace.
- Ajouter 0.5 ml de milieu LB.
- Incuber au moins 20 minutes à 37°C.
- Etaler de 50 à 100 µl de cellules sur LB contenant le milieu de sélection adéquat.

5.2.1.3. Extraction d'ADN plasmidique

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

Les tampons utilisés pour les préparations d'ADN :

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

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

S3 : 2,8M Kac, pH5,2. S3. Se conserve à 4°C.

N2 : tampon d'équilibration : 100mM Tris, 15% éthanol, 900mM KCl ajusté avec H₃PO₄ à pH6,3.

N3 : tampon de lavage : 100mM Tris, 15% éthanol, 1150mM KCl ajusté avec H₃PO₄ à pH6,3.

N5 : tampon délution : 150mM Tris, 15% éthanol, 1000mM KCl ajusté avec H₃PO₄ à pH8,5.

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

- Ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation pendant une nuit

- Centrifuger 1,5ml de la culture liquide dans un eppendorf à une vitesse de 14000 rpm pendant 5 minutes. Ensuite éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de S1.
- Ajouter 300 µl de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement par retournements, incubé 5 minutes maximum à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement par retournements, incubé 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm et récupérer ensuite le.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Vortexer
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm. Éliminer le surnageant.
- Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid pour le lavage
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Éliminer prudemment le surnageant.-Sécher le culot.-Resuspendre dans 20µl d'H₂O distillée stérile.-Stocker à -20°C.

5.2.1.3.2. Préparation d'ADN plasmidique en moyenne quantité (midpréparation d'ADN plasmidique)

Cette technique utilise le kit Nucleobond Qiagen et inclut une chromatographie sur colonne Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer une quantité importante d'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

- Ensemencer 100ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) dans un erlen de 500ml avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger la culture pendant 15 minutes à 3000 rpm. Éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4ml de S1.
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement par retournements.
- Laisser incubé 5 minutes maximum à température ambiantes.
- Ajouter 4ml de S3, mélanger par retournements, laisser 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm. Récupérer le surnageant.

- Équilibrer une colonne NUCLEABOND AX100 avec 4 ml de N2.
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée, l'ADN s'accroche à la résine.
- Laver la colonne 2 fois avec 4ml de N3.
- Eluer l'ADN avec 4ml de N5. L'éluat est récupéré dans un corex de 15 ml.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol tout en mélangeant pour précipiter l'ADN.
- Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Ajouter 4ml d'éthanol 70% froid.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm.
- Éliminer l'éthanol et sécher le culot.
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau distillée stérile.

5.2.1.4. restriction d'ADN plasmidique purifié

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique: elles reconnaissent des sites de restrictions, constitués par une séquence de 4 à 6 paires de bases. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, et donner ainsi des "bouts collants". La ligation d'un tel bout collant n'est possible que si le brin protrudant reconnaît son complémentaire.

Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical.

Restriction diagnostique

La restriction diagnostique permet d'identifier des plasmides selon les sites de restrictions qu'ils possèdent ou pas, de quantifier d'ADN, etc... L'ADN restreint est séparé selon la taille des fragments par une électrophorèse en gel d'agarose.

- Mélanger dans un Eppendorf:
 - 1 à 2 µl d'ADN plasmidique purifié.
 - 2 µl de tampon de restriction 10X
 - 1 µl d'enzyme de restriction.
 - Porter le volume à 20µl avec de l'H₂O distillée stérile
- Incubation d'une heure trente à 37°C (certaines enzymes nécessitent une autre température).
- Ajouter 3 µl de Bleu d'électrophorèse et déposer sur gel d'agarose.

Restriction préparative

Comme le dit bien son nom, la restriction préparative permet de restreindre des plasmides ou fragments d'ADN en vue de constructions futures. Préalablement à la restriction, il faut calculer:

-La quantité nécessaire d'ADN à restreindre pour la ligation. Il faut en effet prévoir les pertes dues à l'extraction au phénol et à la précipitation d'ADN précédant la ligation. La ligation nécessite un minimum de 200 ng du plus gros fragment.

- La quantité d'enzyme nécessaire pour une restriction optimale. La quantité d'unité(s) enzymatique(s) nécessaire(s) (Q) est donnée par la formule:

$$Q = (48.5)(qp)(np)/(tp)(n\lambda)$$

qp : la quantité de plasmide en μg ,

tp : la taille du plasmide en kpb,

np : le nombre de site(s) de restriction dans le plasmide. $n\lambda$: le nombre de sites de restriction pour la même enzyme dans le phage λ .

-Le temps d'incubation à la température *ad hoc* est de deux heures.

5.2.1.5. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Les fragments sont visualisés grâce à du bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est ainsi visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille,

Noms des souches	Resistance aux antibiotiques	Caractéristiques
<i>E. coli</i> DH10B		Cfr matériels et méthodes
<i>E. coli</i> S17	Strept ^R	Cfr matériels et méthodes
<i>E. coli</i> S17pTB2	Strept ^R , Kan ^R , Amp ^R	Contient le gène rapporteur <i>gfpmut3a</i> sous le contrôle du promoteur <i>lacZ</i>
<i>E. coli</i> S17 pTB2a	Strept ^R , Kan ^R , Amp ^R	Contient le gène rapporteur <i>gfpmut3a</i> sous le contrôle du promoteur potentiel <i>omp2a</i>
<i>E. coli</i> S17 pTB2b	Strept ^R , Kan ^R , Amp ^R	Contient le gène rapporteur <i>gfpmut3a</i> sous le contrôle du promoteur potentiel <i>omp2b</i>
<i>E. coli</i> S17 pBBR1mcs4	Strept ^R , Amp ^R	Contient le plasmide low copy pBBR1mcs4
<i>E. coli</i> S17 pBBR1mcs4gfp	Strept ^R , Amp ^R	Contient le plasmide dans lequel le gène rapporteur <i>gfpmut3a</i> est sous le contrôle du promoteur <i>lacZ</i>
<i>E. coli</i> S17 pBBR1mcs1	Strept ^R , Amp ^R	Contient le plasmide low copy pBBR1mcs1
<i>B. melitensis</i>	Nal ^R	Cfr matériels et méthodes
<i>B. melitensis</i> 2a	Nal ^R , Kan ^R , Amp ^R	Contient le plasmide pTB2a intégré dans le génome
<i>B. melitensis</i> 2b	Nal ^R , Kan ^R , Amp ^R	Contient le plasmide pTB2b intégré dans le génome
<i>B. melitensis</i> pBBR1mcs4	Nal ^R , Amp ^R	Contient le plasmide low copy pBBR1mcs4
<i>B. melitensis</i> pBBR1mcs4gfp	Nal ^R , Amp ^R	Contient le plasmide low copy pBBR1mcs4 <i>gfpmut3a</i>
<i>B. melitensis</i> pBB2a	Nal ^R , Amp ^R	Contient le plasmide pBB2a
<i>B. melitensis</i> pBB2b	Nal ^R , Amp ^R	Contient le plasmide pBB2b

nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison à l'intensité de la fluorescence.

Méthode-Préparer le volume de gel souhaité : dissoudre 0,8 à 2% d'agarose dans du tampon TAE 1X. Porter à ébullition jusqu'à ce que la solution soit limpide. -Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°C), couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne et ajouter 2µl de bromure d'éthidium (2mg/ml) avant la polymérisation du gel.-Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X.-Déposer les échantillons dans les puits : environ 10µl d'ADN additionné de bleu d'électrophorèse par puits. -Migration : l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive. La différence de potentiel appliquée est d'environ 100V. -Visualiser l'ADN du gel sous UV.

Solutions

-Bleu d'électrophorèse

-bleu de bromophénol 0,1%

-glycérol 50%

-EDTA 100mM

-SDS 1%

-Tampon d'électrophorèse TAE (50X concentré)

-Tris 242g

-EDTA 100ml d'une solution 0,5M, pH 8.

-acide acétique glacial 57,1g

Porter le volume à un litre avec de l'eau distillée

Marqueurs de tailles pour gel d'agarose DNA

-λ/HindIII (MBI Fermentas)

-100bp DNA ladderplus (MBI Fermentas)

-Smart ladder (Eurogentec)

(Figure V. 2.)

5.2.1.6. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. Le kit utilisé est le QIAquick Gel Extraction kit de Qiagen.

Méthode

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel. Peser le morceau d'agar.
- Ajouter trois volumes de tampon QG.
- Incuber à 50°C pendant 10 min en agitant toutes les deux minutes.
- Ajouter un volume d'isopropanol et mélanger. Vérifier le pH après l'addition de l'isopropanol. L'adsorption de l'ADN dans la membrane QIAquick est efficace à pH<7,5. Si le pH est plus élevé, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5, mélanger et revérifier le pH.
- Verser le contenu dans une colonne "QIAquick spin", préalablement placée dans un tube collecteur.
- Centrifuger 1 min.
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne et replacer la colonne de nouveau dans le tube collecteur.
- Ajouter 0,75 ml de tampon PE de lavage contenant de l'éthanol dans la colonne. Laisser agir 5 min. Centrifuger 1 min et éliminer le liquide passé au travers de la colonne.
- Centrifuger à nouveau 1 min de manière à éliminer toute trace d'éthanol.
- Placer la colonne dans un eppendorf. Eluer l'ADN avec 50 µl d'eau bidistillée. Centrifuger une min pour récolter l'éluat.
- Conserver à -20°C

5.2.1.7. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺.

Méthode

-Dans un eppendorf, placer un mélange de deux fragments à liguer dans les proportions suivantes :

$$\frac{\text{ng vecteur} \times \text{taille insert} \times 3}{\text{Taille vecteur (kb)}} = \text{ng insert}$$

-Ajouter 1µl de DNA ligase T4

-Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation 10X

-Compléter avec de l'eau distillée stérile

-Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à environ 25°C si les extrémités sont à bouts francs

Témoins à utiliser

-Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase : les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont incapables de transformer efficacement des *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteurs non restreints ; ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants due aux vecteurs non restreint.

-Un vecteur restreint dont le mélange de ligation contient la ligase mais pas l'insert.

5.2.1.8. Purification d'ADN

Afin d'extraire les enzymes contenues dans une solution d'ADN (par exemple : enzyme de restriction, enzyme de déphosphorylation...), on réalise une précipitation au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol.

Méthode

Précipitation au phénol-chloroforme

- Porter le volume de la solution à 100 µl final avec de l'eau pure.
- Ajouter 100 µl de solution phénol/chloroforme saturée en TE.
- TE : tris/HCl 10mM, EDTA 1mM
- Vortexer.
- Centrifuger pendant 3 minutes à 14000 rpm.
- Recupérer la phase aqueuse (phase supérieure), en évitant de reprendre l'interface phénol-eau.

Purification par précipitation à l'éthanol

- Ajouter à la solution d'ADN 2 volumes d'éthanol 100% froid et 1 volume d'acétate de sodium 3M.
- Laisser agir à -80°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger pendant 20 minutes à 14000 rpm.
- Éliminer le surnageant et sécher le culot.
- Resuspendre dans 30µl d'eau distillée stérile.
- Faire migrer 1/10 de la purification sur gel d'agarose pour quantifier.

5.2.1.9. Polymerase Chain Reaction :PCR

Introduction

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

Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires de la séquence se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. La longueur de la séquence cible est déterminée par la distance entre les deux amorces. Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN.

Un cycle PCR consiste en 3 étapes:

- la dénaturation, à 95°C, permet de séparer les deux brins.
- l'hybridation des amorces s'effectuant à une température dépendante de la température de melting des amorces utilisées c'est-à-dire entre 50 et 72°C.
- l'élongation, à 72 °C, permet la polymérisation des brins.

En répétant ce cycle une trentaine de fois, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la région cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting T_m des amorces. Ce T_m se calcule de la façon suivante: $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. Les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter les amplifications non spécifiques, que l'amorce contienne un excès de G-C à l'extrémité et au centre et que les deux/trois dernières bases de l'extrémité 3' soient A/T. Les ponts hydrogènes formés par ces bases étant au nombre de deux, la liaison est moins forte et permet une initiation de l'hybridation par l'enzyme plus accessible. (Figure V. 3.) et (tableau V. 1.)

Méthode*PCR « traditionnelle »*

Le mélange de réaction est réalisé dans un Eppendorf pour PCR:

- 1 µl de primer 1 (100 µM).
- 1 µl de primer 2 (100 µM).
- 2 µl de dNTP à 5mM chacun.
- de l'eau pure pour porter le volume final à 50 µl.
- 5 µl de tampon d'ADN polymérase (Taq ou Pwo) concentrée 10X.
- environ 250 ng d'ADN portant la région à amplifier appelée ADN « template ».
- 0,5 µl de Taq polymérase (*Thermophilus aquaticus*) (Biotools)

Pwo (Roche Molecular Biochemicals)

-Pour vérifier l'amplification du fragment cible, déposer 1/10 de la réaction PCR sur gel d'agarose.

-Conserver le produit à -20°C.

Nous avons utilisé cette méthode en vue d'un séquençage. En effet, à partir du produit amplifié par PCR, il est possible de purifier l'ADN et de l'utiliser comme cible d'une PCR de séquençage.

Purification du produit PCR

Nous utilisons le kit "High pure PCR Product Purification kit" (Roche Molecular Biochemicals).

Le principe est le suivant: l'acide nucléique se lie spécifiquement à la surface de fibres ou silices en présence de sels. La liaison de l'ADN étant totalement spécifique, il est facile de laver l'ADN de toutes les impuretés, comme les sels, nucléotides libres ou enzymes, et ce en une seule étape.

Méthode

- Porter le volume du produit PCR à 100 µl et y ajouter 500 µl de tampon de liaison (Binding buffer). Mélanger.

Composition du Binding buffer:

-guanidine-thiocyanate	3M
-Tris-HCl	10mM
-éthanol	5%
pH6,60	

- Verser le contenu du mélange dans une colonne, contenant le filtre. La colonne est préalablement mise dans un tube collecteur.

- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm

- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne.

- Appliquer 500 µl du tampon de lavage sur la colonne (Wash buffer).

Composition du Wash buffer

-NaCl 20mM

-Tris-HCl 2mM, pH7,5

Ajouter 40ml d'éthanol à 200ml du tampon avant utilisation.

- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm.

- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne.

- Recommencer l'opération avec 200 µl de Wash buffer.

- Insérer la colonne dans un Eppendorf propre.

- Eluer avec 100 µl d'eau pure.

-Pour vérifier la purification, mettre 1/10 du produit de purification sur gel d'agarose.

- Conserver à -20°C

PCR "de séquençage"

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. Cette technique est basée sur 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. (Figure V. 4.)

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube PCR :

-Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.

-1µl de primer, à la concentration de 3,2 pmoles/µl.

-Ajouter 2µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase

-Ajouter 6µl de tampon Tris-HCl MgCl₂

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

Cycles.

- 1 min à 96°C.
- 25 cycles de:
 - 10 sec à 96°C.
 - 10 sec à 50°C.
 - 4 min à 60°C.
- maintenir à 4°C ou stocker à -20°C.

Purification.

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

- Ajouter aux 20µl de solution PCR, 50 µl d'éthanol 95%, 2 µl d'acétate de potassium 3M, pH 4,8.
- Mixer, vortexer et placer sur glace 10 min.
- Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm
- Eliminer le surnageant..
- Ajouter 250 µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger 15 min à 14000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant.
- Secher le culot .
- Les échantillons sont ensuite resuspendu et mis sur gel du séquenceur automatique ABI-PRISM.

5.2.2. La conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne entre bactéries Gram négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers la bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

Méthode

- Préléver des colonies de *B.melitensis* 16M avec une pipette Pasteur boutonnée et resuspendre dans 150µl de NaCl 0,9%.

- Etaler ces 150µl sur une boîte de Petri contenant du milieu TSAYE et l'antibiotique Nal trois à quatre jours avant la conjugaison.

- La veille de la conjugaison,

ajouter sur la boîte de Pétri 3ml de NaCl 0,9% et racler les colonies. Ces colonies en suspension dans le NaCl sont récupérées dans un falcon contenant 7ml de NaCl 0,9% au moyen d'une pipette pasteur. La suspension est homogénéisée.

Prélever 1ml de la suspension bactérienne et la diluer 10X dans un autre falcon contenant 9ml de NaCl 0,9%. De cette dilution prendre 1ml pour ensemer 9ml de 2YT liquide contenant l'antibiotique Nal concentré à 25µg/ml.

Ensemencer 10ml de LB liquide (contenant les antibiotiques adéquats en fonction des gènes de résistances portés par le plasmide que la bactérie contient) avec les différentes clones d'*E. coli* S17.

- Le jour de la conjugaison :

Le matin, à partir des précultures d'*E.coli* S17 lancées la veille, prélever 1ml et ensemer 9ml de LB liquide de manière à ce que les bactéries se trouvent quelques heures après dans la

phase exponentielle de croissance. Centrifuger les cultures pendant 30 minutes à 2500 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer les surnageants et effectuer deux lavages dans du LB liquide afin d'éliminer les antibiotiques.

-Resuspendre dans un volume finale de 1ml de LB

-Les cultures de *Brucella* sont centrifugées 30 minutes à 2500rpm. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 10ml de LB.

-La conjugaison au sens stricte s'effectue sur un filtre stérile de 0,22 µm placé sur une boîte de Pétri contenant du 2YT. Sur ce filtre, déposer 100 µl de culture de *Brucella* et 100 µl de culture d'*E.coli* S17 lavées et resuspendues.

-Mélanger et étaler les bactéries sur la totalité du filtre.

-Laisser incuber une heure à 37°C.

-Transférer ensuite le filtre dans une boîte de Petri vide. Déposer 3ml de NaCl 0,9% sur le filtre et au moyen d'une pipette Pasteur boutonnée, gratter la surface du filtre.

-Récupérer 150 µl de la suspension bactérienne et l'étaler sur milieu 2YT sélectif contenant les antibiotiques adéquats. Etaler également cette suspension bactérienne diluée 10 et 100X. Incuber à 37°C. Les colonies apparaissent environ 3 à 6 jours après la conjugaison. Les plasmides transférés sont :-pTB2a (Amp^R, Kan^R)-pTB2b (Amp^R, Kan^R)-pBBRmcs4 (Amp^R)-pBBRmcs4gfp (Amp^R)-pBB2b (Amp^R)-pBB2a (Amp^R)-pBBRmcs1omp2b (Cm^R)-pBBRmcs1omp2a (Cm^R) Les antibiotiques, indiqués entre parenthèses, permettent la sélection des plasmides transférés chez *B. melitensis* 16M.

-Les bactéries utilisées sont :-La souche donneuse : *E.coli* S17 (Sm^R)-La souche receveuse : *B. melitensis* 16M (Nal^R) L'acide nalidixique est utilisé pour sélectionner les *B. melitensis* et éliminer les *E.coli* S17 donneuses qui y sont sensibles.

5.2.3. Analyse de l'ADN génomique de *Brucella sp* par Southern blot

5.2.3.1. Extraction de l'ADN génomique de *Brucella sp*

- Ensemencer 10ml de 2YT liquide avec une colonie isolée de *Brucella*. Laisser incuber 24 H à 37°C. Prélever 1ml de cette culture en eppendorf et culotter les bactéries.
- Resuspendre le culot dans 567 µl de TENa dans un eppendorf. Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20mg/ml afin de lyser les bactéries.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incuber une heure à 37°C.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa et agiter fortement l'eppendorf au vortex.
- Centrifuger pendant 20 minutes à 4°C et à 13500 rpm. Récupérer la phase aqueuse 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 5000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1ml d'éthanol 100% froid. Mélanger en inversant l'eppendorf. La précipitation de l'ADN est visible. Ensuite centrifuger pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% froid pour laver l'ADN. Centrifuger pendant 5 minutes à 13500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot et resuspendre dans 100 µl d'eau bidistillée stérile.
- Effectuer une électrophorèse sur 1/10 du volume de la solution d'ADN.
- Pour éliminer l'ARN, ajouter 5 µl de solution TE contenant de la RNase concentré à 100 µg/ml.

Solutions et tampons

-TENa: Tris 50mM à pH8,00

EDTA 50mM

Nacl 0,1M

-Protéinase K 20mg/ml dans le tampon :

Tris pH7,50 1mM

CaCl₂ 1mM

Conserver à 4°C

-Phénol saturé en TENa

-SDS 10%

5.2.3.2. Analyse de l'ADN restreint par Southern blot

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

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon la taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxide de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon dans une solution de haute concentration alcaline grâce à un transfert effectué par capillarité par un appareillage à aspiration utilisant une pompe à vide. Ces conditions assurent l'immobilisation de l'ADN sur le film de nylon au point de contact entre le gel et le film. Comme cette étape respecte la distribution des fragments dans le gel, on obtient une réplique du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalent 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 s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane.

La sonde hybridée au fragment d'ADN recherché est décelé par autoradiographie de la membrane. (Figure V. 5)

La position à laquelle s'est effectué l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de taille.

5.2.3.2.1. Restriction de l'ADN génomique et électrophorèse en gel d'agarose

On réalise une restriction sur environ 1µg d'ADN génomique avec l'enzyme *EcoRI* concentré (40U/µl). On vérifie la restriction et on quantifie l'ADN en mettant un dixième de la restriction sur un gel d'agarose 1%. Pour le Southern blot, on charge environ de 500ng à 1 µg de la restriction sur un grand gel d'agarose 1%. Pour assurer une bonne séparation des bandes, on laisse migrer longtemps à un faible voltage, environ 3 heures à 70 Volts. Des photos du gel doivent être prises après migration avec une latte graduée placée avec le 0 correspondant au fond du puits pour déterminer ultérieurement les distances de migration.

5.2.3.2.2. Dénaturation et neutralisation

Le gel est placé pendant 15 minutes dans une solution de dénaturation sous agitation. Cette étape assure la dénaturation des deux brins d'ADN qui permettra l'hybridation à la sonde radiomarquée. Le gel est ensuite immergé dans une solution de neutralisation pendant 15 minutes sous faible agitation.

5.2.3.2.3. Le transfert et immobilisation

Le transfert se réalise avec un appareillage à aspiration pendant une heure en présence d'un tampon de transfert SSC 20X. Le montage est semblable à celui de la figure représentée [V.7]

Après l'étape de transfert, on vérifie en exposant le gel aux UV que les fragments d'ADN ont bien été transférés.

L'ADN est fixé sur la membrane en exposant celle-ci aux UV pendant une minute.

5.2.3.2.4. Séchage de la membrane

Le séchage de la membrane s'effectue dans une étuve à 80°C pendant une demi heure

5.2.3.2.5. Préhybridation

La membrane est immergée dans une solution d préhybridation et 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. La boîte est placée à incuber à 68°C pendant 2 heures sous agitation.

5.2.3.2.6. Hybridation

-Utiliser directement la sonde ou la congeler . Si la sonde a été congelée, la dénaturer 10 minutes à 100°C avant de la verser dans la solution de préhybridation.

-Le fragment d'ADN encodant le gène utilisé comme sonde est obtenu par restriction d'un plasmide ou par PCR. Le plasmide est préparé en haute concentration (midiprep) et restreint avec l'enzyme choisie. Les fragments obtenus sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose et le fragment d'intérêt est extrait du gel puis purifié au moyen du kit Quiagen. Après avoir quantifié, sur gel d'agarose, la concentration du fragment obtenu, le marquage est réalisé.

Obtention de la sonde radiomarquée

Pour synthétiser la sonde radiomarquée au P^{32} , nous utilisons le Kit « Radprime DNA labelling system» (Gibco). La synthèse de cette sonde repose sur une fixation d'octanucléotides aléatoires en différents endroits de l'ADN que l'on cherche à détecter. Les octamères sont anticomplémentaires de certaines portions de l'ADN et vont pouvoir servir d'amorce pour une polymérase, la Klenow. Le marquage radioactif est réalisé grâce à l'incorporation dans le mix de synthèse d'un des 4 nucléotides sous forme marquée au P^{32} , c'est-à-dire que le groupement phosphate α est remplacé par un phosphate radioactif. Suite à cette synthèse, des fragments de taille variable seront obtenus, ceux-ci pourront s'hybrider avec le brin anticomplémentaire de l'ADN. (Figure V.6)

Les différentes étapes réalisées pour marquer la sonde radioactive doivent être réalisées derrière une protection de plexiglas.

-Dénaturer 25ng d'ADN correspondant à la région d'ADN génomique recherchée en chauffant 5 minutes à 100°C.

-Placer sur glace pour empêcher la renaturation

-Ajouter au mélange :

1µl de dATP	500mM
1µl de dTTP	500mM
1µl de dGTP	500mM
20µl de Radprime buffer mixture 2,5X (contient les octamères)	
5µl de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 3000ci/mMol	
10 µCi/µl	

-Porter le volume à 49µl avec de l'eau distillée. mélanger

-Ajouter 1µl de la polymérase Klenow

-Incuber 10 minutes à 37°C

La sonde est ajoutée à la solution de préhybridation en veillant à ne pas trop diluer la sonde.

Le mélange est placé à 68°C sous agitation pendant une nuit.

5.2.3.2.7. Lavages

A la fin de l'hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et placé à -20°C afin d'être réutilisé. La membrane est lavée deux fois pendant 10 minutes au SSC 2X SDS 0,1%.

5.2.3.2.8. La mise en cassette

La membrane est placée dans une cassette et recouvert d'un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80°C pendant au moins 5 heures ou plus selon l'ancienneté de la sonde ou la quantité d'ADN de départ.

5.2.3.2.9. Révélation

Le film autoradiographique est placé dans une solution de révélation pendant 5 secondes. Ensuite quand les bandes sont révélées, on trempe le film autoradiographique dans de l'H₂O de lavage puis dans le fixateur.

5.2.3.2.10. Solutions

-La solution de dénaturation

-NaCl 1,5M

-NaOH 0,5M

-La solution de neutralisation

-tris HCl pH7,50 0,5M

-NaCl 3M

-La solution de transfert

-SSC 20X : NaCl 3M

Citrate de Na pH7,00 300mM

-La solution de préhybridation : pour 50ml

-Solution de Denhart's 50X (stockée à -20°C) 5 ml

Ficoll 1%

polyvinylpyrrolidone 1%

BSA 1%

A filtrer avec un filtre 0,2µm.

-SSC 20X 10ml

-1,5ml d'ADN de thymus de veau de concentration finale de 100µg/ml

-0,5ml de SDS 10%

porter le volume à 50ml avec de l'H₂O distillée.

-Révélateur et fixateur: Kodak

5.2.4.Observation de l'émission de la fluorescence par la protéine GFP en microscopie à fluorescence

5.2.4.1. Protocole

Observation des *E. coli* en microscopie à fluorescence

- Déposer 200µl de culture liquide d'*E. coli* sur un coverslip se trouvant dans un puits d'une plaque 24 puits.
- Laisser les bactéries adhérer sur le coverslip pendant 30 minutes à température ambiante ou centrifuger la plaque multipuits pendant 15 minutes à 2000rpm.
- Eliminer le milieu et laver avec 300µl de PBS déposé délicatement sur la paroi du puit afin de ne pas détacher les bactéries du coverslip.
- Déposer une goutte de milieu de montage (Dako) sur une lame porte objet.
- A l'aide d'une pince, prendre le coverslip et absorber le PBS à l'aide d'un papier en ne touchant pas la surface sur laquelle les bactéries ont adhéré. Retourner le coverslip sur le milieu de montage.
- Laisser durcir le milieu de montage une heure à température ambiante à l'obscurité.
- L'observation des bactéries est réaliser au grossissement 100X sous immersion. La lumière d'excitation a une longueur d'onde de 488nm.
- Conserver les lames porte objet à 4°C et stocker à -20°C.

Observation des *Brucella* en microscopie à fluorescence

- Une inactivation préalable des bactéries avec du paraformaldéhyde 3% est nécessaire.
- Prélever 200µl de culture liquide de *Brucella* et déposer sur un coverslip se trouvant dans un puit d'un plaque 24 puits falcon 3047.
 - Centrifuger 15 minutes à 2000rpm.
 - Eliminer l'excès de milieu et laver avec 500µl de PBS déposé délicatement sur la paroi du puit.

- Éliminer le PBS et ajouter 500µl de paraformaldéhyde 3%. Laisser agir 20 minutes.
- Enlever le paraformaldéhyde et laver avec 500µl de PBS.
- Prendre le coverslip et le retourner sur la goutte de Dako déposée sur la lamelle porte objet.

Les lames sont observées au microscope à fluorescence avec une lumière d'excitation de 488nm. Rappelons que la GFPmut3a possède une longueur d'onde d'excitation optimale de 488nm et un pic d'émission de 501nm.

5.2.4.2. Solutions et matériel

Solution de paraformaldéhyde 3%

- Faire chauffer 80 ml de PBS puis y ajouter 3g de paraformaldéhyde sous hotte.
- Chauffer jusqu'à dissolution puis ajouter 100 µl de CaCl₂ 100mM et 100µl de MgCl₂ 100mM.
- Laisser refroidir
- Mettre à pH 7,5 et ajuster le volume à 100 ml avec du PBS.
- Aliquotter par 5ml et stocker à -20°C. Une fois décongelé, la solution de paraformaldéhyde ne peut pas être recongelée.
- DAKO : Fluorescent mounting medium containing 15mM NaN₃) (DAKO corporation)
- Coverslip (Menzel-Glaser)
- Lamelles porte objet
- Microscope à fluorescence :Leitz dialux 22
- Microscope confocal :Leica TCS

Le microscope confocal permet d'améliorer la résolution de l'image en confinant à un seul plan les vues microscopiques. Un avantage majeur de la microscopie confocale est la possibilité de réaliser et d'observer à hautes résolutions des sections optiques minces, générées par l'analyse informatique de l'image. Ceci évite d'être perturbé par la dispersion de la lumière des sections au dessus ou en dessous du plan.

Quantification de la fluorescence au moyen d'un fluorimètre

Pour quantifier la lumière fluorescente nous avons utilisé un fluorimètre (fluostar).

Les concentrations en bactéries des différentes cultures liquides des clones d'*E. coli* sont égalisées pour pouvoir comparer l'émission de fluorescence des différentes bactéries. La standardisation des concentrations en bactéries se fait par mesure de densités optiques à 590 nm. Si nécessaire, les suspensions sont diluées dans du LB liquide pour obtenir les mêmes densités optiques pour chaque clone.

Au fluorimètre, on utilise une plaque 24 puits dans laquelle on dépose 500µl des cultures liquides de chaque clone à la densité optique appropriée.

La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 485nm et le filtre d'émission est de 520 nm.

5.2.5. Technique relative aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western blot

5.2.5.1. BCA

Le BCA est une technique permettant de faire des dosages d'extraits protéiques sur des bactéries lysées. Cette technique a été appliquée sur trois clones de *Brucella* afin d'effectuer un Western blot pour évaluer la quantité de porines Omp2b et Omp2a produite par *Brucella*. Pour effectuer le dosage, un étalon est utilisé, la BSA (Bovin Serum Albumin).

5.2.5.1.1. Méthode

- Mises en culture des clones de *Brucella* sur un milieu riche (TSAYE) avec antibiotiques.
- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, racler les *Brucella* et les resuspendre dans 300µl de PBS dans un eppendorf.
- prélever 50µl de la suspension et la diluer 20X dans 950µl de PBS. Mesurer la DO. Celle-ci doit être de 2 environ afin d'avoir suffisamment de protéines pour effectuer le dosage.
- Pour obtenir une DO de 2, diluer les suspensions bactériennes avec du PBS .
- Inactiver les *Brucella* pendant 2 heures dans un bain à 80°C.

- Lyser les cellules dans un bain sonicateur pendant 30 minutes.
- Pour faire la courbe d'étalonnage, on utilise la BSA à différentes concentrations: 1 ; 0,8 ; 0,6 ; 0,4 ; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0 mg par ml.
- Chaque lysat bactérien est dilué 0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 et 128 fois.
- Dans une plaque 96 puits, déposer 10µl de chaque dilution des échantillons ainsi que la référence, la BSA aux différentes concentrations citées ci-dessus.
- Dans chaque puits, 200µl de réactif coloré sont ajoutés et vont réagir avec les protéines contenues dans l'extrait protéique.
- Incuber 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière.
- La lecture de la plaque 96 puits se fait à 570 nm dans un lecteur de plaque multipuits Bio Rad.
- Les DO obtenues pour l'étalon nous permettent de réaliser une droite d'étalonnage avec en ordonnées les DO et en abscisse les concentrations.
- A partir de cette courbe, nous pouvons évaluer les concentrations protéiques dans les différents échantillons.
- Chaque échantillon sera dilué de façon à obtenir 4 concentrations: 1 ; 2 ; 5 et 10 µg/ml.

5.2.5.1.2. Matériel et solutions

- PBS : Stock 10X concentré (500ml) : 1g KH_2PO_4
5,75g Na_2HPO_4
40g NaCl
1g KCl

- BSA : Solution stock : 1mg/ml
- réactif coloré : 1 volume de réactif B : CuSO_4 (4%).(Pierce)
- 50 volumes de réactif A : BCA protein Assay Reagent A (Pierce)
- Plaque 96 puits Nucleon.
- Lecteur de plaques multipuits Bio Rad.

5.2.5.2. SDS PAGE

Le principe de l'électrophorèse en gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou "SDS-PAGE" est une technique de séparation des protéines en fonction de leur taille dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamides sont le résultat de la polymérisation de monomère d'acrylamide en présence d'un agent bifonctionnel qui relie les chaînes entre elles (Le N,N' méthylène bisacrylamide). La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par du TEMED (tétraméthylidamide). Les gels de polyacrylamide présente l'avantage d'avoir une taille de pore sélectionnable, puisque la concentration totale en acrylamide est inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

En présence du SDS, les protéines sont chargées négativement et peuvent être séparées électrophorétiquement en gel de polyacrylamide. Les protéines migrent en fonction de leur taille. 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 polyacrylamide est constitué de deux parties: Le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer le protéines avant la séparation et le running gel ou gel de séparation.

Solutions, tampons et matériels

-Tampon de stacking :

-Tris-HCl, pH 6,80 0,5M

-SDS 4%

-Tampon de running :

-Tris-HCl, pH 8,80 1,5M

-SDS 4%

-Tampon d'électrophorèse :

-Tris-HCl, pH 8,3 25mM

-Glycine 192mM

-SDS 0,1%

-Tampon d' échantillon 5X concentré :

-Tris-HCl, pH6,80 0,25M

-SDS 10%

-2-β-mercaptoéthanol 10%

-Glycérol 50%

-Bleu de bromophénol 0,25%

-APS (persulfate d'ammonium) 10mg/ml

-Temed (N,N,N',N', tétraméthyléthylènediamine)

-Système d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Bio Rad)

-le running gel

% d'acrylamide	10	12	15	16
Acrylamide 40% (1) (ml)	2,5	3	3,7	4
Tampon d running (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Eau distillée (ml)	4,5	4	3,3	3
APS 2% (2) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Temed (μl)	10	10	10	10

(1) la solution stock contient 40% d'acrylamide et 0,8% de bisacrylamide

(2) Solution stock d'APS, 1% (10mg/ml)

-le stacking gel

% d'acrylamide	3%
Acrylamide 40% (1) (ml)	0,75
Tampon de running) (ml)	2,5
Eau distillée (ml)	5,75
APS 2% (2) (ml)	1
Temed (μl)	10

-Marqueur de poids moléculaire

Protocole

- Réaliser un montage du moule avec les plaques d'électrophorèse et les « spacers ».
- Préparer un gel de séparation. Dans notre cas un gel 10%
- Couler le gel et ajouter un film d'éthanol pour égaliser la limite du gel et permettre la polymérisation de celui-ci.
- Laisser polymériser.
- Pendant la polymérisation, préparer le stacking gel.
- Couler le gel, mettre le peigne en place et laisser polymériser.
- Préparer les échantillons dans le tampon d'échantillon. Les faire bouillir pendant environ 10 minutes pour dénaturer les protéines sauf si l'anticorps utilisé pour l'étape de détection immunologique est un anticorps reconnaissant un épitope conformationnel.
- Charger les échantillons dans les puits (20 μ l par puits : 16 μ l d'échantillon + 4 μ l de tampon d'échantillon 5X concentré).
- La migration s'effectue pendant une heure à 120volts.

5.2.5.3. Western blot

Le Western blot permet de détecter une protéine parmi d'autres. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

- Le fractionnement d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS.
- L'électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose.
- La détection immunologique.

5.2.5.3.1. Electrophorèse en gel de polyacryamide

(voir point 3.2.5.2.)

5.2.5.3.2. Electrotransfert sur film de nitrocellulose

Le gel est tout d'abord placé dans un système de transfert où une différence de potentiel est appliquée entre le gel et la membrane de nitrocellulose. Les protéines, chargées négativement, sont ainsi transférées sur la membrane chargée positivement, pour donner une réplique du gel. Toute augmentation de température est nuisible au transfert des protéines. C'est le cas lorsque le courant électrique est élevé. Pour éviter cela, le transfert se fait sur glace, dans un tampon de « blotting » ayant une faible force ionique.

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

Protocole

- Placer la membrane de nitrocellulose humidifiée dans le tampon blotting sur le gel.
 - Les placer entre deux papiers Wathman humidifiés.
 - Les protéines étant chargées négativement, elles vont migrer vers le pôle positif (l'anode). On place donc la membrane de nitrocellulose du côté de l'anode pour assurer le transfert.
 - Migration d'une heure à 100 V dans la cuve d'électroblotting. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace changée régulièrement pour limiter l'augmentation de la température.
- (Figure V. 7)

Tampons, solutions et matériel

-Tampon de blotting :

-Tris-HCL	25mM
-Glycine	192mM
-Méthanol	20%

- Cuve d'électroblotting (Bio Rad)
- Membrane de nitrocellulose : Millipore HA 0,45µm
- Whatman chromatography paper.

5.2.5.3.3. Détection et révélation immunologique

La détection des protéines d'intérêt a été réalisée par une détection indirecte avec un premier anticorps spécifique de ces protéines et un deuxième anticorps dirigé contre le premier. Le deuxième anticorps est couplé à la peroxydase. La révélation se fait par colorimétrie avec la peroxydase.

La peroxydase possède deux fonctions enzymatiques :

- Une fonction catalytique quand la concentration en peroxydase d'hydrogène (H_2O_2) est élevée. Elle utilise alors H_2O_2 comme donneur d'électron.
- Une fonction peroxydasique quand la concentration en H_2O_2 est faible. Elle oxyde alors d'autres substrats pour lui fournir des électrons.

Voici les étapes enzymatiques de l'action de la peroxydase :

1. Perox. $Fe^{+++} + H_2O_2 \rightarrow$ composé I
2. Composé I + $H_2O_2 \rightarrow$ Perox. $Fe^{+++} + 2H_2O + O_2$
3. Composé I + $DH_2 \rightarrow$ Perox. $Fe^{+++} + 2H_2O + D$ (coloré)

Protocole

- Saturer la membrane pendant 1 heure à 37°C avec le tampon de saturation. On récupère le tampon de saturation que l'on stocke à -20°C.
- Incubation d'une nuit avec l'anticorps monoclonal spécifique de la protéine cible : 8D8 (A63/08D08/C07) qui reconnaît à la fois Omp2a et Omp2b. L'anticorps est dilué dans le tampon de dilution.
- Laver 2X 10 minutes avec la solution de lavage.
- Incuber 1 heure 30 avec l'anticorps couplé à la peroxydase.
- Laver 2X 10 minutes avec le tampon de lavage.

- Laver 1X 10 minutes avec du TBS afin déliminer toute trace de Tween20. Celui-ci précipite avec le chloro-naphtol.
- Préparer la solution de révélation.
- Laisser la réaction se poursuivre à l'obscurité.
- Rincer la membrane à l'eau de ville pour stopper la réaction.

Solutions, tampons et matériels

-TBS 10X concentré :

-Tris-HCL 200mM

-NaCl 5M

ajuster à pH 7,5

-Tampon de saturation de la membrane :

-TBS + 3% de BSA (bovin serum albumine)

-Tampon de dilution des anticorps :

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

-Tampon de lavage :

TBS + Tween20 0,05%

-Cuve d'électroblotting (Bio Rad)

-Membrane de nitrocellulose : Millipore HA 0,45µm

-Whatman chromatography paper.

-Albumine de serum bovin (BSA) (Sigma)

-Anticorps secondaire couplé à la peroxydase : goat anti mouse HRP

-Solution de révélation :

-H₂O₂ 30µl

-TBS 1X 50ml

-Méthanol 100% 10ml

-4-chloro-1-naphtol 30mg

5.2.6. Infections en macrophages bovins et en cellules HeLa

5.2.6.1. Etude de la virulence: modèle cellulaire

Les cellules eucaryotes HeLa sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 additionné de Foetal Calf Serum (FCS)10% contenant des facteurs de croissance essentiels. La culture est réalisée à 37°C dans des flasques F75 (NUNC) .

5.2.6.1.1. Croissance et infection de cellules HeLa en plaques multipuits

Jour -1:

*Pour les cellules eucaryotes:

-Eliminer le milieu RPMI+FCS10%

-Détacher le tapis cellulaire en ajoutant 7ml de trypsine diluée 3 fois dans du PBS stéril.

Laisser agir 5 à 10 minutes à 37°C.

-Stopper la réaction en ajoutant du milieu additionné de FCS.

-Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 minutes.

-Eliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de RPMI+FCS10%.

-Effectuer un comptage du nombre de cellules grâce à une cellule de Thomas.

-Diluer la suspension cellulaire de façon à obtenir $2 \cdot 10^4$ bactéries /100 μ l

-100 μ l de cette dilution soit 2×10^4 cellules, sont déposés dans chacun des puits d'une plaque multipuits (Nucleon).

*Pour les bactéries:

-Ensemencer 10ml de RPMI 1640 avec les souches de *Brucella* à tester

Jour 0:

-Déterminer le nombre de bactéries par une prise des DO (DO 1= 3×10^9 bactéries/ml).

-Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit 3×10^7 bactéries/ml diluées dans du milieu RPMI+FCS10%.

-100µl de cette dilution bactérienne servira à infecter les cellules eucaryotes contenues dans un puit.

-Centrifuger 10 minutes à 1000 rpm afin d'augmenter les contacts entre les bactéries et les cellules eucaryotes.

-Incuber 1 heure à 37°C.

- Laver 3 X avec 200µl de RPMI.

-Éliminer le milieu et ajouter 200µl de RPMI+FCS 10% et gentamycine (50 mg/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires.

5.2.6.1.2. Quantification de la dose infectante

-La solution bactérienne utilisée pour l'infection est diluée de 10 en 10 et déposée sur milieu 2YT agar

-Incuber à 37°C pendant 3-4 jours

- Dénombrer les CFU (colony forming unit).

5.2.6.1.3. Dénombrement des bactéries intracellulaires

-Éliminer le milieu de culture.

-Laver 3 fois avec 200 µl de RPMI.

-Au temps post-infection (48h) désiré les cellules eucaryotes sont lysées en ajoutant 100µl de PBS+TritonX100 0,1% pendant 30 minutes à 37°C.

-Le Lysat est dilués de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^{-5} . Les dilutions 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} sont étalées sur milieu 2YT.

-Après 3 jours d'incubation a 37°C les CFU sont dénombrées.

Solution

-PBS TritonX100 0,1% : pour 500ml

-0,5g d triton

-50ml d PBS10x

-450ml d'eau distillée.

-Trypsine concentré 10X.

5.2.6.2. Analyse de la fluorescence en condition d'infection.

-Les cellules eucaryotes sont cultivées sur des coverslips dans des plaques 24 puits. La concentration des cellules par puit est de $5 \cdot 10^5$ cellules eucaryotes/500 μ l.

-Les conditions d'infection sont identiques à celles décrites cidessus (point 5.2.6.1.1).

-Après l'infection, inactiver les cellules avec 500 μ l de paraformaldéhyde 3% pendant 20 minutes.

-Eliminer le paraformaldéhyde et laver avec 500 μ l de PBS.

-les coverslips sont ensuite récupérés et montés sur lame comme décrit dans le point 5.2.4.1.

BIBLIOGRAPHIE

6. Bibliographie

- Buommino, E., Morelli, F., Metafora, S., Rossano, F., Perfetto, B., Baroni, A. and Tufano, M.A. (1999) Porin from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in an epithelial cell line derived from rat seminal vesicles. *Infect Immun*, **67**, 4794-4800.
- Burgess, A.W. and Anderson, B.E. (1998) Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog*, **25**, 157-164.
- Campbell, G.A., Adams, L.G. and Sowa, B.A. (1994) Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, **41**, 295-306.
- Chatfield, S.N., Dorman, C.J., Hayward, C. and Dougan, G. (1991) Role of ompR-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both ompC and ompF are attenuated in vivo. *Infect Immun*, **59**, 449-452.
- Cloekaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. and Limet, J.N. (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun*, **58**, 3980-3987.
- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M. and Grepinet, O. (1995) Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, **141**, 2111-2121.
- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M. and Vizcaino, N. (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett*, **145**, 1-8.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., de Wergifosse, P., Dubray, G. and Limet, J.N. (1992) Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol*, **138**, 1543-1550.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Delihias, N. (1995) Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol*, **15**, 411-414.

- Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. and Welte, W. (1998) Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharides. *Science*, **282**, 2215-2220.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G. (1988) A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect Immun*, **56**, 2036-2046.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G. (1989) DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun*, **57**, 3281-3291.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Marquis, H. (1990) Genetic variation at the omp2 porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Mol Microbiol*, **4**, 1135-1142.
- Gallot-Lavallee, T., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., Bezaud, G. and Dubray, G. (1995) Growth phase-dependent variations in the outer membrane protein profile of *Brucella melitensis*. *Res Microbiol*, **146**, 227-236.
- Henderson, I.R., Owen, P. and Nataro, J.P. (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*, **33**, 919-932.
- J-Y. Paquet, X.D.B., S. Genevrois, P. Mertens, E. Depiereux, J H. Lakey and J-J. Letesson. (1999) Structural and functional comparison of two closely-related *Brucella melitensis* porins after their purification and renaturation from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *submitted in Journal of Bacteriology*.
- Jap, B.K. and Walian, P.J. (1996) Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev*, **76**, 1073-1088.
- Jean-Yves Paquet, C.V., Johan Wouters, Jean-Jacques Letesson and Eric Depiereux. (2000) Topology Prediction of *Brucella abortus* Omp2b and Omp2a porins after critical assesment o transmembrane b strands prediction by several secondary structure prediction méthodes. *Journal of Biomolecular structure and dynamics*, **17**, 747-757.
- Letain, T.E. and Postle, K. (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli* [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1997 Aug;25(3):617]. *Mol Microbiol*, **24**, 271-283.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol*, **172**, 3569-3576.

- Muller, A., Gunther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T.F. and Rudel, T. (1999) Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *Embo J*, **18**, 339-352.
- Neidhart, F.C. (1996) *Escherichia coli and Salmonella*.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, **49**, 1-32.
- Pautsch, A. and Schulz, G.E. (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain [see comments]. *Nat Struct Biol*, **5**, 1013-1017.
- Phillips, G.N., Jr. (1997) Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 821-827.
- Postle, K. (1999) Active transport by customized beta-barrels [news; comment]. *Nat Struct Biol*, **6**, 3-6.
- Roest, H.P., Bloemendaal, C.J., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg, B.J. (1995) Isolation and characterization of ropA homologous genes from *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. *J Bacteriol*, **177**, 4985-4991.
- Russo, F.D. and Silhavy, T.J. (1991) EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol*, **222**, 567-580.
- S.Genevrois, J.-Y.P., C. Lambert, X; De Bolle, K. de fays, J.-J. Letesson and E. Depiereux. (1999) Preliminary steps in the construction of a topological model of Omp1, an outer membrane protein of unknown function from *Brucella abortus*. *SBB meeting*, FUNDP Namur.
- Silhavy, L.A.P.a.T.J. (1995) Porin Regulon of *Escherichia coli*. *Two-component signal transduction*.
- Tibor, A., Decelle, B. and Letesson, J.J. (1999) Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins. *Infect Immun*, **67**, 4960-4962.
- Vaara, N.a. (1987) Outer membrane. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*.
- Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, **22**, 367-378.
- Verstrete, D.R., Creasy, M.T., Caveney, N.T., Baldwin, C.L., Blab, M.W. and Winter, A.J. (1982) Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun*, **35**, 979-989.

Welte, W., Nestel, U., Wacker, T. and Diederichs, K. (1995) Structure and function of the porin channel. *Kidney Int*, **48**, 930-940.

ANNEXE

Test statistique réalisé sur 3 souches De *B. melitensis*

Souche	B.16M			B.16MpBB2a			B.16MpBB2b		
ligne	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
	5,374	5,903	5,602	4,778	5,214	4,602	4,301	4,561	4,470
	5,804	6,360	5,490	4,602	5,105	5,297	4,778	4,180	4,580
	5,733	6,313	5,845	4,737	5,012	5,146	4,602	4,590	4,301
	5,637	6,192	5,646	4,706	5,110	5,015	4,560	4,444	4,450
	0,053	0,063	0,033	0,008	0,010	0,134	0,058	0,052	0,020

5,084 Moyenne gén
0,048 CMR

B.16M	B.16MpBB2a	B.16MpBB2b
5,82473013	4,94360606	4,48477095

1: Hartley Test d'homogénéité des variances
Hobs Htable 95%
 15,765 704 aHo

2: Anova2 hiérarchisée mixte

Critère fixe: souches

Critère aléatoire: boîtes

	Sc	dl	CM	Fobs	Ftable 95%	Ftable 99%	
Tot		10,111	26,000		0,95	0,99	
Fact		9,248	8,000	1,156	2,51	3,71 SS	(p≤0,0005)
Souche		8,347	2,000	4,174	5,14	10,9 SS	(p≤0,005)
Boite		0,900	6,000	0,150	2,66	3,71 S (S)	(p≤0,05)
Residuelle		0,864	18,000	0,048			

3: Contrastes orthogonaux

Existe-t-il une différence entre les deux souches B . 16MpBB2a et B . 16MpBB2b et la souche B. 16M?

Existe-t-il une différence entre les souches B . 16MpBB2a, B. 16MpBB2b et B. 16M

B.16M	B.16MpBB2a	B.16MpBB2b			Fobs	Ftable 95%	Ftable 99%	
5,82473013	4,94360606	4,48477095						
	2	-1	-1		2,221	6,000	7,400	49,311
	0	1	-1		0,459	2,000	0,947	6,313
							8,347	

5,99 13,7 SS
(S)

Annexe I: Etude statistique sur la virulence des trois souches B. 16MpBB2a, B. 16MpBB2b et B. 16M afin de voir si une différence significative existe entre les moyennes d'atténuation.