



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation fonctionnelle de l'ORF BMEI1674 de *Brucella Melitensis* et du domaine TIR qu'elle contient. Relation entre *B. Melitensis* et le système immunitaire inné

Terwagne, Matthieu; Copin, Richard

Award date:
2006

[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

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE L'ORF BMEI1674 DE *BRUCELLA*
MELITENSIS ET DU DOMAINE TIR QU'ELLE CONTIENT
-RELATION ENTRE *B. MELITENSIS* ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE-**

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

Matthieu TERWAGNE

Juin 2006

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

**Caractérisation fonctionnelle de l'ORF BMEI1674 de *Brucella melitensis* et du
domaine TIR qu'elle contient**
-Relation entre *B.melitensis* et le système immunaire inné-

TERWAGNE Matthieu

Résumé

La famille des récepteurs TLRs (*Toll-Like Receptors*) constitue l'archétype des systèmes de détection des pathogènes par l'immunité innée. Ils reconnaissent des signatures moléculaires d'agents infectieux très divers, avant d'initier des voies de signalisation complexes impliquées dans la mise en place d'une réponse effectrice efficace.

De nombreux facteurs de virulence bactériens agissent comme des mimiques de protéines mammaliennes pour interférer avec les processus immunitaires de l'hôte. Une protéine hypothétique partageant une homologie de séquence avec le domaine TIR (*Toll-interleukin-1 receptor*) intracellulaire des TLRs a été mise en évidence chez *Brucella melitensis*, une bactérie pathogène de cellules phagocytaires.

Au cours de ce travail, nous nous sommes attelés à caractériser cette protéine hypothétique. Ainsi, nous avons montré qu'elle est exprimée, qu'elle serait sécrétée, et qu'elle est un facteur de virulence de *B. melitensis* 16M requis lors de l'infection de souris. Nous avons également tenté de mettre en évidence un rôle immunomodulateur dans la cellule eucaryote tel que son effet sur l'activation du facteur de transcription pro inflammatoire NF- κ B.

On propose qu'en interférant avec les voies de transduction du signal initiées par les TLRs, cette protéine empêche la mobilisation des mécanismes effecteurs immuns innés et adaptatifs.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: J.-J. Letesson

Co-promoteur: X. De Bolle

REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens particulièrement à remercier le Pr. J.- J. Letesson de m'avoir permis de réaliser ce mémoire dans son laboratoire, d'avoir toujours pris le temps de m'écouter me conseiller et de m'avoir soutenu tout au long de ce travail. Et je vous remercie également d'avoir toujours su stimuler mon intérêt pour ce domaine passionnant qu'est l'immunologie.

Richard, je pourrais te remercier pour de nombreuses raisons, mais je ne les retrouve plus ;-). Je te dirai ici simplement merci de t'être tant investi dans ce mémoire, et merci pour toutes ces discussions que l'on a pu avoir. J'en profite ici pour remercier Laurence pour la mise en page du travail. (et pour m'excuser d'avoir accaparé ton cher et tendre ces derniers mois...)

Je tiens également à remercier la sous-unité HTBM composée d'Alex *et ses deux femmes*, Gégé et Blandine. Votre bonne humeur a toujours rendu le travail beaucoup plus agréable. Merci Alex pour tes conseils. Si je ne trompe pas, votre équipe est supervisée par le pr X. De Bolle, l'homme pressé. J'en profite donc pour lui dire merci d'avoir toujours pris un peu de son temps précieux pour répondre à mes questions.

Je remercie aussi toutes les personnes du labo qui m'ont guidées d'une façon ou d'une autre pendant ce mémoire. Tout d'abord, Régis, un grand merci pour tous tes conseils précieux. Merci Caro de m'avoir initié aux infections cellulaires, au test de sécrétion et à l'immunofluorescence. Merci petite Marie et Nico de m'avoir dévoilé tous les secrets de la réussite d'un western blot. Je remercie également Sophie et Julien qui se sont toujours montrés disponibles et souriant à mon égard (merci Julien pour les petits conseils de mise en page)

Un merci tout particulier à Patsy Renard de nous avoir hébergés quelques jours dans son laboratoire, et de s'être impliquée activement dans notre projet.

Clin d'œil à mes collègues chéris, Blandine, Delphine, Raquel, Thomas et Lionel. Je vous remercie pour tous les moments de détente que l'on a pu avoir ces derniers mois. Clin d'œil également aux footballeurs du lundi, Allan et Johann (que je remercie aussi pour la mise en page) et désolé de vous avoir fait perdre le championnat ;-)

Je remercie également mes parents de m'avoir apporté un soutien inconditionnel durant ces quatre années d'études. Merci à mes frères Olivier et Nicolas (il faut l'le dire) et sœurs Caroline et Coralie.

Un merci tout particulier à Laura, qui a toujours été à mes côtés et à qui je dois beaucoup.

Je terminerai par un remerciement qui me tient particulièrement à cœur, merci Mr Vandenhaut. Si il est des rencontres qui contribuent à influencer des choix importants au cours d'une vie, vous en faite assurément partie.

TABLE DES MATIERES

Introduction	3
A. Immunité	3
1. La dualité du système immunitaire: union plutôt que désunion.	3
2. La puissance de détection des acteurs de l'immunité innée.....	4
2.1. Le rôle critique des récepteurs de l'immunité innée.	4
2.2. Les récepteurs de l'immunité innée, sélectionnés au cours de l'évolution.	4
2.3. Les <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> , signatures d'agents pathogènes..	5
2.4. Classification des <i>Pattern-Recognition Receptors</i> , récepteurs de l'immunité innée.	5
2.4.1. Les PRRs solubles.....	6
a) Les Protéines du complément.	6
b) Les protéines de phase aigue.....	6
c) Les protéines LBP et CD14s, deux <i>PRRs</i> solubles du complexe récepteur du LPS.	7
2.4.2. Les PRRs cytoplasmiques.	7
a) MDA-5 et RIG-I, deux protéines cytoplasmiques détectant le dsRNA viral.	7
b) L'ADN-PKc, une protéine cytoplasmique détectant l'ADN bactérien.	7
c) Les NLRs.	8
2.4.3. Les PRRs membranaires.	9
a) Les récepteurs <i>non-TLRs</i>	9
b) Les <i>TLRs</i>	11
B. Anti-immunité : le principe de la reine rouge à l'œuvre.	17
1. Généralités	17
2. Échapper au système du complément.	18
3. Éviter la reconnaissance de <i>PAMPs</i>	18
3.1 Ne pas exprimer un <i>PAMP</i> , l'exemple du flagelle.....	18
3.2 Camoufler les <i>PAMPs</i>	18
3.4 Disposer de <i>PAMPs</i> atypiques	19
3.5 Modifier les <i>PAMPs</i>	19
4. Interférer avec le traitement de l'information.	19
5. Tirer profit de la reconnaissance.	20
C. Le genre <i>Brucella</i>	21
1. Généralités	21
2. Pathogénie.....	21
2.1. Généralités	21
2.2. <i>Brucella</i> , une bactérie furtive.....	21
2.2.1 Une porte d'entrée peu commune	22
2.2.2 <i>Brucella</i> paralyse la réponse du macrophage.....	22
3. A la recherche de ses stratégies anti-immunitaires	22
3.1. Le rôle important de son LPS	22
3.2. Identification d'un système de sécrétion de type IV.....	23

Objectif du mémoire	24
Résultats	26
A. Identification d'une protéine à domaine TIR chez <i>Brucella melitensis</i>	26
1. <i>BMEI1674</i> , mise en évidence d'un gène codant un effecteur potentiel.....	26
2. Une erreur d'annotation de l'ORF ?	26
3. <i>BMEI1674</i> , une protéine hypothétique parmi d'autres.....	27
B. <i>BMEI1674</i>, protéine hypothétique ou protéine exprimée ?	28
1. Validation et choix des tags.	28
2. Construction des vecteurs suicides Tlp-eGFP et Tlp-GST chez <i>B. melitensis</i> 16M.....	28
3. <i>Tlp-eGFP</i> et <i>Tlp-GST</i> au locus génomique de <i>B. melitensis</i> 16M.	29
4. Etude in vitro de l'expression de la protéine Tlp par western blot.	30
4.1. Extraits protéiques préparés.	30
4.2. Mise en évidence de l'expression de la Tlp par <i>B. melitensis</i> 16M.	31
5. Etude de l'expression de la protéine Tlp par fluorescence.	32
5.1. Etude in vitro de l'expression de la protéine Tlp.	32
5.2. Etude ex-vivo de l'expression de la protéine Tlp.	33
5.2.1. Infection de macrophages.	33
5.2.2. Observation des cellules infectées au microscope à fluorescence.	33
C. La TIR-like protein, protéine sécrétée ?	33
1. Construction de vecteurs réplicatifs Tlp-13Myc.....	34
2. Etude de la sécrétion chez la souche sauvage de <i>B. melitensis</i>	34
3. Etude de la sécrétion chez <i>B. melitensis</i> Δ <i>VirB</i>	35
D. La TIR-like protein, un facteur de virulence ?	35
1. Construction d'une souche <i>B.melitensis</i> 16M Δ _{long} Tlp.	35
1.1. Amplification par PCR des parties amont et aval de l'ORF <i>longTlp</i>	36
1.2. Clonage intermédiaire dans le pGEM-T Easy.	36
1.3. Délétion de l'ORF <i>longTlp</i>	37
2. Tester la virulence du mutant Δ _{long} <i>Tlp</i> lors d'une infection de macrophages.	37
3. Tester la virulence du mutant Δ _{long} <i>Tlp</i> lors de l'infection de souris.	38
E. La TIR-like protein, une protéine immunomodulatrice ?	38
1. Recherche en double-hybride de partenaires eucaryotes interagissant avec la Tlp.	38
1.1. Principe du test d'interaction en double-hybride.	39
1.2. Réalisation d'un crible double-hybride : la protéine <i>longTlp</i> utilisée comme appât contre une banque de cDNA de leucocytes humains.	39
2. Etude de la capacité d'interférence de la Tlp avec l'activation TIR-dépendante de NF- κ B.	40
2.1. Construction de plasmides d'expression eucaryotes portant l'ORF Tlp.....	40
2.2. Principe du test.....	41
2.3. Transfection de cellules Hela.....	41
2.4. Observation des cellules en microscopie confocale.....	42
Discussion et Perspectives	44
A. Analyse génomique.	44
1. Définir l'ORF <i>Tlp</i>	44
2. L'ORF <i>Tlp</i> dans un contexte particulier	45

B. La protéine Tlp est exprimée. Son expression est-elle régulée ?	45
1. Régulation de l'expression in vitro	46
2. Régulation de l'expression ex-vivo	46
C. Confirmer la sécrétion de la protéine Tlp	46
D. Tlp, un facteur de virulence non requis ex-vivo	48
E. Tlp, un facteur de virulence requis in vivo	49
F. Comprendre les mécanismes d'action de la Tlp	49
1. Quels rôles pour le domaine TIR ?	49
2. L'approche sans à priori.....	50
G. Un modèle d'action de la protéine Tlp proposé a priori	50
H. La Tlp permet à <i>B. melitensis</i> 16M de s'attaquer à deux points faibles du système immunitaire	51
Matériel et méthodes	53
A. Souches et plasmides	53
1. Souches bactériennes	53
2. Souche de levure	53
3. Plasmides	53
B. Milieux, tampons et solutions	54
1. Milieux de culture	54
2. Tampons.....	55
C. Techniques relatives à l'ADN	56
1. Polymerase chain reaction (<i>PCR</i>)	56
2. Électrophorèse en gel d'agarose	56
3. Restriction plasmidique et ligation.....	57
4. Minipréparation de plasmide	57
5. Purification sur colonne	57
6. Clonage Gateway TM	57
D. Techniques relatives aux protéines	58
1. Analyse de l'expression d'une protéine par western blot.....	58
2. Précipitation des protéines du surnageant d'une culture bactérienne.....	60
E. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	60
1. Transformation bactérienne : choc thermique	60
2. Le test blanc/bleu : l' α -complémentation	61
3. Conjugaison	61
4. PCR sur lysat bactérien	62
F. Techniques relatives à l'utilisation de levures	62
1. Test d'interaction protéique en double hybride : crible d'une banque de cDNA.....	62
2. Minipréparation de plasmide de levures	63
G. Techniques relatives à l'utilisation de cellules eucaryotes : transfection de cellules mammaliennes	64
H. Infection par <i>Brucella</i> spp	64
1. Infection de cellules hôtes.....	64
2. Infection de souris.....	65

I. Marquage immunocytochimique.....	65
Bibliographie	67

TABLE DES ABBREVIATIONS COURANTES

APC:	Cellule présentatrice d'antigène (Antigen-presenting cell)
DC :	Cellule dendritique
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i> , ARN double brin
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IL-1R	Récepteur à l'interleukine-1
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Répétition riche en leucine (Leucine Rich Repeat)
LTA	Acide lipoteïchoïque
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MBL	<i>Mannan-Binding Lectin</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- κ B	Nuclear Factor κ B, facteur de transcription
NLR	famille de protéines définies par la présence des domaines NACHT et LRR
ORF	Phase ouverte de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PGN	Peptidoglycan
PMN	Neutrophile polymorphonucléaire
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
SR	Scavenger Receptors
TIR	Toll/interleukin-1 receptor/resistance domain
Tlp	<i>TIR-like protein</i>
short Tlp	La plus petite version protéique de la Tlp
long Tlp	La plus longue version protéique de la Tlp
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T4SS	Système de sécrétion de type IV

"Mais, Reine Rouge, nous courrons vite et le paysage autour de nous ne change pas ? "

" Ici, pour rester sur place, il faut courir"

Traduit du roman de Lewis Carroll, *Looking through the glass*, ce dialogue a lieu entre Alice et la Reine Rouge lorsqu'elles se lancent dans une course effrénée qui ne semble cependant pas les faire avancer. En biologie, cette image a été reprise pour illustrer d'une manière générale la nécessité des espèces à évoluer en s'adaptant continuellement aux variations environnementales.

Ce principe dit "de la Reine Rouge" s'applique à la relation entretenue par l'hôte avec son pathogène. En effet, toute mesure de défense prise par l'hôte à l'encontre du pathogène sera nécessairement suivie d'une contre-mesure de celui-ci sous peine de disparaître. Ainsi, dans ce principe, l'objectif est de maintenir sa position, ou sa valeur relative. Le contact permanent de l'hôte au pathogène lui permet d'apprendre beaucoup des faiblesses de celui-ci, et inversement. Cette coévolution leur a ainsi permis de développer de nombreuses stratégies, immune d'un côté, immunoévasive de l'autre. Hôte et pathogène mènent donc tout deux de front une course aux armements. Si Alice s'arrête de courir, le paysage défile et elle recule...

INTRODUCTION

Introduction

A. Immunité

La protection d'un organisme contre l'envahissement par des agents extérieurs susceptibles de perturber son intégrité est assurée par un ensemble de mécanismes capables de faire la distinction entre les constituants propres de cet organisme et les agents étrangers, de tolérer les premiers tout en éradiquant les seconds. Ces mécanismes de défense constituent le système immunitaire.

1. La dualité du système immunitaire: union plutôt que désunion.

On distingue généralement, de manière un peu dogmatique, l'immunité innée ou naturelle et l'immunité acquise ou adaptative. Cette distinction se fait sur base de données évolutives d'une part, et sur leurs modalités d'action d'autre part.

Le système immunitaire inné est plus ancien car on en retrouve certaines formes chez tous les organismes multicellulaires. Ainsi, il constitue le système de défense exclusif des invertébrés et des plantes (Hoffmann *et al.*, 1999). L'immunité adaptative est, quant à elle, plus tardive évolutivement parlant puisqu'elle n'apparaît qu'avec les premiers vertébrés.

Ces deux types de réponses immunitaires ont des caractéristiques qui pourraient sembler opposées mais qui s'avèreront complémentaires. La réponse innée est immédiate, sans latence, car ses acteurs moléculaires et cellulaires préexistent au contact du pathogène à des endroits stratégiques de l'organisme. Elle est dite non spécifique. Plus précisément, elle est "peu discriminative" car elle reconnaît des patterns moléculaires typiques de classes de pathogènes. Elle n'est donc pas, dans une certaine mesure, capable de les différencier. Enfin, l'immunité innée n'a aucune capacité de mémorisation et répond de manière stéréotypée.

La réponse adaptative, quant à elle, nécessite trois à cinq jours pour se mettre en place. Ce temps de latence est le reflet d'une réponse qui ne développe ses mécanismes effecteurs qu'au contact du pathogène. Elle est assurée par des clones de lymphocytes (T et B) qui ciblent précisément le pathogène à l'origine de l'infection grâce à leurs récepteurs spécifiques d'antigène. De plus, la plupart du temps, se développent au cours de la réponse adaptative des lymphocytes mémoires qui permettront une réaction plus rapide, plus vigoureuse et plus spécifique lors d'un deuxième contact avec le même agent infectieux.

Sur base de ces caractéristiques, l'immunité innée a été considérée comme une entité séparée de l'immunité adaptative et on a clairement distingué deux étapes lors de la réponse immunitaire d'un vertébré à un agent infectieux. On a, en effet, longtemps vu l'immunité innée des vertébrés comme un moyen de défense rudimentaire mais immédiat et à large spectre d'action capable de reconnaître et de contenir l'agent pathogène au site d'infection, tout en laissant le temps à l'immunité adaptative de s'adapter à la situation et de développer les effecteurs spécifiques adéquats pour éliminer efficacement celui-ci. Cependant, même si on peut admettre qu'il existe une ségrégation temporelle dans la réponse immunitaire, l'immunité innée a un rôle bien plus fondamental.

Il n'y a en effet pas d'immunité adaptative sans immunité innée alors que l'inverse s'avère vrai. Cette observation indique que l'immunité adaptative dépend de l'immunité innée et qu'elle ne peut en être isolée. Immunité innée et immunité adaptative sont étroitement intriquées, et ce, tant au niveau de la phase d'induction, que de la phase d'orientation et d'action de la réponse adaptative.

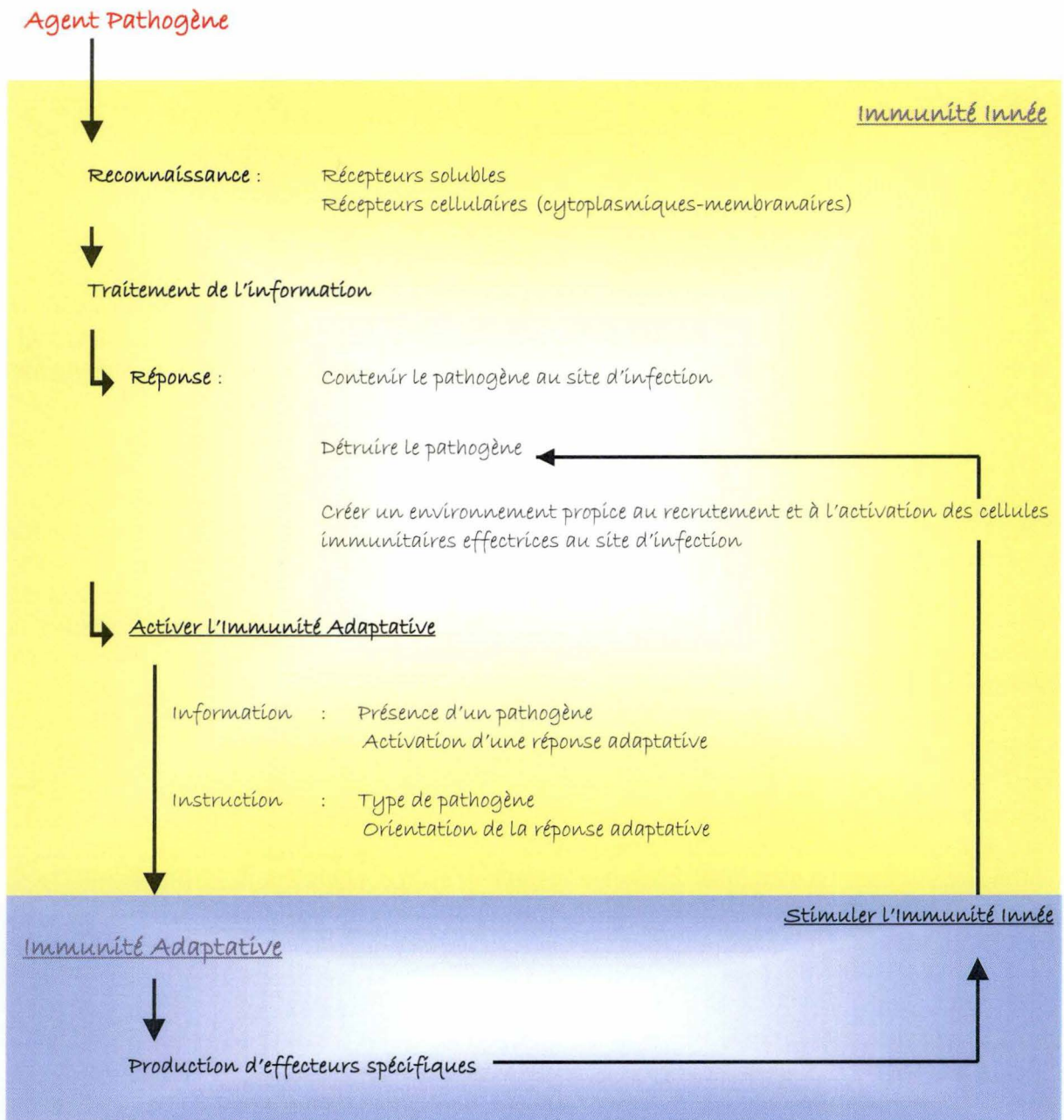


Figure 1. Représentation schématique de la réponse immunitaire d'un vertébré à l'infection par un agent pathogène. Elle met en évidence le rôle fondamental de l'immunité innée qui informe l'immunité adaptative de la présence d'un pathogène et de sa nature, et qui oriente la réponse adaptative. Les effecteurs spécifiques produits au cours de celle-ci sont recrutés au site d'infection, grâce aux médiateurs sécrétés par l'immunité innée, où ils renforcent l'action des mécanismes innés de défense. Immunités innée et adaptative sont intriquées, elles fonctionnent ensemble pour conférer à l'hôte une défense optimale.

En effet, tout d'abord, l'initiation de la réponse adaptative dépend, la plupart du temps, de cellules de l'immunité innée qui, après détection du pathogène, informent l'immunité adaptative de sa présence.

De plus, l'immunité innée instruit l'immunité adaptative de la nature du pathogène et conditionne le type de cellules effectrices développées lors de la réponse adaptative.

Enfin, les cellules et protéines effectrices de l'immunité adaptative ne peuvent à elles seules éliminer le pathogène, elles stimulent les mécanismes de l'immunité innée.

La boucle est ainsi bouclée, la réponse innée informe l'immunité adaptative de la présence d'un agent infectieux, du type d'agent infectieux, déclenche et influence la réponse adaptative dont les effecteurs spécifiques renforcent l'action des mécanismes innés de défense. (Fig.1) (Janeway, 1989) Longtemps boudée par les immunologistes dont l'attention s'est focalisée sur la compréhension des mécanismes d'action de l'immunité adaptative, l'immunité innée connaît ces dernières années un vif regain d'intérêt et on s'y intéressera de plus près dans ce travail.

2. La puissance de détection des acteurs de l'immunité innée.

2.1. Le rôle critique des récepteurs de l'immunité innée.

Comme représenté à la figure 1, l'immunité innée forme une interface critique entre les pathogènes et les mécanismes de protection de leur hôte. La réponse de cette composante du système immunitaire contribue à la défense de l'hôte dès le contact avec le microorganisme en limitant le foyer d'infection, en luttant activement contre celui-ci et, si nécessaire, en sensibilisant les autres composantes du système immunitaire inné et acquis.

Cependant, pour induire une telle réponse, l'immunité innée doit pouvoir percevoir le danger potentiel, en d'autres mots, détecter le pathogène. Et, de fait, l'immunité innée dispose d'une série de récepteurs, solubles ou exprimés par certaines cellules avant toute infection, qui lui permettent de discriminer parfaitement le soi (*noninfectious self*) du non-soi (*infectious non-self*) et de reconnaître une grande variété de pathogènes (Janeway, 1989).

Lors d'une infection, la décision de mettre en place une réponse immunitaire, repose toute entière sur leur activation et leur capacité de détecter sans la moindre erreur un pathogène.

2.2. Les récepteurs de l'immunité innée, sélectionnés au cours de l'évolution.

Les récepteurs de l'immunité innée, prédestinés à reconnaître et, dans une certaine mesure, à identifier des pathogènes, sont encodés au niveau de la lignée germinale. Cette caractéristique témoigne de leur acquisition par des organismes multicellulaires dont le système immunitaire évolue sous la pression de sélection imposée par le contact permanent de nombreux pathogènes (Janeway, 1992). L'acquisition de cette capacité de reconnaître le non soi a été néanmoins confrontée à une difficulté majeure, à savoir combiner l'hétérogénéité moléculaire des microorganismes renforcée par leur évolution très rapide (vu leur court temps de génération, leur haut taux de mutations et les échanges génétiques possibles) et une certaine limite du nombre de gènes qui pourraient coder ces molécules de reconnaissance. Ainsi a été sélectionné un petit nombre de récepteurs de l'immunité innée encodés "*germline*"¹ bien incapables de reconnaître tous les antigènes possibles mais se focalisant sur

¹ Cette caractéristique est à mettre en opposition avec les récepteurs de l'immunité adaptative qui ne sont pas encodés dans la lignée germinale mais qui dépendent de réarrangements aléatoires du génome de cellules somatiques, les lymphocytes B et T. De plus, ces récepteurs peuvent, théoriquement, reconnaître spécifiquement tous les antigènes rencontrés par l'organisme au cours de sa vie.

PAMPs de nature lipidique et/ou polysaccharidique	Classe de pathogènes	Description.
Lipopolysaccharide (LPS)	Bactéries gram-négatives	Constituant de la membrane externe des bactéries gram-négatives, il possède une architecture tripartite avec un lipide A, un polysaccharide, le core et une longue chaîne carbonée, la chaîne O.
Acide Lipoteichoïque (LTA)	Bactéries gram-positives	Polymère de sucre contribuant à l'armature rigide de la paroi de peptidoglycan des bactéries à gram-positives.
Peptidoglycan	Bactéries gram-négatives et gram-positives	Structure macromoléculaire de la paroi des bactéries gram-positives et gram-négatives, composé de longues chaînes linéaires de sucres (alternance de N-acétyl Glucosamine et d'Acide N-acétyl Muramique) liée par des ponts tétrapeptidiques. La nature du troisième acide-aminé diffère entre ces deux types de bactéries.
Lipoarabinomannan	Mycobactéries	Constituant pariétale des mycobactéries
β -glucanes	<i>Fungi</i>	Polysaccharides constitutifs de la paroi fongique.
Mannose	Bactéries gram-négatives et gram-positives ; <i>Fungi</i> ; virus ; parasites	Le mannose est un sucre commun dans les glycolipides et les glycoprotéines microbiens mais sont rares dans les cellules humaines.
PAMPs de nature protéique		
Flagelline	Bactéries	Monomère constitutif du filament du flagelle de certaines bactéries.
Protéines d'enveloppe virale	Virus	Protéines présentes à la surface de virus enveloppés.
PAMPs – acides nucléiques		
CpG-DNA	Bactéries, virus	L'ADN bactérien ainsi que le génome des virus à ADN est riche en îlots CpG non méthylés.
ARN double-brin (dsRNA)	Virus	Le dsRNA est souvent produit lors de la réplication des virus. Il est un produit intermédiaire de la réplication du génome des virus à ARN simple-brin, et un produit de transcription symétrique chez les virus à ADN.

Tableau 1. Quelques exemples de PAMPs. Ce tableau illustre la diversité de ligands reconnus par les récepteurs de l'immunité innée, du point de vue de leur nature et des pathogènes qui les portent. Chacun de ces PAMPs est typique d'une classe de pathogènes, et constitue une structure essentielle à leur survie.

une variété de structures typiques et conservées des pathogènes. On les appelle, selon la nomenclature de Janeway, les *Pattern-Recognition Receptors* ou *PRRs* et les structures des agents infectieux qu'ils reconnaissent sont les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou *PAMPs* (Janeway, 1989).

Après une brève description de la nature des *PAMPs* et de leurs caractéristiques communes, nous détaillerons les *PRRs*.

2.3. Les *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, signatures d'agents pathogènes.

Le tableau 1 propose une liste non exhaustive de quelques *PAMPs* et des microorganismes chez qui on les retrouve. Les *PAMPs* peuvent être des protéines, des lipides, des oligosaccharides ou encore les acides nucléiques du génome de virus et de bactéries. Il s'en dégage une série de caractéristiques communes.

Tout d'abord, les *PAMPs* sont des structures absentes des cellules de l'hôte, et uniquement synthétisées par les pathogènes. Cette caractéristique rend compte de la capacité de l'immunité innée à distinguer sans la moindre erreur le soi du non soi et dès lors, de la possibilité de n'initier une réponse qu'en cas de danger potentiel.

Ensuite, ces structures moléculaires sont des produits conservés très peu sujets à une variabilité antigénique. En effet, ils sont essentiels à la survie des microorganismes, et ils varient donc très peu sous la pression sélective de l'immunité innée, ce qui devrait les empêcher d'échapper à la reconnaissance par l'immunité innée.

Enfin, les *PAMPs* sont communs à de nombreuses espèces d'agents infectieux, ce qui permet de compenser le nombre limité de *PRRs* par rapport à la diversité des agents pathogènes. Ainsi, les *PAMPs* sont partagés par de nombreux pathogènes et en ce sens, leur reconnaissance par un *PRR* est non spécifique. Cependant, leur combinaison (susceptible d'être reconnue par une association de plusieurs *PRRs*) constitue une signature typique d'une classe de pathogènes tout comme l'ensemble des lignes d'un code barre permet d'identifier rapidement un produit.

2.4. Classification des *Pattern-Recognition Receptors*, récepteurs de l'immunité innée.

Les *Patterns Recognition Receptors* ou *PRRs* peuvent être répertoriés dans trois classes sur base de leur localisation (Fig.2) :

- Les *PRRs* solubles sécrétés dans le sérum ou les fluides tissulaires.
- Les *PRRs* associés à la membrane plasmique ou à la membrane d'un compartiment intracellulaire (lysosome, endosome).
- Les *PRRs* situés dans le cytoplasme des cellules de l'immunité innée.

Cette classification peut être améliorée en subdivisant chaque classe en groupes de récepteurs rassemblés sur base de leur structure et/ou de leur fonction.

Les deux derniers types de *PRRs* sont exprimés différenciellement par plusieurs types de cellules effectrices de l'immunité innée, tels les macrophages, les polymorphonucléaires neutrophiles (*PMNs*), les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes *Natural Killers*, et les cellules dendritiques (*DCs*), dont certains résident dans les tissus subépithéliaux avant toute infection. Ils sont également exprimés par les lymphocytes B et T de l'immunité adaptative et par des cellules susceptibles de rencontrer les premières le pathogène lors d'une infection, telles les cellules des épithélia de surface ou les fibroblastes.

D'une manière générale, les *PRRs* solubles et les *PRRs* exprimés en membrane plasmique des cellules sont capables de reconnaître les microorganismes extracellulaires. Les

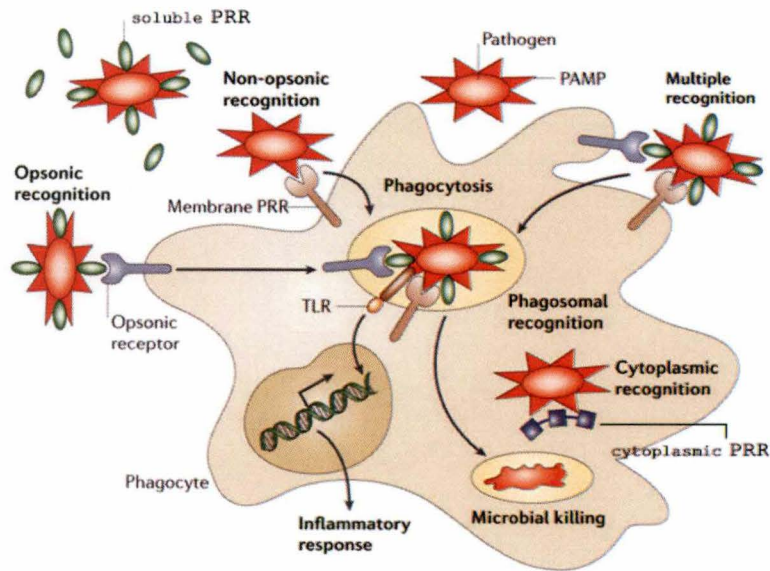


Figure 2. Reconnaissance d'un pathogène par les récepteurs de l'immunité innée (adapté de Brown, 2006). Toute réponse immunitaire à un pathogène (en rouge) est initiée par la reconnaissance de certains de ses PAMPs par divers PRRs. La reconnaissance peut avoir lieu dans les fluides tissulaires ou dans le sang par des PRRs solubles (en vert) qui agissent pour la plupart comme des opsonines. Les PRRs portés à la surface des cellules peuvent reconnaître le pathogène directement (*reconnaissance non-opsonique*) ou non (*reconnaissance opsonique*). Les PRRs portés par la membrane des lysosomes et des endosomes contribuent à la

détection des pathogènes internalisés. Il existe également des PRRs cytosoliques. Souvent, plusieurs PRRs de différentes classes agissent de concert pour reconnaître le pathogène. La destruction du pathogène par phagocytose et la réponse inflammatoire sont deux exemples majeurs de réponses immunes effectrices résultant de cette reconnaissance.

PRRs exprimés au niveau de la membrane des vacuoles et les *PRRs* cytoplasmiques sont quant à eux impliqués dans la reconnaissance des microorganismes intracellulaires.

Différents récepteurs de chaque classe ont été identifiés et décrits à ce jour, et pour certains d'entre eux, les conséquences de la liaison de leur ligand sont plus ou moins bien comprises. Celles-ci sont résumées dans le tableau 2. Parmi les *PRRs*, les *Toll-like Receptors* ou *TLRs* forment la famille de récepteurs transmembranaires actuellement la plus étudiée car ils montrent une diversité de ligands et une spécificité étonnantes. De plus, ils semblent constituer un lien essentiel entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Akira *et al.*, 2001). Nous décrirons quelque peu les *PRRs* les mieux connus ci-dessous avant de nous focaliser sur les *TLRs* (pour revue, voir (Kaisho *et al.*, 2006).

2.4.1. Les *PRRs* solubles.

a) Les Protéines du complément.

Parmi les *Pattern Recognition Receptors* solubles, on retrouve des protéines du système du complément. Celui-ci est un composant important de l'immunité innée puisqu'il peut être activé dès les premières minutes de l'infection (Tomlinson, 1993). Il est constitué d'au moins vingt glycoprotéines sériques activées localement par la présence d'un pathogène et réagissant en cascade enzymatique. Sur base des mécanismes d'initiation, on distingue trois voies d'activation du complément convergeant toutes vers la production des mêmes molécules effectrices, la voie classique, la voie de la *Mannan-Binding Lectin* et la voie alterne. Ces trois voies peuvent provoquer la lyse du microorganisme, son opsonisation, et contribuer au déclenchement et à l'entretien de la réponse inflammatoire (Fig. 3).

La glycoprotéine C3, commune aux trois voies, est clivée par une protéase hétérodimérique, la *C3 convertase*, en deux fragments, C3a et C3b. Le fragment C3b est un *PRR*. En fait, il peut se déposer sur toutes les surfaces mais les cellules de l'hôte sont protégées de toute amplification du complément par des protéines inhibitrices particulières, les *complement regulatory proteins* (Zipfel *et al.*, 1994). Ainsi, cette protéine ne reste liée qu'à la surface des pathogènes où elle peut agir en tant qu'opsonine. Cela signifie qu'en recouvrant leur surface, elle facilite leur reconnaissance indirecte par d'autres *PRRs* portés en membrane par les cellules de l'immunité innée (Fig. 4). Elle est également une sous-unité d'une autre protéase du système du complément qui initie une voie aboutissant à la formation de pores à la surface du pathogène, les complexes d'attaque membranaire (MAC), qui provoquent la lyse du pathogène par déséquilibre osmotique (Fig. 3).

Premier composant de la voie classique du complément, la protéine C1q, souvent décrite comme capable de lier indirectement le pathogène en fixant le fragment constant (Fc) d'anticorps fixés à leurs antigènes spécifiques est un *PRR*. En effet, cette voie peut également être déclenchée par la liaison du C1q directement à la surface de certains pathogènes, en absence d'anticorps (Fig. 3) (Cooper, 1985).

La *Mannan-Binding Lectin* (MBL), structuralement similaire à la protéine C1q, est capable de lier des résidus mannoses et certains autres sucres accessibles à la surface de nombreux pathogènes et d'activer la voie de la *Mannan-Binding Lectin*, homologue à la voie classique (Fig.3).

b) Les protéines de phase aigue.

Il existe dans le plasma sanguin un autre groupe de *PRRs* solubles sécrétés par le foie lors de la phase précoce de la réponse immune, les protéines de phase aigue (Ramadori *et al.*, 1999). Parmi celles-ci, on trouve la protéine *C-réactive* (CRP), la *protéine amyloïde sérique* (SAP), les *surfactants pulmonaires A et D* (SP-A et SP-D) et la MBL (Fig. 5a). Cette réponse rapide fournit à l'organisme une série de protéines qui fixent une large variété de pathogènes et qui agissent toutes en tant qu'opsonine en facilitant leur phagocytose (Fig. 5b). La CRP et

Mécanismes déclenchés par la liaison PAMP-PRR	Description	Type de PRRs
Activation du complément	Le système du complément peut aboutir à la lyse du pathogène, contribuer à son opsonisation, et à la réponse inflammatoire via la génération de facteurs chimiotactiques solubles.	C1q, C3, MBL, CRP, SAP
Opsonisation	Marquage du pathogène par des PRRs (appelés opsonines) facilitant sa reconnaissance indirecte par des récepteurs de surface des cellules phagocytaires. Ou marquage par des opsonines reconnues les protéines activatrices du complément.	C3b, C4b, C1q, MBL, SP-A, SP-D, CRP, SAP
Induction de l'apoptose	Certains récepteurs, après liaison de leur ligand, induisent la mort de la cellule qui les exprime.	NALPs
Phagocytose	Internalisation du pathogène et induction de mécanismes anti-microbiens destinés à le dégrader dans un compartiment cellulaire, le phagolysosome.	FcR, CR1, CR3, CR4, SR-A, MARCO, MMR, Dectin-1, CD14
Réponse inflammatoire Action sur l'immunité innée	Activation de voies de transduction du signal au sein d'une cellule qui peuvent aboutir à la dégranulation de certains types cellulaires, à la génération de chemokines et de cytokines pro inflammatoires. Ces médiateurs agissent sur les vaisseaux sanguins locaux et les cellules de l'immunité innée pour permettre leur mobilisation et leur activation au site d'infection.	MDA-5, RIG-I, ADN-PKcs, NODs, NALPs, Dectin-1, TLRs,
Action sur l'immunité adaptative	A plus long terme, ces médiateurs contribuent au recrutement des lymphocytes effecteurs de l'immunité adaptative au site d'infection.	
Contribution à la présentation du pathogène aux lymphocytes de l'immunité adaptative.	Chez les cellules présentatrices d'antigènes (APCs), la phagocytose contribue au processing du pathogène suivi de la présentation de peptides dérivés aux acteurs de l'immunité adaptative pour les informer du danger et de sa nature.	MMR
	La reconnaissance d'un pathogène par les APCs induit leur maturation, en développant leur capacité de présentation via l'augmentation de l'expression des MHC, complexes moléculaires porteurs des fragments peptidiques de pathogènes à présenter aux lymphocytes.	CIITA
Induction de l'expression des signaux de costimulation	Les PRRs portés par les APCs induisent l'expression de signaux moléculaires, les signaux de costimulation, nécessaires conjointement à la présentation du pathogène, à l'activation de la réponse adaptative	TLRs
Orientation de la réponse adaptative	Les PRRs des APCs leur permettent, après avoir détecté et déterminé le type de pathogène, de sécréter des cytokines qui orientent l'immunité adaptative vers une réponse appropriée au type d'agent infectieux.	TLRs, dectin-1
Co-récepteur	Certains récepteurs, en coopérant avec d'autres récepteurs permettent à ces derniers de remplir leur rôle.	LBP, CD14, MD-2, CD36
Adhésion	Certains récepteurs peuvent contribuer via l'adhésion intercellulaire à la rétention des cellules de l'immunité au site d'infection	SR-As

Tableau 2. Mécanismes déclenchés lors de la liaison d'un PAMP par un PRR. Lors de l'infection d'un organisme par un pathogène, les PRRs agissent de concert pour assurer sa détection et son identification sur base de la nature des PAMPs et du lieu de leur reconnaissance. Après avoir lié le pathogène ou des fragments dérivés, les PRRs ont la capacité d'initier des mécanismes immunitaires dont la nature dépend du PAMP et de la collaboration des récepteurs qui le reconnaissent.

la SAP peuvent également lier la protéine C1q et activer la voie classique du complément alors que la MBL active la voie du même nom.

c) Les protéines LBP et CD14s, deux PRRs solubles du complexe récepteur du LPS.

La *LPS-Binding Protein* ou *LBP* est une protéine plasmatique capable de lier le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives, avant de le transférer à la protéine *CD14*, récepteur membranaire de surface des cellules de l'immunité innée ou à la *CD14s*, forme soluble du même récepteur (Schumann *et al.*, 1990). Il a été montré que la *LBP* a une action catalytique de lipide transférase. Ainsi, elle ne serait pas essentielle à l'activation du récepteur *CD14* mais elle accélérerait la liaison du LPS à celui-ci (Fig.6) (Hailman *et al.*, 1994). Le TLR4, en association avec la protéine MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999) lie le LPS présenté par *CD14* et complète le complexe de reconnaissance de ce *PAMP*.

2.4.2. Les PRRs cytoplasmiques.

Les virus, certaines bactéries pathogènes et certains parasites se répliquent au sein de cellules de l'hôte. L'immunité innée dispose de plusieurs *PRRs* solubles dans le cytosol qui détectent efficacement la présence de ces pathogènes intracellulaires.

Suite à la liaison de leur ligand, la plupart de ces *PRRs* initient des voies de signalisation induisant l'expression de gènes pro inflammatoires. Ceux-ci codent différentes cytokines et chemokines sécrétées par la cellule pour contribuer au développement d'une réponse adaptée au type d'agent infectieux.

a) MDA-5 et RIG-I, deux protéines cytoplasmiques détectant le dsRNA viral.

Lors d'une infection virale, les cellules infectées reconnaissent via des récepteurs cytosoliques, un pattern moléculaire typique de ces pathogènes, il s'agit généralement de l'ARN double-brin (dsRNA), souvent produit lors de la réplication des virus. Les protéines *RNA helicases MDA-5* (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) et *RIG-I* (*Retinoic-acid Inducible Gene 1*) sont des *PRRs* cytosoliques qui lient ce *PAMP* via leur domaine *helicase*. Elles portent également deux domaines CARD-like (Caspase recruitment domain - like) qui initient une voie de signalisation aboutissant, comme dans le cas du TLR3, à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3. Ceux-ci assurent l'induction de cytokines pro inflammatoires et d'interférons (IFN) de type I qui constituent un signal d'avertissement d'une cellule infectée à ses voisines (Fig. 7) (Yoneyama *et al.*, 2004). Notons qu'une certaine capacité de discrimination des virus à ARN par ces deux *PRRs* a été récemment mise en évidence (Kato *et al.*, 2006).

Le signal IFN induit l'expression de la protéine kinase PKR (*RNA-dependent Protein Kinase*) par la cellule qui le reçoit. Si les cellules sont infectées par le virus, le dsRNA active la PKR qui phosphoryle le facteur eucaryote d'initiation de la traduction eIF2 α et l'inactive (Balachandran *et al.*, 2000). Cela provoque l'inhibition de la traduction dans la cellule infectée et dès lors, l'incapacité du virus à se répliquer (Fig.8).

La 2'5'- oligoadenylate synthetase est également activée indirectement par la liaison d'ARN double-brin. Son activation induit la polymérisation de l'ATP en oligonucléotides atypiques liés en 2'-5' qui eux-mêmes activent une endoribonucléase dégradant les ARNs de la cellule infectée empêchant dès lors la réplication du virus (Fig.8).

b) L'ADN-PKc, une protéine cytoplasmique détectant l'ADN bactérien.

La protéine kinase dépendante de l'ADN (ADN-PK), activée par l'association avec des extrémités libres d'ADN est impliquée dans les mécanismes de réparation du génome (Smith *et al.*, 1999). Cependant, la sous-unité catalytique de cette enzyme, l'ADN-PKc peut

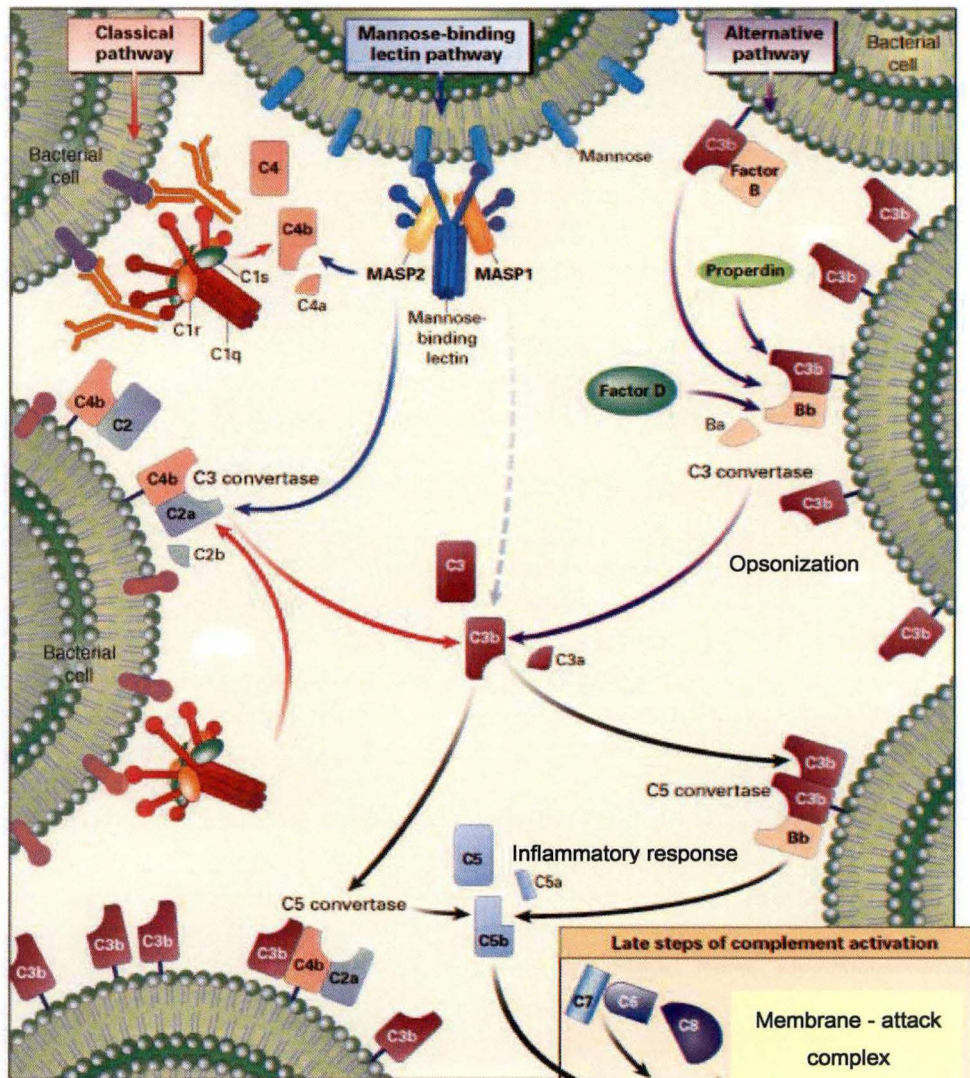


Figure 3. Les trois voies du système du complément (adapté de Walport, 2001).

La voie classique (à gauche) est initiée par la liaison de la protéine C1q (en rouge) directement au pathogène ou aux fragments constants des anticorps qui opsonisent celui-ci.

La voie MBL (au centre) est initiée par la protéine du même nom qui lie des résidus de mannose à la surface du pathogène. La voie alterne est activée suite à l'hydrolyse spontanée de la protéine C3. L'activation du complément à la surface du pathogène aboutit au dépôt de la protéine C3b qui agit en tant qu'opsonine. Elle peut aussi déboucher sur la formation du complexe d'attaque membranaire qui provoque la lyse du pathogène. Enfin, elle contribue au déclenchement et au maintien de la réponse inflammatoire, par la libération de peptides chimiotactiques.

également être directement activée par les motifs CpG non méthylés qui caractérisent l'ADN bactérien. Suite à son activation, l'ADN-PKc, en phosphorylant IKK β , active le facteur de transcription NF- κ B qui induit alors l'expression de gènes codant diverses cytokines et chemokines pro inflammatoires (Fig. 9). Cette protéine cytoplasmique a ainsi un rôle semblable à celui du TLR9 (Chu *et al.*, 2000).

e) Les NLRs.

Les *NLRs* (*NACHT* [domaine présent chez *NAIP*, *CIITA*, *HET-E* and *TP1*] - *LRR* [leucine-rich repeat domain] *Receptors*) constituent une famille de *PRRs* cytosoliques récemment identifiée (Martinon *et al.*, 2005), également baptisée par certains auteurs la famille *CATERPILLER* (*CARD*, transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of *LRRs*) (Ting *et al.*, 2005).

Les membres de la famille *NLRs* sont regroupés sur base de leur similarité structurale. Ils présentent tous une architecture tripartite. Ils possèdent un domaine carboxy(C)-terminal *LRR* de liaison d'un ligand, un domaine central *NACHT* nécessaire à l'oligomérisation et à l'activation du récepteur, et un domaine amino(N)-terminal effecteur particulier, *PYD* (pyrin domain), *CARD* (Caspase recruitment domain) ou *BIR* (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat). Sur base du type de domaine N-terminal porté, on distingue les sous-familles *NOD* (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) (Inohara *et al.*, 2005), *NALP* [*NACHT*-, *LRR*- and pyrin domain (*PYD*)-containing proteins] (Tschopp *et al.*, 2003), *CIITA* (Class II TransActivator), *IPAF* (ICE-protease activating factor) (Poyet *et al.*, 2001) et *NAIP* (Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein) (Diez *et al.*, 2000)(Fig. 10).

Bien que l'on présente ces protéines *NLRs* comme des senseurs cytoplasmiques de pathogènes, (Kufer *et al.*, 2005), à ce jour, seules trois d'entre elles, *NOD1*, *NOD2* et *NALP3* ont un *PAMP* identifié. Comme les *TLRs*, ces protéines reconnaissent des signatures moléculaires de pathogènes via leur domaine *LRR* et initient une voie de signalisation pro inflammatoire par recrutement de protéines adaptatrices au niveau de leur domaine N-terminal d'interaction protéine-protéine (Fig. 11 et 12).

Même si elles débouchent toutes les deux sur la génération de cytokines, les voies suivies par les protéines *NODs* et *NALPs* sont différentes. En effet, les *NODs*, tels les *TLRs* induisent l'expression des gènes de cytokines et chemokines pro inflammatoires alors que les *NALPs* contribuent à la maturation des précurseurs de certaines cytokines (*IL-1*, *IL-18*) (Fig. 12).

Parmi les 5 protéines humaines de la sous-famille *NOD*, *NOD1* et *NOD2*, principalement exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes (*APCs*) et les cellules épithéliales sont les mieux décrites. Ainsi, il a été montré qu'elles lient des peptides dérivés de la dégradation du peptidoglycan, un composant de la paroi bactérienne. *NOD1* détecte le Meso-DAP (γ -*D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*), un tripeptide caractéristique du peptidoglycan de la paroi des bactéries à Gram-négatif (Girardin *et al.*, 2003). *NOD2* reconnaît, lui, le dipeptide *MDP* (*Muramyl Dipeptide*) du peptidoglycan de la paroi de la majorité des bactéries (Inohara *et al.*, 2003). Après activation, ils agissent de façon analogue aux *TLRs* en activant les facteurs de transcription *NF- κ B* et *AP-1* (Fig. 11) (Kobayashi *et al.*, 2005). Ces voies aboutissent à l'induction de l'expression des gènes de cytokines pro inflammatoires (Philpott *et al.*, 2004). L'activation de *NOD1* et *NOD2* a été mise en évidence lors d'une infection respectivement par *Shigella flexneri* (Girardin *et al.*, 2001) et *Streptococcus pneumoniae* (Opitz *et al.*, 2004), deux bactéries pathogènes intracytoplasmiques.

Les protéines *NALPs*, qui forment la plus large sous-famille des *NLRs* avec ses quatorze membres chez l'homme (Fig. 10), sont impliquées dans la génération de cytokines et chemokines, après détection d'un pathogène, d'une autre façon que les *TLRs* et les protéines

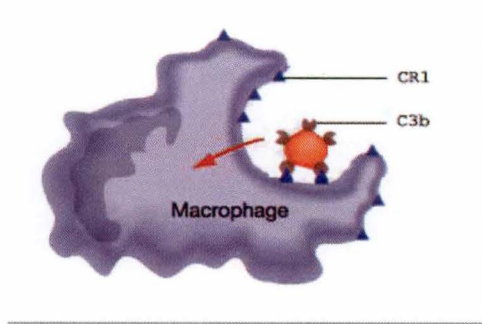


Figure 4. Opsonisation du pathogène par la protéine C3b. Les protéines C3b qui recouvrent la surface du pathogène (en rouge) sont reconnues par les *Complement Receptors* CR1 (en bleu) à la surface des cellules phagocytaires. La liaison CR1-C3b induit la phagocytose du pathogène

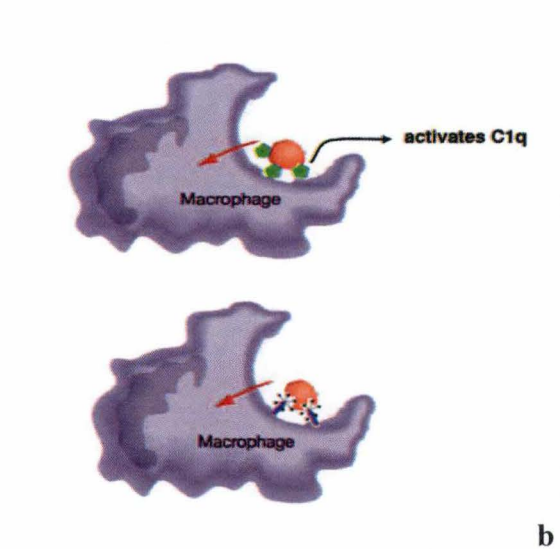
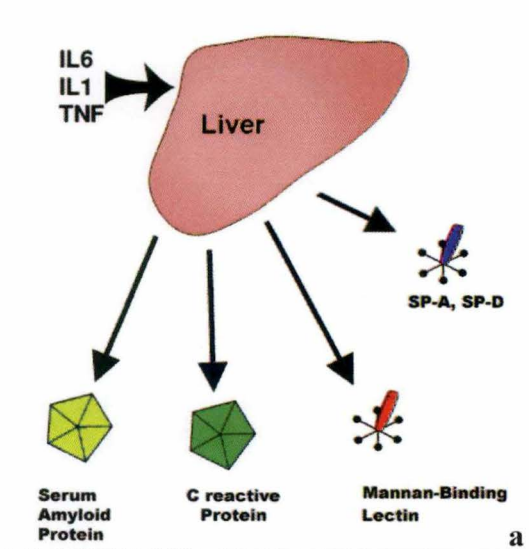


Figure 5. Les protéines de phase aiguë jouant un rôle de PRR soluble. (a) La protéine amyloïde sérique (SAP) et la protéine C-réactive (CRP) sont des pentraxines. La lectine liant le mannane (MBL) et les surfactants pulmonaires A et D (SP-A et SP-D) sont des collectines. (b) Elles sont toutes des opsonines et facilitent la reconnaissance du pathogène (en rouge) par les cellules phagocytaires. La CRP et la SAP activent la voie classique du complément. La MBL active la voie MBL.

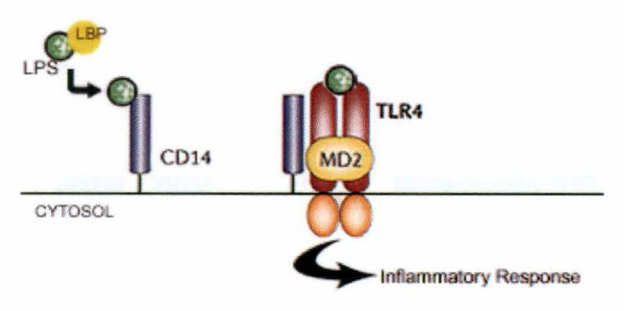


Figure 6. Les protéines impliquées dans la reconnaissance du LPS. La LBP soluble catalyse la liaison du LPS au récepteur CD14. Il présente ensuite son ligand au TLR4 associé au co-récepteur MD-2. La formation du complexe déclenche une voie de signalisation par le *TLR4*.

NODs. Ainsi, il a été montré que les protéines NALPs 1, 2, 3, 6 et 12 contribuent à l'activation de caspases inflammatoires au sein d'un complexe moléculaire connu sous le nom d'*inflammasome* (Fig. 12) (Martinon *et al.*, 2004). Ces caspases activées assurent la maturation, par clivage protéolytique, des précurseurs de cytokines pro inflammatoires (IL-1, IL-18), nécessaire à leur sécrétion. Bien que l'on pense que les protéines NALPs soient activées par la liaison de *PAMPs* par leur domaine LRRs, ceux-ci restent à découvrir. Néanmoins, on a montré que, de manière similaire à NOD2, NALP3 est activé par le MDP.

Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance des *PAMPs* par le LRR des protéines NALP3, NOD1 et NOD2 ne sont pas caractérisés et aucune interaction directe n'a été rapportée. Il est dès lors possible que l'activation de ces *PRRs* nécessite le concours d'autres récepteurs.

Malgré leur localisation, les *NLRs* ne sont pas cantonnés dans la reconnaissance de pathogènes se multipliant librement dans le cytosol mais ils contribuent également à la détection de pathogènes extracellulaires et vacuolaires. Dans ce cas, les *PAMPs* sont soit transportés activement dans le cytosol après phagocytose du pathogène (Fig. 12) ou non (Vavricka *et al.*, 2004), soit injectés par la bactérie elle-même (Viala *et al.*, 2004).

2.4.3. Les *PRRs* membranaires.

Les *PRRs* membranaires peuvent être exprimés à la surface d'une cellule où ils détectent des pathogènes extracellulaires, ou au niveau de la membrane d'une vacuole où ils lient des pathogènes après leur internalisation (Fig. 2). Ils sont distingués en récepteurs *non-TLRs* et en récepteurs *TLRs* (*Toll-Like Receptors*).

On leur a décrit deux fonctions qui ne semblent pas exclusives, l'induction de la phagocytose et le déclenchement d'une réponse inflammatoire.

Après reconnaissance du pathogène, certains *PRRs* exprimés à la surface de cellules phagocytaires, c'est-à-dire des macrophages, des PMNs et des cellules dendritiques, déclenchent son internalisation en initiant, par un processus actine-dépendant, la formation de pseudopodes autour de celui-ci (pour revue, voir (Underhill *et al.*, 2002)). Lorsqu'ils reconnaissent et lient directement un pathogène extracellulaire, la reconnaissance est dite non-opsonique. Dans les cas d'opsonisation, ces *PRRs* reconnaissent indirectement le pathogène puisqu'ils lient des *PRRs* solubles qui ont eux-mêmes lié et entouré le pathogène (Fig. 13). Suite à son internalisation, le pathogène est dégradé par différents mécanismes tels la diminution du pH et la libération d'enzymes et de métabolites toxiques dérivés de l'oxygène et de l'azote au sein du phagosome, dont certains sont induits suite à des voies de signalisation déclenchées par ces *PRRs*.

D'autres récepteurs membranaires initient quant à eux des voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la synthèse et la sécrétion de médiateurs pro inflammatoires.

a) Les récepteurs *non-TLRs*.

- Le *Mannose Receptor*.

Auparavant appelé MMR pour *Macrophage Mannose Receptor*, le récepteur au mannose (MR) est exprimé à la surface des macrophages et des cellules dendritiques où il reconnaît de nombreux types de pathogènes, bactéries gram-négatives ou positives, champignons, virus et parasites en liant des oligosaccharides de mannose et de fucose à leur surface (Apostolopoulos *et al.*, 2001) Après détection directe de pathogènes extracellulaires ou de molécules dérivées de celui-ci, il induit leur internalisation, leur dégradation et contribue à la présentation de fragments peptidiques aux lymphocytes de l'immunité adaptative (Stahl *et al.*, 1998).

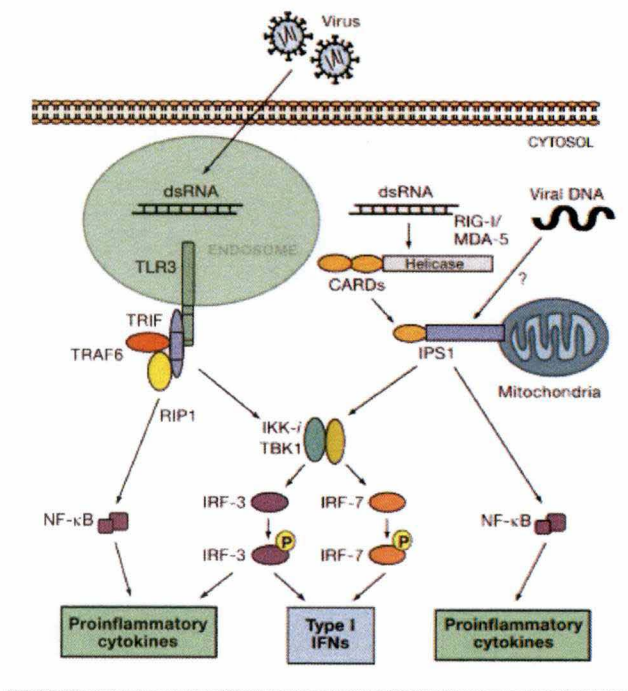


Figure 7. Détection des virus par les PRRs (d'après Akira et al, 2006). MDA-5 et RIG-I, deux PRRs cytosoliques et TLR3, un PRR exprimé en membrane des endosomes, sont impliqués dans la détection des virus. Ils initient des voies de transduction du signal qui aboutissent à la génération de cytokines pro inflammatoires et des interférons de type I.

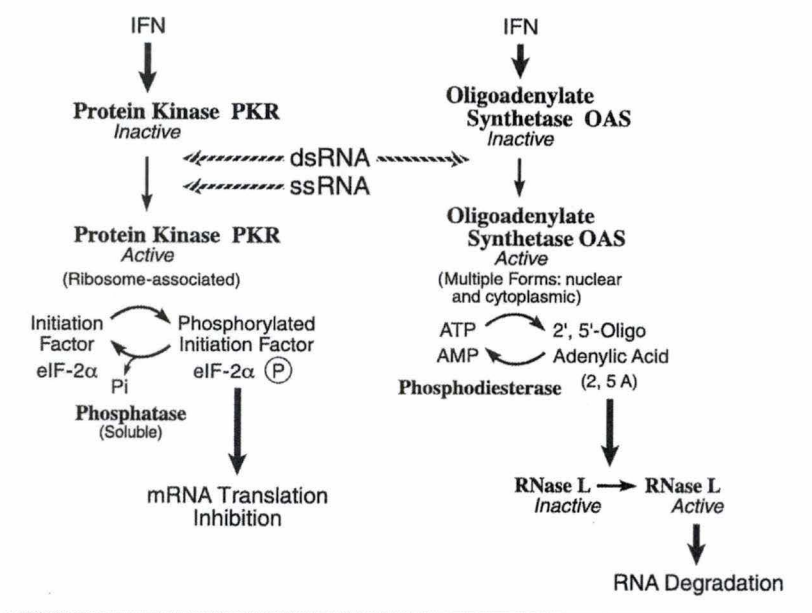
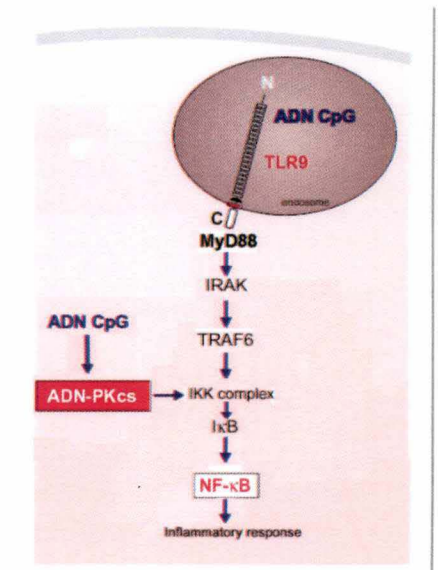


Figure 8. La PKR et l'OAS sont deux protéines antivirales induites par les IFN de type I et activées par le dsRNA (d'après Samuel, 2001). La PKR inhibe l'initiation de la traduction dans la cellule infectée, la 2'5' oligoadenylate synthetase y déclenche la dégradation des ARNs.

Figure 9. Le TLR9 et l'ADN-PKc sont deux PRRs reconnaissant l'ADN bactérien. Le TLR9 initie une voie de transduction du signal aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB (voir Fig. 27). La sous-unité catalytique de la kinase ADN-PK (ADN-PKcs) se branche sur cette voie en activant par phosphorylation IKKβ.



- La protéine Dectine-1.

A l'origine, la protéine dectine-1 (*dendritic-cell-associated C-type lectin-1*) fut décrite comme un récepteur spécifique des cellules dendritiques, bien qu'on ait montré par la suite qu'elle est également exprimée à la surface d'autres cellules de l'immunité, tels les macrophages, les monocytes, les PMNs, les lymphocytes T et, chez l'homme (pas chez la souris), il est aussi exprimé par les éosinophiles et les lymphocytes B (Taylor *et al.*, 2002) (Willment *et al.*, 2005).

Ce PRR est impliqué dans la réponse antifongique puisqu'il reconnaît les β -glucanes (Brown *et al.*, 2001), que l'on retrouve principalement dans la paroi de ces pathogènes. Par exemple, il reconnaît le zymosan de la paroi des levures.

La protéine dectine-1 est le seul récepteur membranaire *non-TLR* décrit capable de contribuer, en collaboration avec le TLR2, à la réponse inflammatoire en initiant des voies de signalisation qui induisent la production de cytokines et de chemokines (Fig. 14) (pour revue, voir (Brown, 2006). En outre, la dectine-1 est un récepteur phagocytaire puisqu'elle peut initier l'internalisation du pathogène (Herre *et al.*, 2004) et induire un mécanisme antimicrobien, l'*explosion respiratoire* (Underhill *et al.*, 2005).

- La protéine CD14.

Ancrée à la surface des monocytes, des macrophages et des PMNs, la protéine *CD14* (*Cluster of Differentiation 14*) lie le LPS de la membrane externe des bactéries gram-négatives (Wright *et al.*, 1990). Il existe également une forme soluble de la protéine *CD14* dans le sérum, la protéine *sCD14* qui permet aux cellules en contact avec le sérum qui n'expriment pas ce PRR en membrane de répondre au LPS (Frey *et al.*, 1992). La liaison de *CD14* à son ligand est facilitée par la protéine *LBP*. Le complexe *CD14-LPS* est ensuite reconnu par le TLR4 qui contribue au déclenchement d'une réponse inflammatoire (Fig. 6).

- Les scavenger receptors SRs.

Les récepteurs *scavengers* (SRs) sont largement exprimés par les macrophages et forment une famille de glycoprotéines membranaires possédant un ensemble de ligands endogènes apparentés, lipides et lipoprotéines modifiés chimiquement (Krieger *et al.*, 1994) Ils sont répertoriés en six sous-groupes, de la classe A (SR-A) à la classe F (SR-F), sur base de leur structure tertiaire prédite (Fig. 15). Parmi ces récepteurs, les SR-A, les SR-B et les SR-C ont un rôle dans l'immunité innée puisqu'ils reconnaissent des structures d'agents pathogènes (Krieger, 1997) (Gough *et al.*, 2000).

La classe des *SR-As* regroupe quatre récepteurs, les *SR-AI*, *SR-AII* et *SR-AIII*, et la protéine *MARCO* (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*). Ces récepteurs présents à la surface de la plupart des types de macrophages et de certaines cellules endothéliales (Hughes *et al.*, 1995) (van der Laan *et al.*, 1999) peuvent lier des bactéries gram-négatives et gram-positives suite à la reconnaissance du lipopolysaccharide LPS (Hampton *et al.*, 1991) et de l'acide lipoteïchoïque LTA (Dunne *et al.*, 1994) respectivement. Ils induisent alors, par des mécanismes peu connus une phagocytose silencieuse de ces ligands exogènes (Peiser *et al.*, 2000) (Hampton *et al.*, 1991). En effet, l'activation des *SR-As* ne semble pas accompagnée de la génération de médiateurs pro-inflammatoires. Outre leur capacité d'induire la phagocytose, le rôle des *SR-As* dans l'adhésion entre cellules semble impliqué dans la rétention des macrophages activés au site d'infection (van Velzen *et al.*, 1999).

A ce jour, on retrouve trois récepteurs dans la classe des *SR-Bs*, le *SR-BI*, le *SR-BII* et le *CD36*. Cette dernière reste la mieux décrite. Elle est exprimée à la surface des macrophages, des plaquettes, des adipocytes et de certaines populations de cellules endothéliales (Greaves *et al.*, 1998). Le premier *PAMP* connu de ce récepteur est exprimé à la surface des érythrocytes

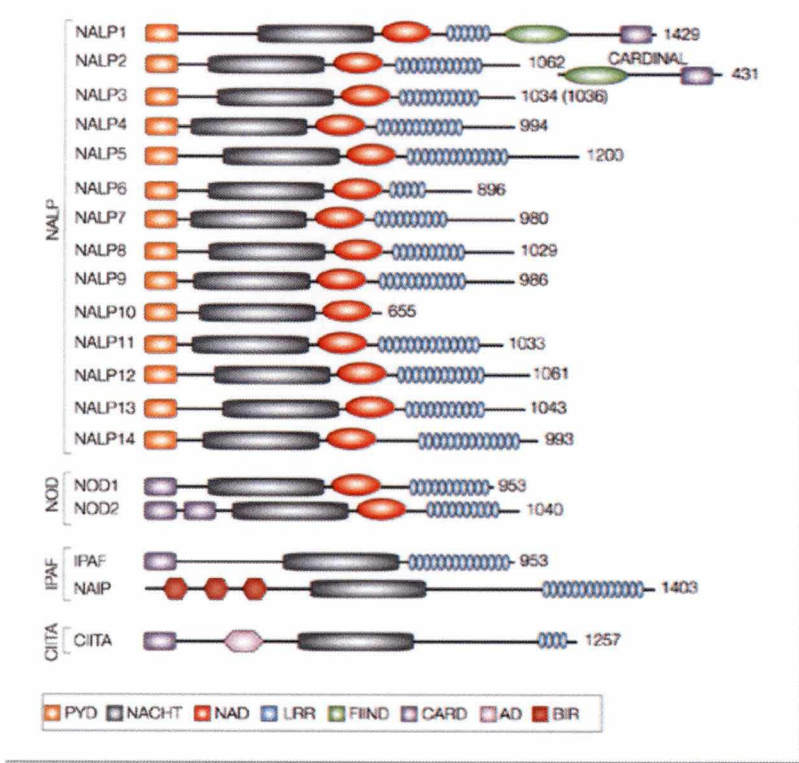


Figure 10. Classification des NLRs (d'après Tschopp et al., 2003).

AD, activation domain ; BIR, baculovirus IAP repeat (IAP, inhibitor of apoptosis protein) ; CARD, caspase-recruitment domain ; CIITA, class II transactivator ; FIIND, domain with function to find ; IPAF, ICE-protease activating factor ; LRRs, leucin-rich repeats ; NAD, Nacht-associated domain ; NAIP, neuronal apoptosis inhibitor protein ; NALP, domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1 ; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain ; PYD, pyrin domain.

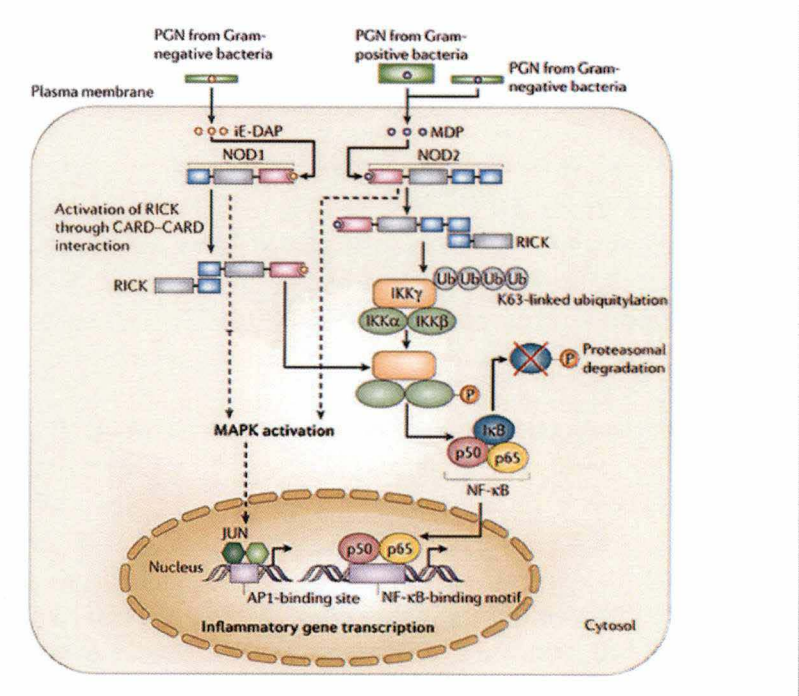


Figure 11. Voies de signalisation initiées après activation des protéines NODs (adapté de Strober et al., 2005).

Comme les TLRs, les protéines NOD1 et NOD2 déclenchent des voies de signalisation qui débouchent sur l'activation des facteurs de transcription NF-κB (via le complexe de kinases IKK) et AP-1 (via les MAP kinases).

ie-DAP, acide diaminopimélique ; IKK, IκB-kinase complex ; MDP, muramyl dipeptide ; P, groupement phosphate ; PGN, peptidoglycan ; RICK, receptor-interacting serine/threonine kinase ; ub, ubiquitine.

humains parasités par *Plasmodium falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989). En outre, CD36 est capable de reconnaître des acides gras diacylés de la paroi de divers microorganismes et de les présenter au dimère de TLR2-TLR6.

Bien que les mécanismes de reconnaissance des β -glucanes chez les vertébrés impliquent principalement la protéine dectine-1 et le CR3, c'est le récepteur *scavenger SR-CI* des macrophages qui, chez la drosophile, semble impliqué dans la réponse à ce PAMP (Pearson *et al.*, 1995).

- Les récepteurs d'opsonines.

Les cellules phagocytaires portent à leur surface des récepteurs assurant la reconnaissance indirecte de particules préalablement opsonisées pour induire leur internalisation et les mécanismes de dégradation.

Les *Complement receptors*, CR1, CR3 et CR4, en interagissant avec les opsonines du complément qui couvrent la surface du pathogène, déclenchent sa phagocytose. Le récepteur CR1 lie les protéines C3b, C4b, C1q et MBL (Ghiran *et al.*, 2000) (Klickstein *et al.*, 1997) (Nicholson-Weller *et al.*, 1999). Les récepteurs CR3 et CR4 lient la forme clivée de C3b, iC3b (Ehlers, 2000) (Ross *et al.*, 1992). En outre, le récepteur CR3 reconnaît directement les β -glucanes (Ross *et al.*, 1985) (Thornton *et al.*, 1996).

Les cellules phagocytaires disposent également d'un *C1q Receptor* (C1qR) qui lie les opsonines C1q, MBL et SP-A à la surface du pathogène (Nepomuceno *et al.*, 1997).

Elles portent également divers *Fc receptors* (FcR). Certains d'entre eux, en plus de fixer des anticorps qui entourent l'agent pathogène spécifiquement reconnu, peuvent lier la CRP et la SAP (Mold *et al.*, 2001).

b) Les TLRs.

Parmi les différents PRRs identifiés, on accorde actuellement beaucoup d'attention à l'étude des propriétés et des activités d'une famille de récepteurs transmembranaires initiateurs de voies de transduction du signal inflammatoire, les *Toll-like Receptors* ou TLRs.

- Historique de leur découverte.

Les récepteurs de membrane appartenant à la famille TLR tirent leur nom du récepteur *Toll* à l'origine impliqué, chez la drosophile, dans la différenciation dorsoventrale des embryons (Hashimoto *et al.*, 1988).

Cependant, deux études indépendantes ont marqué l'entrée du récepteur *Toll* dans le champ de l'immunologie. On a, d'une part, mis en évidence une similarité de séquence de son domaine intracellulaire à celui des membres de la famille du récepteur à l'interleukine 1 ou *IL-1R* des mammifères (Gay *et al.*, 1991). On retrouve également ce domaine intracytoplasmique, sur les produits de certains gènes de résistance des plantes à l'infection, les gènes *R* (Jebanathirajah *et al.*, 2002). Sur base de ces considérations, on a baptisé celui-ci *domaine TIR* pour *Toll-IL-1 Receptor* ou *Toll-IL-1-Resistance*. Par ailleurs, on a associé au récepteur *Toll* un rôle dans la réponse immunitaire de la drosophile à une infection fongique ou par des bactéries à Gram positif (Lemaître *et al.*, 1996).

Suite à la mise en évidence de ce rôle du récepteur *Toll* et à sa description structurale, un récepteur homologue portant un domaine *TIR* intracellulaire a été identifié chez les mammifères, le *Toll-like receptor 4* ou TLR4. Il est rapidement apparu que celui-ci avait la fonction d'un PRR. En effet, d'une part, il a été montré que ce TLR4 pouvait, après activation, induire l'expression de gènes pro-inflammatoires (Medzhitov *et al.*, 1997). D'autre part, on a associé le manque de sensibilité de certaines souches de souris au LPS à une mutation perte de fonction dans un gène appelé à l'époque *lps gene*, qui en fait code le TLR4 (Poltorak *et al.*,

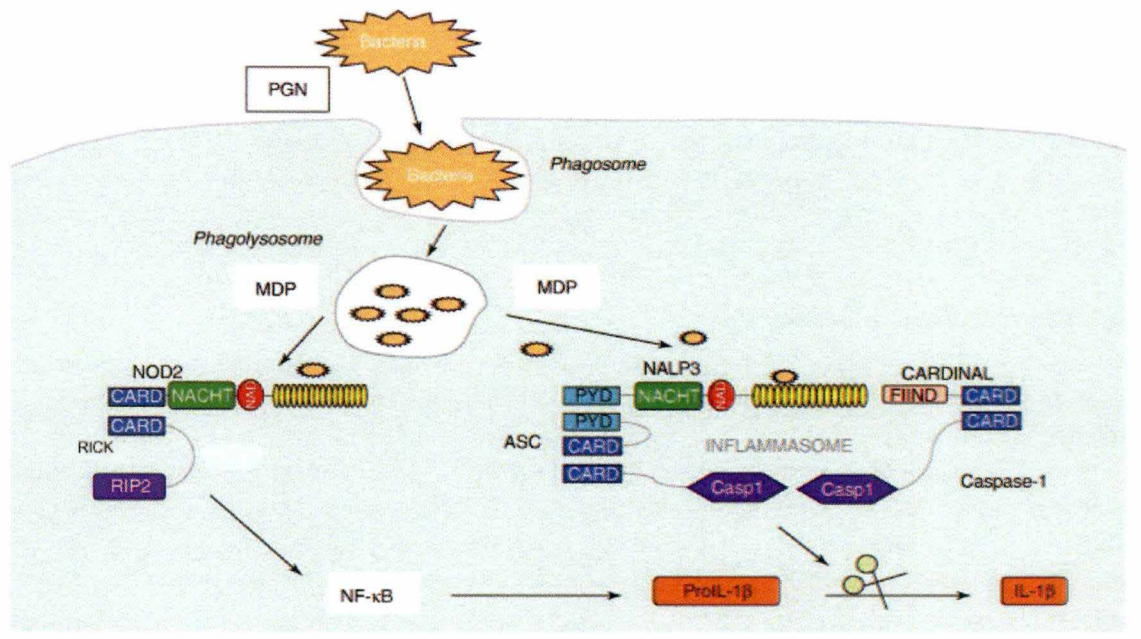


Figure 12. Les protéines NODs et NALPs contribuent à la réponse inflammatoire par des mécanismes différents (d'après Martinon & Tschopp, 2005). Les protéines NOD -1 et -2 sont activées par la liaison de leur PAMP au domaine LRR (en jaune). Elles activent des voies de signalisation qui aboutissent à la synthèse de cytokines pro inflammatoires. Certaines d'entre elles (IL-1 β , IL-18) sont synthétisées sous forme de précurseurs. Leur maturation est assurée par un complexe multiprotéique, l'inflammasome formé après activation de la protéine NALP3, qui reconnaît le même PAMP que NOD2, le MDP.

ASC, apoptosis-associated speck like protein containing a CARD ; CARDINAL, protéine adaptatrice (TUCAN, CARD8, NDDP1) MDP, muramyl dipeptide ; PGN, peptidoglycan ; ProIL-1 β , forme précurseur de l'IL-1 β ; RICK, receptor-interacting serine/threonine kinase ; ub, ubiquitine.

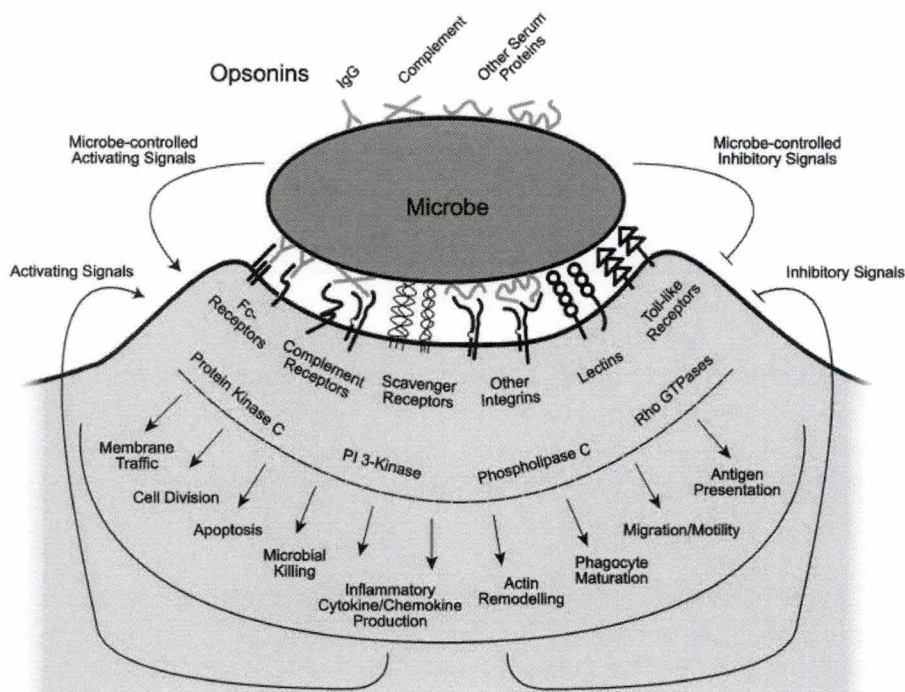


Figure 13. Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans la phagocytose (d'après Underhill et Ozinsky, 2002).

Plusieurs récepteurs portés à la surface des cellules phagocytaires reconnaissent le pathogène, soit

directement, soit en liant des opsonines qui recouvrent sa surface. La liaison des récepteurs à leur ligand déclenche des voies de signalisation qui provoquent une réorganisation du cytosquelette d'actine sous la membrane et la formation de pseudopodes autour du pathogène, ensuite internalisé.

1998). A l'heure actuelle, il est clairement établi que le TLR4 est, avec CD14 et MD2, un composant du complexe récepteur au *LPS* de la paroi des bactéries à Gram négatif (Takeuchi *et al.*, 1999).

- La famille *TLR*.

Depuis lors, plusieurs protéines structurellement similaires au TLR4 ont été découvertes. Elles ont mis en évidence la conservation des TLRs depuis le ver *Caenorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères (Janeway *et al.*, 2002). L'ensemble de ces protéines forment la famille des *Toll-like receptors* ou TLRs. Jusqu'à présent, treize membres de la famille TLR, du TLR1 au TLR13, ont été identifiés chez les mammifères (Kaisho and Akira, 2006). Parmi ceux-ci, les TLRs1-9 sont conservés chez l'homme (Rock *et al.*, 1998) et la souris ; le gène codant le TLR10 chez la souris, contrairement à l'homme, n'est pas fonctionnel (Hasan *et al.*, 2005), et les TLRs -11 (Zhang *et al.*, 2004), -12, et -13 sont exprimés chez la souris, pas chez l'homme (Fig. 16).

Tous les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. Elles possèdent un domaine intracytoplasmique conservé *TIR* impliqué dans l'initiation de la réponse, une région transmembranaire et une portion extracellulaire constituée d'un nombre variable (de 19 à 25) de répétitions riches en leucines, les motifs *LRRs* (*Leucin-Rich Repeats*), assurant la liaison du ligand.

- Classification.

Des études, basées principalement sur l'analyse du phénotype de souris mutées pour les gènes codant les différents membres de la famille des TLRs ont permis d'en comprendre la fonction physiologique, à savoir la reconnaissance de pathogènes. Et elles ont mis en évidence le large spectre de *PAMPs* de ces récepteurs, qui comprend des composants bactériens, viraux, fongiques et de protozoaires (Fig.17 et tableau 3) (pour revue, voir (Takeda *et al.*, 2003).

Le TLR2, en association avec le TLR1 ou le TLR6 reconnaît des lipopeptides triacylés et des lipopeptides diacylés, respectivement. Il dispose ainsi d'un large spectre de ligands au sein duquel, on retrouve un composant de la paroi des bactéries à Gram positif, l'acide lipoteichoïque (LTA) (Schwandner *et al.*, 1999) (Takeuchi *et al.*, 1999) (Yoshimura *et al.*, 1999). Contrairement à ce qui a longtemps été admis, le *peptidoglycan* ne semble pas reconnu par le TLR2 (Travassos *et al.*, 2004) et ce sont les protéines cytoplasmiques NOD1, NOD2 et NALP3 qui jouent un rôle central dans la reconnaissance de ce *PAMP*.

Le TLR3 reconnaît l'ARN double-brin (dsRNA) produit par de nombreux virus lors de leur replication (Alexopoulou *et al.*, 2001).

Comme mentionné plus haut, le *LPS*, et plus particulièrement le lipide A hexa-acylé, de la paroi des bactéries gram-négatives peut être lié par le TLR4 (Hoshino *et al.*, 1999). Outre ce *PAMP*, il reconnaît une série d'autres ligands n'ayant aucun lien structural (Tableau 3).

Le TLR5 reconnaît la flagelline, monomère constitutif du filament du flagelle de certaines bactéries (Hayashi *et al.*, 2001), et plus particulièrement, un domaine conservé de cette protéine. Ce domaine est requis pour l'assemblage et la mobilité du filament (Smith *et al.*, 2003)

Le TLR9 reconnaît spécifiquement les motifs *CpG* non méthylés caractéristiques de l'ADN bactérien. Il existe deux différences entre l'ADN des mammifères et l'ADN bactérien du point de vue de ces motifs CpG. Premièrement, contrairement à l'ADN bactérien, la fréquence des dinucléotides CpG est réduite dans l'ADN mammalien, et ensuite, la plupart des résidus cytosine des motifs CpG de l'ADN des mammifères sont méthylés, ce qui n'est généralement pas le cas dans l'ADN génomique bactérien (Hemmi *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été montré que les virus à ADN possèdent des génomes riches en

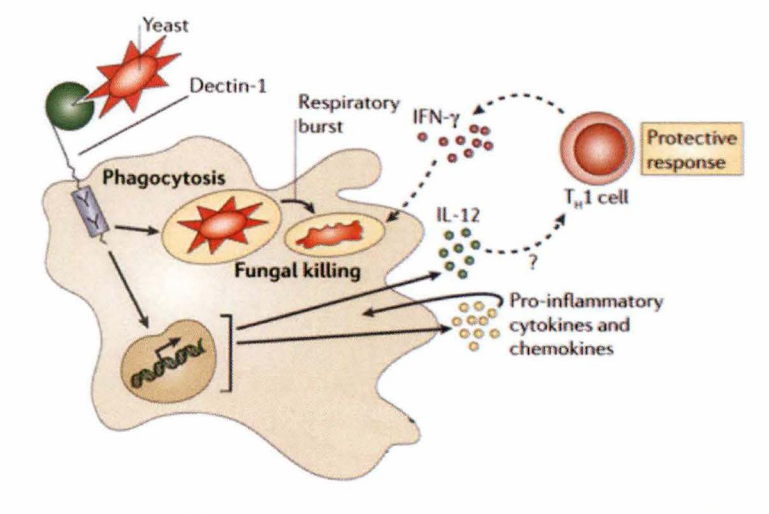


Figure 14. Les réponses cellulaires induites par la protéine dectine-1 (adapté de Brown, 2006). La reconnaissance de β -glucanes de la paroi de cellules fongiques par la dectine-1 induit la phagocytose du pathogène et la génération de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires. Celles-ci permettent le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée et contribuent à orienter la réponse adaptative.

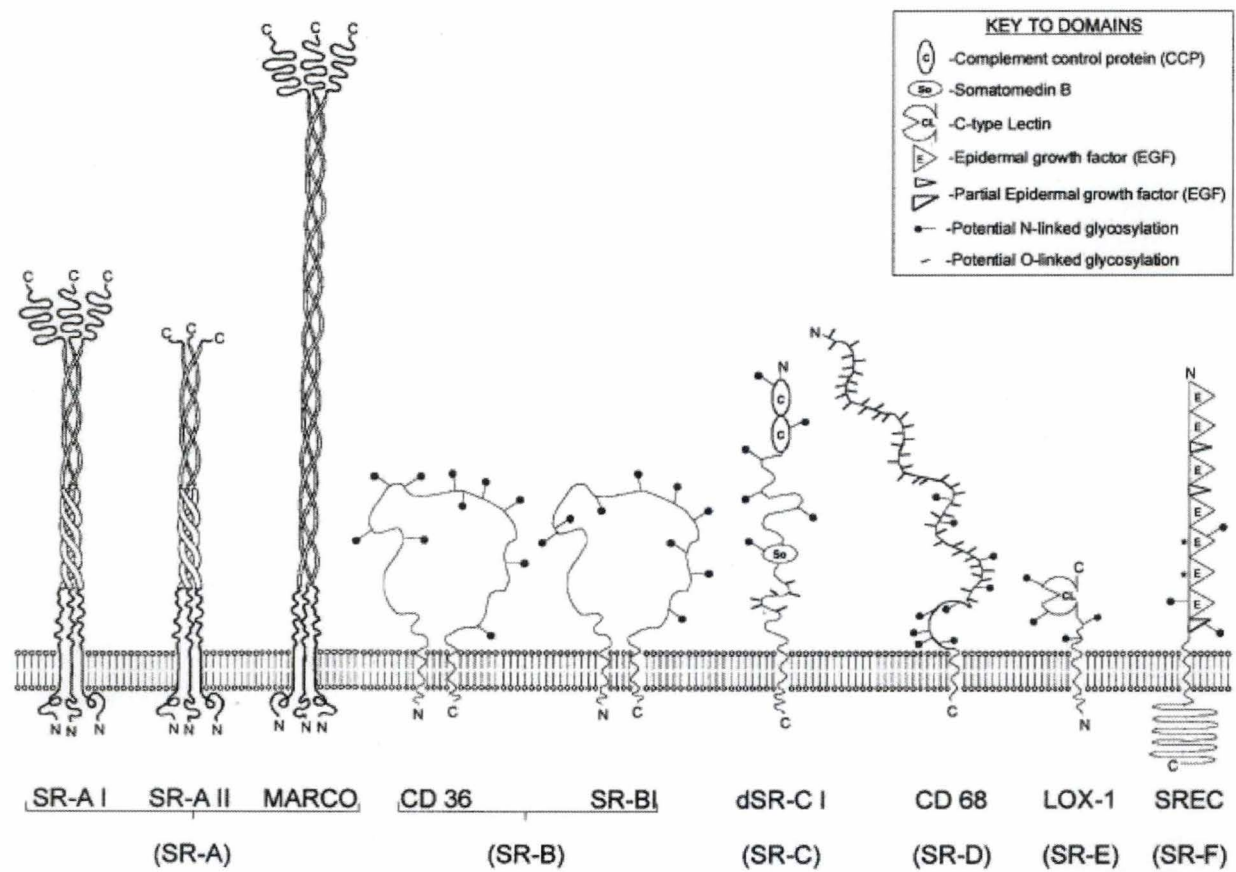


Figure 15. Représentation schématique de la structure des récepteurs scavengers (d'après Gough, 2000).

dinucléotides CpG qui stimulent le TLR9, assurant la génération de cytokines anti-virales (IFNs de type I) (Hochrein *et al.*, 2004) (Krug *et al.*, 2004) (Krug *et al.*, 2004) (Tabeta *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'activation du TLR9 par l'ADN génomique de différents protozoaires a été mise en évidence (Gazzinelli *et al.*, 2004).

Jusqu'à présent, aucun *PAMP* n'a été impliqué dans l'activation des TLRs -7 et -8. On sait cependant qu'ils sont activés par des molécules synthétiques de la famille des imidazoquinolines (Jurk *et al.*, 2002), par l'ARN simple-brin d'origine virale et qu'ils activent une réponse antivirale (Diebold *et al.*, 2004) (Heil *et al.*, 2004).

A ce jour, aucun ligand n'a été identifié pour le TLR10.

Le TLR11, exprimé chez la souris par les cellules épithéliales de la vessie est impliqué dans la réponse à une infection bactérienne des voies urinaires, le ligand responsable de cette activation reste inconnu (Zhang *et al.*, 2004). Par ailleurs, la protéine *profilin-like* présente chez certains protozoaires a été récemment décrite comme un ligand de ce TLR (Yarovinsky *et al.*, 2005).

- Distribution cellulaire et tissulaire.

La capacité des TLRs de reconnaître des pathogènes extracellulaires et intracellulaires est permise par leur distribution différentielle au sein d'une cellule donnée. Ainsi, il a été montré par marquage que les TLRs -1, -2, -4, et -6 qui reconnaissent des ligands lipidiques et le TLR5 à ligand protéique, sont associés à la membrane plasmique des cellules, alors que les TLRs -3, -7, -8 et -9 reconnaissant les acides nucléiques viraux et bactériens, sont portés par la membrane des endosomes (Nishiya *et al.*, 2004) (Fig. 18). La localisation subcellulaire particulière des TLRs est corrélée au type de pathogène reconnu et elle leur permet ainsi l'accès à leur ligand. Mais cette localisation peut aussi contribuer à la régulation de l'activation du récepteur. Ainsi, il a été proposé que la localisation intracellulaire du TLR9 contribuerait à empêcher son activation par l'ADN du soi. On sait en effet que l'ADN du génome des vertébrés contient des motifs CpG non méthylés, qui ne stimulent cependant pas le système immunitaire (Barton *et al.*, 2006).

Les TLRs sont des *PRRs* à large spectre d'expression, leur niveau d'expression est fonction du type cellulaire et il augmente lors de l'infection. Ils sont largement exprimés par les cellules de l'immunité innée, par les lymphocytes de l'immunité acquise, et par les cellules présentatrices d'antigène qui constituent un lien entre les deux bras du système immunitaire. Ils sont également exprimés par les cellules épithéliales, endothéliales, et par les fibroblastes.

- Des collaborations nécessaires à la reconnaissance des *PAMPs*.

Comme dans le cas des NLRs, les modalités de reconnaissance et de liaison des ligands via l'ectodomaine LRR des différents TLRs restent peu connues. Plus particulièrement, il n'y a actuellement aucune preuve que tous les TLRs interagissent directement avec leurs *PAMPs*. Une interaction directe du ligand spécifique a été démontrée dans le cas du TLR4 (Lien *et al.*, 2000), du TLR9 (Bauer *et al.*, 2001) et du TLR2 (Iwaki *et al.*, 2002)

Par ailleurs, la structure cristallographique de l'ectodomaine LRR du TLR3 humain a été récemment résolue (Choe *et al.*, 2005) (Bell *et al.*, 2005). Elle met en évidence la possibilité d'une interaction directe entre une portion précise de l'homodimère de TLR3 et le *dsRNA* viral (Fig. 19). De plus, les auteurs (Choe *et al.*, 2005) suggèrent que la liaison de celui-ci provoque un changement de conformation du dimère qui rapprocherait leur domaine TIR pour initier la signalisation intracellulaire (Fig. 20). De la même manière, on peut espérer que la caractérisation structurale du domaine extracellulaire de chaque TLR permette de comprendre comment ils interagissent avec des ligands aussi variés, en particulier, comment un type de TLR reconnaît une série de ligand qui n'ont aucun lien d'un point de vue structural

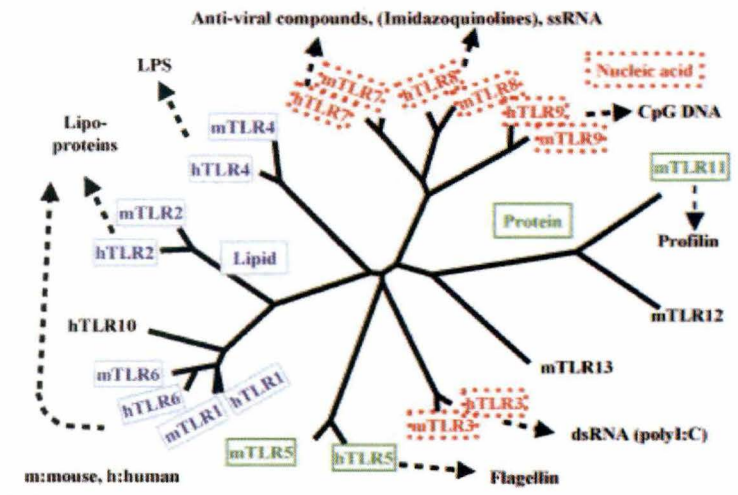


Figure 16. Arbre phylogénétique des TLRs humains et murins (d'après Kaisho & Akira, 2006). Les TLRs humains et murins sont connectés par des traits pleins sur base de l'analyse phylogénétique de leur séquence en acides aminés. La longueur du trait est proportionnelle à la distance évolutive. Les flèches en traits interrompus indiquent les ligands des TLRs ; en vert, les ligands protéiques ; en bleu, les ligands lipidiques ; en rouge, les acides nucléiques.

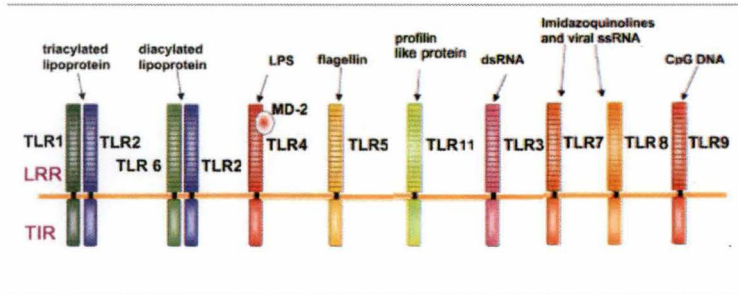


Figure 17. Représentation schématique de la structure des TLRs (adapté de Takeda & Akira, 2004). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires caractérisés par un domaine LRR extracellulaire de reconnaissance des PAMPs et un domaine TIR intracytoplasmique d'interaction avec des protéines adaptatrices. Ils reconnaissent des PAMPs variés.

TLRs	Ligands	Pathogènes
TLRs liant des lipides		
TLR1	Lipopeptides triacylés (avec TLR2)	Bactéries et Mycobactéries
TLR2	Lipopeptides triacylés (avec TLR2) Lipopeptides diacylés (avec TLR6) Acide Lipoteichoïque (avec TLR6) Peptidoglycan (?) Lipoarabinomannan Zymosan (avec TLR6) Phospholipomannan	Bactéries et Mycobactéries Mycoplasmes Bactéries gram-positives Bactéries Mycobactéries <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida albicans</i>
TLR4	Lipopolysaccharide Mannan Glycoinositolphospholipides	Bactéries gram-négatives <i>Candida albicans</i> <i>Trypanosoma</i>
TLR6	Lipopeptides diacylés (avec TLR2) Acide Lipoteichoïque (avec TLR2) Zymosan (avec TLR2)	Mycoplasmes Bactéries gram-positives <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLRs liant des acides nucléiques		
TLR3	ARN double-brin	Virus
TLR7	ARN simple-brin	Virus
TLR8	ARN simple-brin	Virus
TLR9	ADN : îlots CpG méthylés ADN viral	Bactéries Virus
TLRs liant des protéines		
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR11	? Profilin-like	Bactéries uropathogènes <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR4	Protéines d'enveloppe virale	RSV (Respiratory Syncytial Virus) MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus)

Tableau 3. Principaux ligands identifiés des TLRs et pathogènes qui les portent.

(par exemple, le TLR4 [tableau 3]) et, comment ils contribuent à induire la réponse via le domaine TIR.

A l'instar du TLR3, on sait que les TLRs -4, -5, -7, -8 et -9 forment des homodimères pour déclencher leur réponse. Le TLR2, quant à lui, s'associe à d'autres TLRs, ce qui contribue à élargir son spectre de patterns moléculaires reconnus. En effet, la reconnaissance des lipopeptides triacylés est assurée par l'hétérodimère TLR2-TLR1, tandis que la réponse aux lipopeptides diacylés implique leur reconnaissance par le dimère TLR2-TLR6 (Fig. 17) (Ozinsky *et al.*, 2000). Bien que son *PAMP* soit inconnu, il a été montré que le TLR10 s'associe également aux TLR2 et TLR1 (Hasan *et al.*, 2005). Ces TLRs -1, -2, -6 et probablement le TLR10 sont incapables d'initier seul une réponse (Ozinsky *et al.*, 2000).

Dans le cas de certains TLRs, la reconnaissance du ligand nécessite, une collaboration avec des *PRRs* d'autre type. Ainsi, le TLR4, pour répondre au LPS doit s'associer à CD14 et à MD2 (Fig. 6) (Miyake, 2003) Le récepteur *scavenger* CD36 (Hoebe *et al.*, 2005) présente à l'hétérodimère TLR2-TLR6 son ligand (Gantner *et al.*, 2003).

- En aval des TLRs, des voies de signalisation.

Les TLRs jouent un rôle critique dans la mise en place des réponses immunes innée et adaptative. En effet, leur activation induit la génération de chemokines et de cytokines pro inflammatoires qui créent au site d'infection un contexte favorable à l'élimination de l'agent pathogène, en permettant d'y recruter et d'activer rapidement les effecteurs de l'immunité innée, PMNs, macrophages, mais aussi les glycoprotéines du complément et les protéines de phase aigüe. De plus, les TLRs contribuent à la maturation des APCs c'est-à-dire à l'acquisition par celles-ci de tous les signaux nécessaires à la mise en place d'une réponse adaptative appropriée (Fig. 21). Le contexte pro inflammatoire créé au site d'infection permettra le recrutement des effecteurs développés au cours de celle-ci. Le rôle des TLRs dans la phagocytose des pathogènes est controversé (Blander *et al.*, 2004) (Yates *et al.*, 2005).

Contrairement aux mécanismes d'activation des TLRs, leurs voies de signalisation sont bien décrites (pour revues, voir (O'Neill, 2006) ; (Oda *et al.*, 2006). Elles dépendent toutes du recrutement et de l'activation au niveau du domaine TIR intracellulaire du TLR, de protéines adaptatrices cytoplasmiques portant également ce même domaine. Les interactions homotypiques TIR-TIR jouent donc un rôle critique dans la réponse des TLRs.

• TIR, domaine central du traitement de l'information.

Les domaines *TIR* des TLRs et des membres de la famille de l'*IL-1R* ont des séquences hautement conservées groupées en motifs, les *Box -1, -2 et -3* (Slack *et al.*, 2000) Cependant, malgré la similarité de leur domaine intracytoplasmique, il a été montré que les TLRs, disposent d'une certaine spécificité en terme de protéines adaptatrices recrutées par interaction homotypique (Fig. 22), pour initier des voies de signalisation distinctes et donc des réponses spécifiques (Fig. 23).

La compréhension de cette spécificité de réponse des TLRs passera par la description de la structure moléculaire de l'interface entre ces différents récepteurs et leurs protéines adaptatrices, et des changements de conformation qui ont lieu au cours de leur activation.

Ainsi, la structure cristallographique du domaine TIR des TLR1 et TLR2 humains a été résolue (Xu *et al.*, 2000). En dépit de leur haute similarité de séquences en acides aminés (50% d'identité) et d'une structure tridimensionnelle globale identique consistant en un feuillet- β parallèle de cinq brins, entouré par un total de cinq hélices- α (Fig. 24), le domaine TIR de ces TLRs présente des différences de conformation notamment au niveau d'une portion de la *box2* appelée le *BB loop* (Fig. 25). Le rôle de la *box2* dans le recrutement des protéines adaptatrices avait déjà été proposé suite une étude de mutagenèse du domaine TIR de l'*IL-1R* (Slack *et al.*, 2000)

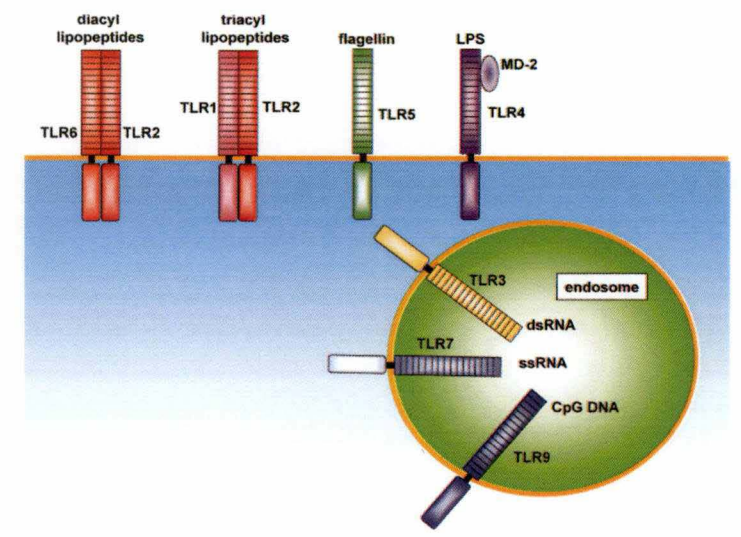


Figure 18. Localisation subcellulaire des *TLRs* (d'après Akira, 2005). Les *TLRs* -1, -2, -4,-5 et -6 sont exprimés à la surface des cellules, les *TLRs* -3, -7 et -9 sont portés par la membrane des endosomes.

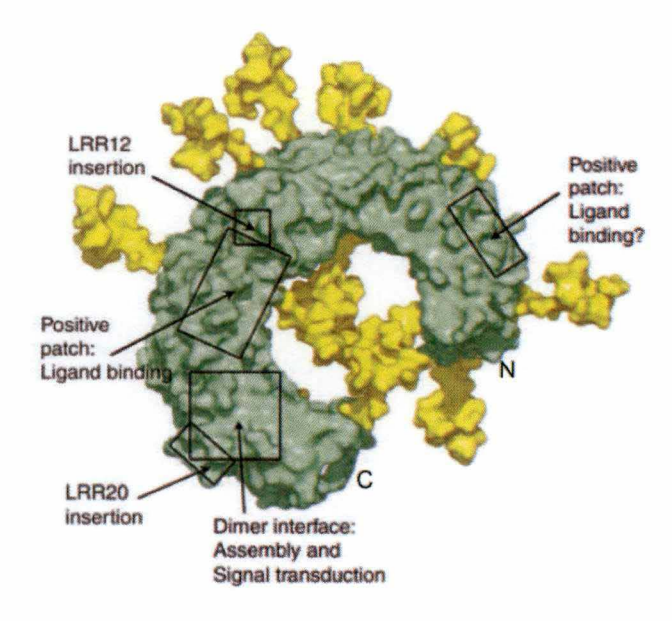


Figure 19. La structure de la surface de l'ectodomain du *TLR3* humain met en évidence des régions de surface impliquées dans la dimérisation du récepteur et la liaison du dsRNA (d'après Choe, et al, 2005). L'ectodomain du *TLR3* humain a une structure en « fer à cheval » de 23 LRRs, replié en solénoïde. Cette structure est maintenue par un réseau de ponts hydrogènes formés par des résidus Asn conservés au sein des motifs LRRs. Une face du *TLR3* est largement masquée par des carbohydrates (en jaune), et la face *glycosylation-free* (face au lecteur) est impliquée dans la dimérisation du récepteur et la liaison de son ligand. Des résidus de surface hautement conservés et le motif LRR12 particulier constituent l'interface de dimérisation. Deux patches de résidus chargés positivement et le motif LRR20 particulier formeraient le site de liaison du dsRNA.

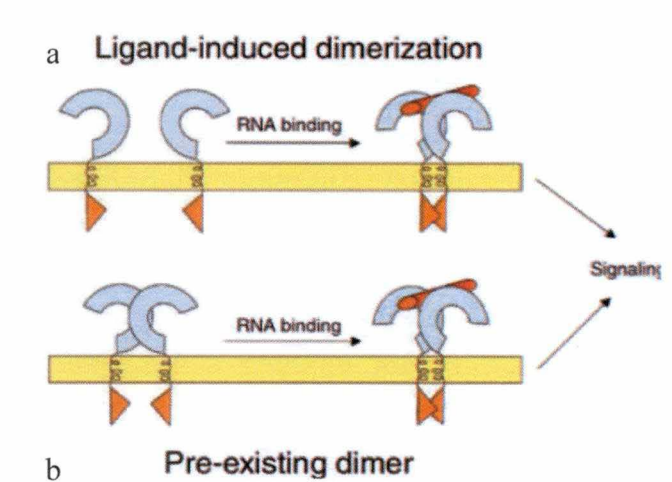


Figure 20. Modèles de reconnaissance du dsRNA par l'ectodomain du *TLR3* (d'après Choe, et al, 2005). La liaison du *PAMP* seul, ou en présence d'un co-récepteur pourrait induire la dimérisation du récepteur ou induire des changements de conformations d'un dimère de *TLR3* préexistant. Le rapprochement des domaines TIR intracellulaires déclencherait les voies de signalisation.

Par ailleurs, les souris C3H/HeJ qui ne répondent pas au LPS et qui, comme évoqué plus haut, ont permis la découverte du TLR4, sont mutées au niveau d'un acide aminé du sommet de ce même *BB loop* qui ne peut dès lors initier une réponse intracellulaire (Fig. 26).

Bien que l'implication du *BB loop* dans l'interaction des TLRs avec leurs protéines adaptatrices reste à prouver, la mise en évidence de la conservation des résidus de cette portion du domaine TIR (Fig. 26) et d'une probable diversité structurale (Fig. 25) de celle-ci porte à croire qu'il pourrait jouer un rôle crucial dans la spécificité d'élaboration de complexes multiprotéiques de signalisation des différents TLRs.

Deux types de voies de transduction du signal ont été identifiées sur base du recrutement ou non au niveau du domaine TIR du TLR de la protéine adaptatrice *MyD88* (*Myeloid differentiation primary response protein 88*). Cette protéine adaptatrice possède un domaine TIR C-terminal et un *Death Domain* (DD) N-terminal. Ils sont tout deux des domaines d'interaction homotypique protéine-protéine.

- **La Voie MyD88-dépendante.**

On pense que la voie dépendante de *MyD88* peut être déclenchée par tous les TLRs sauf le TLR3. Le rôle central de cette protéine dans l'induction de la réponse des TLRs -2, -4, -5, -7 et -9 activés a été démontré chez des souris *MyD88 knockout* (Kawai *et al.*, 1999) (Takeuchi *et al.*, 2000) (Hemmi *et al.*, 2000) (Hayashi *et al.*, 2001).

Cette voie de signalisation (Fig. 27), semblable à celle déclenchée par les récepteurs à l'IL-1 et l'IL-18 aboutit à l'activation des facteurs de transcription *NF- κ B* et *AP-1* qui induisent l'expression de gènes codant des cytokines et chemokines pro inflammatoires (le *TNF- α* , l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-12) sécrétées par la cellule.

Après liaison du ligand à l'ectodomaine *LRR*, la protéine adaptatrice cytoplasmique *MyD88* est recrutée au niveau du TLR par une interaction homotypique de leur domaine *TIR* respectif. Lors de l'activation des TLRs -2 et -4, le recrutement de *MyD88* nécessite une autre protéine adaptatrice à domaine *TIR*, la protéine *Mal* (*MyD88 adaptor like*) ou *TIRAP* (*TIR domain-containing adapter protein*). L'utilisation de cette protéine pourrait contribuer à conférer une spécificité de réponse à ces deux TLRs. *MyD88* interagit alors via son domaine DD (*Death Domain*) aminoterminal avec le même domaine DD porté par des serine/thréonine kinases de la famille IRAK (*IL-1 Receptor-Associated Kinase*). Ensuite sont recrutés successivement TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6) et TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1). Le complexe multiprotéique formé sous la membrane se détache du récepteur et constitue un complexe plus large dans le cytosol où une série de phosphorylations et d'ubiquitination lui permet d'activer d'une part, le facteur de transcription *NF- κ B* (via le complexe de kinases IKK) et d'autre part, le facteur de transcription *AP-1* (via les MAP kinases telle la p38 ou JNK).

- **La Voie MyD88 indépendante.**

Les TLRs -3 (Alexopoulou *et al.*, 2001) et -4 (Kawai *et al.*, 1999) peuvent déclencher une voie de transduction du signal indépendante de *MyD88*, en recrutant en lieu et place de celle-ci une autre protéine adaptatrice à domaine *TIR*, la protéine *TRIF* (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*), encore appelée *TICAM-1* (*TIR domain-containing adaptor molecule-1*). Cette voie implique des protéines kinases différentes qui en aval activent un autre facteur de transcription, l'IRF-3 (Fig. 27). Ce dernier induit principalement l'expression du gène de l'*IFN- β* , qui induit le facteur de transcription Stat1 qui à son tour induit l'expression des *IFN-inducible genes*. De plus, dans le cas du TLR4, l'activation de *TRIF* par le LPS nécessite la protéine adaptatrice à domaine *TIR*, TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Elle induit dans ce cas l'activation retardée de *NF- κ B* (Covert *et al.*, 2005).

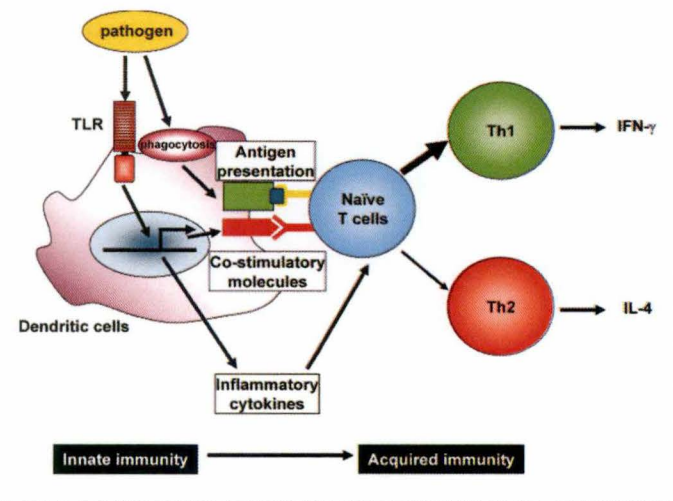


Figure 21. Les TLRs contribuent à la maturation des APCs (d'après Takeda & Akira, 2005) L'activation des TLRs portés par une APC induit l'expression des signaux de costimulation et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par celle-ci. Ces signaux, en plus de la présentation d'antigène aux lymphocytes T naïfs sont essentiels à la mise en place et à l'orientation de la réponse adaptative.

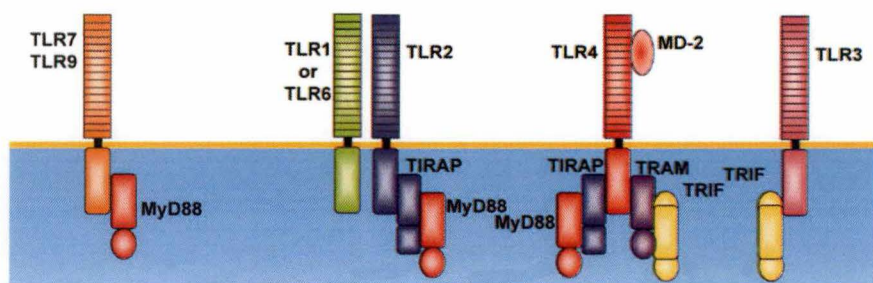


Figure 22. Les différents TLRs recrutent des protéines adaptatrices spécifiques au niveau de leur domaine TIR (d'après Akira, 2005). Selon le complexe multiprotéique formé, des voies de signalisation différentes sont initiées.

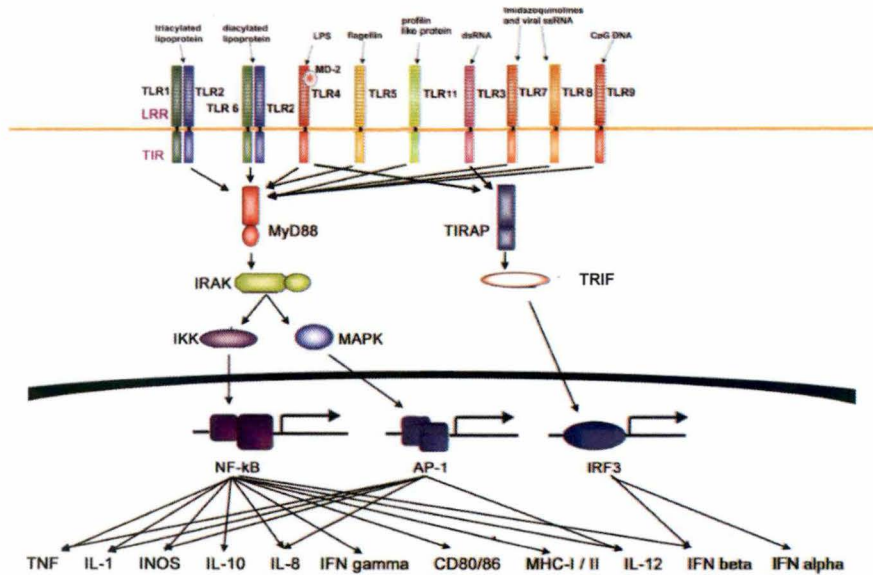


Figure 23. Représentation simplifiée des voies de signalisation déclenchées par les TLRs (réalisée à partir de Kitano & Oda, 2006).

Chaque TLR déclenche une voie de transduction du signal qui aboutit à la génération de cytokines et de chemokines et, sur les cellules présentatrices d'antigènes, à l'induction de l'expression de signaux costimulateurs (CD80/86) ainsi qu'à l'augmentation de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité, deux acteurs moléculaires impliqués dans l'activation de la réponse adaptative. La réponse différentielle de chaque TLR peut être expliquée en partie par leur usage différent des protéines adaptatrices. La combinaison de cytokines produites dépend de la combinaison de TLRs qui ont contribué à la reconnaissance du pathogène..

- **Des collaborations nécessaires au traitement de l'information.**

Des coopérations entre les TLRs et des PRRs impliqués dans la réponse inflammatoire dont on a déjà parlé, à savoir le récepteur membranaire Dectine-1 et les protéines cytoplasmiques NOD1 et NOD2 ont été récemment décrites.

Ainsi, l'induction de certaines cytokines pro-inflammatoires par la Dectine-1 nécessite des signaux résultant de l'activation de l'hétérodimère TLR2-TLR6 tels MyD88 et NF- κ B. La coopération entre ces deux types de PRRs qui lient des PAMPs différents assurerait la reconnaissance d'un pathogène fongique et ils déclencheraient ensemble la réponse inflammatoire (Fig. 28) (Gantner *et al.*, 2003)

L'activation de NOD2 concomitante à celle du TLR2, assure une régulation de la voie de signalisation initiée par ce dernier, en agissant au niveau du complexe IKK de kinases (Fig. 29a). Par ailleurs, des cross-talks entre les voies de signalisation initiées par NOD2 et TLR4 ont été proposés. Le TLR4, après activation augmente l'expression de NOD2, qui lui, augmente l'expression de MyD88. De plus, il favorise l'activation du complexe IKK de kinases. Ainsi, NOD2 favorise l'activation de la voie MyD88-dépendante initiée par le TLR4 (Fig. 29b).

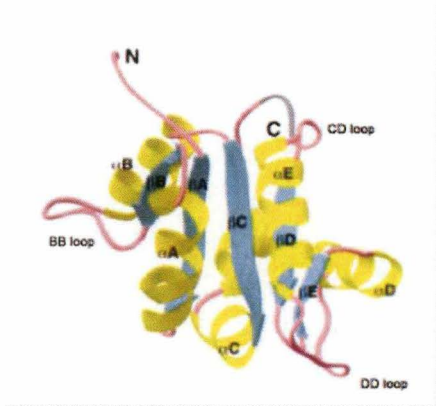


Figure 24. Structure du domaine TIR du *TLR2* humain (d'après Xu et al., 2000). Il est constitué d'un feuillet β à brins parallèles (en bleu, de βA à βE) entourés par un total de cinq hélices- α (en jaune, de αA à αE). Des loops (en rose) relient ces structures.

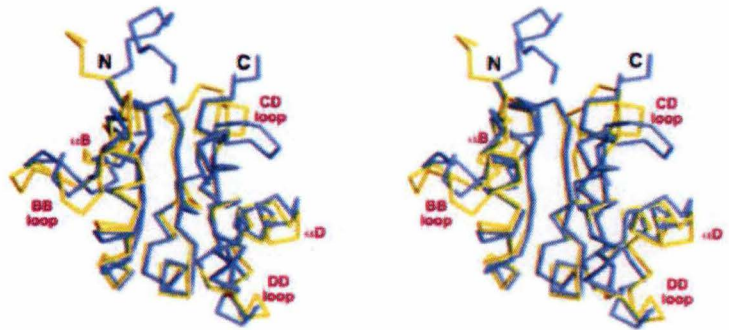


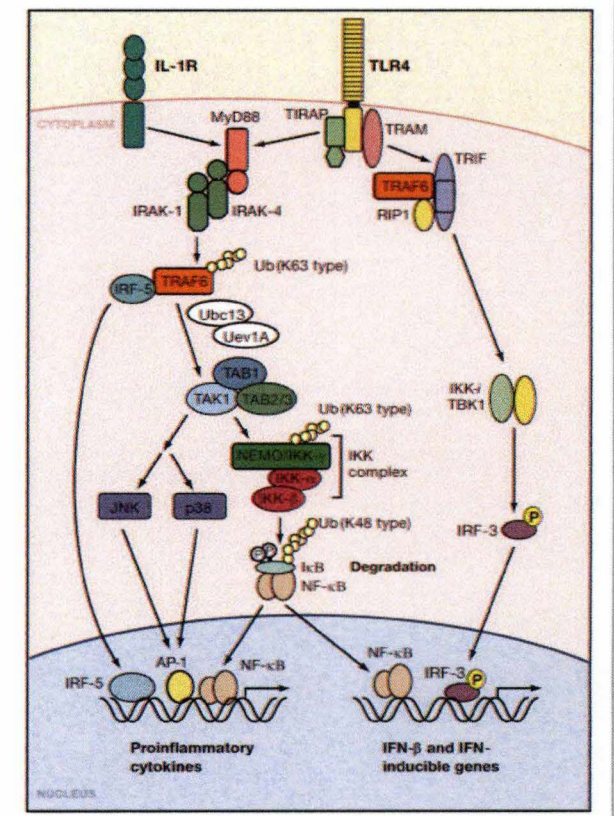
Figure 25. Superposition du squelette carboné des structures du domaine TIR des *TLR1* et *TLR2* humains (d'après Xu et al, 2000)

Le *TLR1* apparaît en bleu et le *TLR2* en jaune. La deuxième représentation est obtenue après une rotation de 180°C de la première. Malgré leur similarité de séquences, les domaines TIR des *TLR-1* et *-2* humains présentent des différences de conformation. Ces régions différentes sont annotées en rose.



Figure 26. La structure de surface du domaine TIR du *TLR2* humain montre un patch de résidus conservés impliquant des résidus du BB loop (d'après Xu et al, 2000). Les résidus conservés se trouvent dans des brins du feuillet β (bleu), dans des hélices α (jaune), dans le BB loop (mauve) et dans d'autres loops (vert). En rouge, apparaît le site de mutation du *TLR4* qui empêche sa réponse au LPS.

Figure 27. Voies de signalisation initiées par les TLRs (d'après Akira et al, 2006). Les voies MyD88 dépendante et MyD88 indépendante sont représentées respectivement à gauche et à droite.



Cette première partie a tenté de mettre en évidence la base solide sur laquelle repose le système immunitaire, à savoir la reconnaissance des agents pathogènes par les récepteurs de l'immunité innée. Ces sentinelles omniprésentes dans l'organisme peuvent percevoir à tout moment la présence d'un intrus et de mobiliser les mécanismes effecteurs de défense dès que nécessaire.

En particulier, on a mis l'accent sur une famille de récepteurs, les TLRs, qui reconnaissent chacun spécifiquement des *PAMPs* de pathogènes variés. Théoriquement, à elle seule, cette famille permet à l'organisme hôte de reconnaître et de discriminer une grande diversité de pathogènes bactériens, viraux, fongiques, protozoaires qu'ils soient intracellulaires ou extracellulaires ; et chaque TLR initie sa propre cascade de transduction du signal et déclenche ainsi une réponse appropriée au type d'agent infectieux en présence. Les TLRs illustrent une certaine capacité de discrimination et d'adaptation de l'immunité innée.

B. Anti-immunité : le principe de la reine rouge à l'œuvre.

1. Généralités.

Lors de l'invasion par un pathogène, l'hôte peut détecter ce danger potentiel pour ensuite le combattre efficacement au moyen des mécanismes effecteurs du système immunitaire (Fig. 1).

D'un point de vue évolutif, on peut considérer que cette capacité de défense émerge de la cohabitation de l'organisme avec une grande diversité de pathogènes. Ainsi, la présence permanente de ceux-ci a en quelque sorte obligé les organismes hôtes à développer des mesures efficaces de détection et de protection.

Mais, si les agents infectieux, par la pression qu'ils imposent à l'organisme, ont façonné le système immunitaire au cours de l'évolution, en contrepartie, l'énorme contrainte représentée par ce même système pour les pathogènes a débouché sur l'acquisition, par ceux-ci, de stratégies variées destinées à tromper, à manipuler et à empêcher le bon déroulement de la réponse immune. Et le succès de nombreux pathogènes ne fait qu'attester leur capacité à tirer profit des niches proposées par un organisme tout en évitant leur élimination.

Cet équilibre dynamique entre l'agent pathogène et l'hôte qu'il infecte a ouvert un volet d'investigation nouveau qualifié par Brett Finlay d'"anti-immunologie" (Finlay *et al.*, 2006).

Dans ce contexte de coévolution, chacun a beaucoup à apprendre de l'autre, de ses forces et de ses faiblesses. Les exemples de stratégies développées par les bactéries, les virus et les protozoaires pour passer entre les mailles du filet tendu par le système immunitaire sont très divers, depuis la capacité d'adhérer aux surfaces de l'hôte en faisant face à un environnement peu favorable, à celle de paralyser voire de détruire les mécanismes immunitaires effecteurs. Pour une information plus complète sur ces stratégies d'immunoévasion qui agissent à chacune des étapes de la réponse immunitaire, on renvoie le lecteur à des revues récentes (Finlay and McFadden, 2006), (Portnoy, 2005), (Hilleman, 2004) (Coombs *et al.*, 2004) (Rosenberger *et al.*, 2003) (Hornef *et al.*, 2002) (Sacks *et al.*, 2002) (Knodler *et al.*, 2001) (Pieters, 2001).

Nous nous focaliserons dans cette partie sur les mécanismes d'interférence de virus et de bactéries avec la reconnaissance par les *PRRs* solubles ou cellulaires en distinguant trois points : (i) la capacité d'échappement au système du complément, (ii) la possibilité de modifier des *PAMPs* ou la possession de *PAMPs* atypiques et enfin, (iii) la capacité d'interférer avec les voies de transduction du signal initiées par les *PRRs* cellulaires. Leurs nombreuses autres stratégies sont résumées dans le tableau 4.

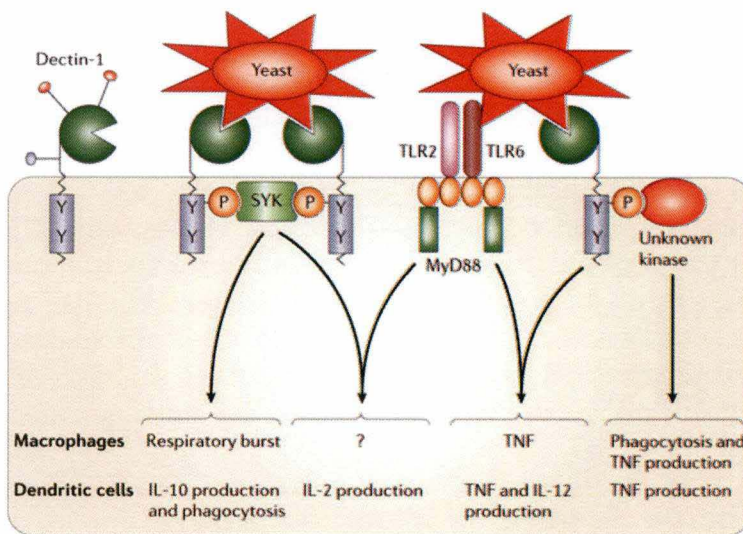


Figure 28. Coopération entre la *dectin-1* et l'hétérodimère *TLR2-TLR6* pour déclencher une réponse inflammatoire lors d'une infection fongique (d'après Brown, 2006). Des cross-talks entre les voies de signalisation initiées par la *dectin-1* et l'hétérodimère *TLR2-TLR6* semblent nécessaires à la génération de cytokines pro inflammatoires.

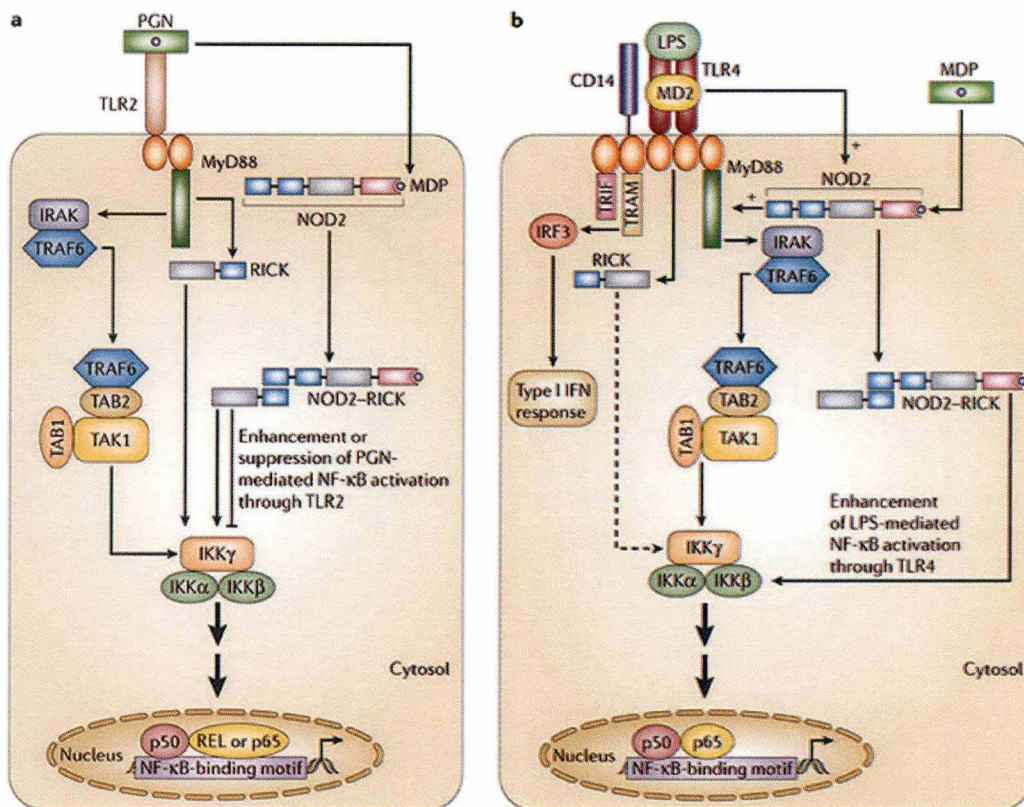


Figure 29. Cross-talks entre les voies de signalisation initiées par NOD2 et les TLRs -2 (a) et -4 (b) pour déclencher une réponse inflammatoire (d'après Brown, 2006). (a) NOD2, après activation, module l'activation du facteur de transcription NF- κ B initiée le TLR2, en agissant au niveau du complexe IKK de kinases. (b) NOD2 favorise également l'activation de NF- κ B en aval de la voie MyD88-dépendante initiée par le TLR4. L'activation de ce dernier augmente l'expression de NOD2 qui, lui contribue à augmenter l'expression de MyD88. De plus, NOD2 favoriserait l'activation du complexe IKK, par un mécanisme différent que celui proposé en (a).

2. Échapper au système du complément.

De nombreux agents pathogènes ont développé divers mécanismes d'échappement au complément, c'est-à-dire à l'opsonisation par ses protéines (C3b, C4b et iC3b) et à la formation du complexe d'attaque membranaire à sa surface, ainsi que des mécanismes empêchant la libération de facteurs chemotactiques puissants tel le peptide C5a.

Tout d'abord, certains agents infectieux empêchent l'activation du système du complément. Ainsi, bien que cela reste mal compris, il a été montré que la capsule entourant certaines bactéries gram-négatives et gram-positives active peu le complément. Certaines bactéries trompent également les protéines régulatrices du complément par l'acquisition à la surface de leur capsule de molécules de l'hôte tels l'acide sialique ou l'acide hyaluronique. Par ailleurs, certaines bactéries pathogènes (Kraiczy *et al.*, 2006), des virus (Stoiber *et al.*, 1996), des champignons (Meri *et al.*, 2002) et des parasites (Diaz *et al.*, 1997) ont acquis la capacité de recruter à leur surface, des protéines solubles régulatrices du complément (facteur H, FHL-1, C4BP) (Fig. 30). L'acquisition de facteurs de surface possédant des propriétés fonctionnelles identiques aux protéines régulatrices du complément par certains virus (Friedman *et al.*, 1984) (McNearney *et al.*, 1987) et parasites (Norris *et al.*, 1991) (Pearce *et al.*, 1990) constitue une autre stratégie. Quelle que soit la stratégie, ces protéines ou leur mimique fonctionnelle protègent les pathogènes de l'activation du complément.

Ensuite, certains agents infectieux n'empêchent pas l'activation du complément à leur surface mais en évitent les conséquences. Ainsi, il a été montré que la paroi de certaines bactéries gram-négatives et gram-positives est peu favorable à l'action du complexe d'attaque membranaire. La chaîne O et l'épaisse couche de peptidoglycan respectivement, limitent l'accès de celui-ci à la membrane plasmique et à la membrane externe. Aussi, les bactéries gram-négatives rugueuses (sans chaîne O) sont plus sensibles à la lyse. D'autre part, des bactéries telle *Streptococcus pyogenes* sécrètent une protéine (la protéine Mac), qui se lie aux *Fcγ receptor* et au *complement receptor CR1* des cellules phagocytaires. Celle-ci empêche la phagocytose opsonique du pathogène (Agniswamy *et al.*, 2004).

Enfin, certaines bactéries disposent à leur surface d'une C5 peptidase qui empêche la formation du MAC et donc leur cytolyse et qui a également une action anti-inflammatoire, en clivant la protéine C5a (Cleary *et al.*, 1992).

3. Éviter la reconnaissance de PAMPs.

A tout moment, la présence d'un agent infectieux peut être décelée par les récepteurs de l'immunité innée, omniprésents. En réponse à cette forte pression, certains pathogènes ont acquis la capacité de passer inaperçu, soit en masquant leur patterns moléculaires conservés, soit en modifiant dans une certaine mesure ceux-ci.

3.1 Ne pas exprimer un PAMP, l'exemple du flagelle.

Les PAMPs sont définis comme des structures essentielles aux pathogènes si bien que toute modification majeure en diminue la viabilité ou la pathogénicité. Néanmoins, la flagelline pourrait être une exception à cette règle. Bien qu'il soit un facteur de virulence important pour des bactéries comme *Vibrio cholerae* ou *Helicobacter pylori*, l'expression du flagelle ne semble essentielle ni à la survie, ni à la pathogénicité de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Schmitt *et al.*, 2001). Éviter l'expression de la flagelline place ainsi la bactérie à l'abri de sa reconnaissance par le TLR5.

3.2 Camoufler les PAMPs.

De nombreuses bactéries extracellulaires telles *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, ou *Haemophilus influenza* disposent d'une capsule qui masque leurs PAMPs et leurs antigènes, cibles respectives de l'immunité innée et adaptative. De plus, elle protège

Tableau 4. Exemples de stratégies anti-immunitaires des virus et des bactéries pathogènes (d'après Finlay, 2006).

Strategy	Viral Examples	Bacterial Examples
(1) Secreted modulators or toxins	- ligand mimics (virokines) - receptor mimics (viroceptors)	- many toxins - proteases
(2) Modulators on the pathogen surface	- complement inhibitors - coagulation regulators - immune receptors - adhesion molecules	- Lipid A of LPS - carbohydrates such as capsules - outer membrane proteins - adhesins and invasins
(3) Hide from immune surveillance	- latency - infect immunoprivileged tissues	- avoid phagolysosomal fusion - inhibit phagocytosis
(4) Antigenic hypervariability	- express error-prone replicase - escape from antibody recognition - "outrun" T cell recognition	- vary many surface structures - pili, outer membrane proteins, LPS - strain to strain variation
(5) Subvert or kill immune cells/phagocytes	- infect and kill immune cells (DCs, APCs, lymphocytes, macrophage, etc.) - inhibit CTL/NK cell killing pathways - alter immune cell signaling, effector functions, or differentiation - express superantigens	- superantigens - avoid phagolysosomal fusion - block inflammatory pathways by injecting effectors - replicate within and overrun immune cells
(6) Block acquired immunity	- downregulate MHC-I or -II - block antigen presentation/proteasome - prevent induction of immune response genes	- IgA proteases - block antigen presentation
(7) Inhibit complement	- soluble inhibitors of complement cascade - viral Fc receptors	- proteases to degrade complement - produce capsules and long chain LPS to avoid complement deposition and MAC attack
(8) Inhibit cytokines/interferon/chemokines	- inhibit ligand gene expression - ligand/receptor signaling inhibitors - block secondary antiviral gene induction - interfere with effector proteins	- block inflammatory pathways - activate alternate pathways - secrete proteases to degrade
(9) Modulate apoptosis/autophagy	- inhibit or accelerate cell death - block death signaling pathways - scavenge free radicals - downregulate death receptors or ligands - inactivate death sensor pathways	- inhibit apoptosis - activate death signaling pathways - alter apoptotic signaling pathways
(10) Interfere with TLRs	- block or hijack TLR signaling - prevent TLR recognition	- alter TLR ligands to decrease recognition - bind to TLR to dampen inflammation - inject effectors to inhibit downstream inflammation signaling
(11) Block antimicrobial small molecules	- prevent iNOS induction - inhibit antiviral RNA silencing	- secrete proteases to degrade - alter cell surface to avoid peptide insertion - use pumps to transport peptide - directly sense small molecules to trigger defense mechanisms
(12) Block intrinsic cellular pathways	- inhibit RNA editing - regulate ubiquitin/ISGylation pathways	- alter ubiquitin pathway - alter transcriptional programs

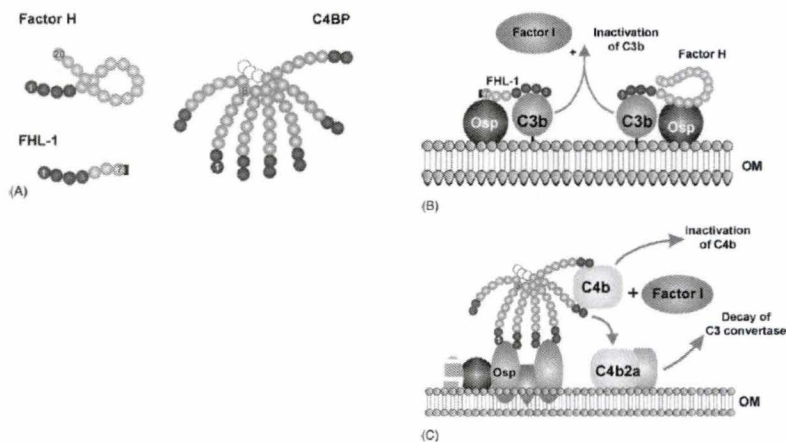


Figure 30. Les pathogènes peuvent échapper à l'activation du complément en recrutant des protéines régulatrices de l'hôte à leur surface (d'après Kraiczy & Würzner, 2006). (A) Le facteur H et les protéines FHL-1 et C4BP sont des protéines régulatrices du complément solubles de l'hôte qui contribuent à éviter l'activation du complément à la surface de ses cellules. Certains pathogènes ont acquis la capacité de recruter ces protéines à leur surface. (B) La protéine FHL-1 et le Facteur H favorisent l'inactivation des protéines C3b déposées à la surface du pathogène par le Facteur I, une autre protéine régulatrice. (C) La protéine C4BP retarde la formation de la C3 convertase (C4b2a) en entrant en compétition avec un de ses composant (le C2) pour la liaison de la protéine C4.

le pathogène en le rendant insensible au complément, résistant à la phagocytose, et en empêchant la fixation d'anticorps à sa surface.

3.4 Disposer de PAMPs atypiques.

Bien que le lipide A soit un composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, il est caractérisé par une diversité du nombre et de la longueur des chaînes latérales acylées, ainsi que de la nature des liens impliqués, plusieurs caractéristiques critiques vis-à-vis de sa reconnaissance par le TLR4. Le lipide A classique (*glucosamine backbone, ester- and amide-linked C14:0(3-OH) and C12 to C16 in acyloxyacyl groups*) stimule fortement le TLR4 (Schromm *et al.*, 2000) (Lapaque *et al.*, 2006).

Les variations dans le nombre, la longueur, la charge et le type de liens de ces chaînes favorisent l'échappement au TLR4. Ainsi, plusieurs bactéries pathogènes à gram négatif telles *Brucella*, *Legionella* ou *Helicobacter* possèdent un lipide A atypique stimulant peu le TLR4 (Lapaque *et al.*, 2006). Cependant, certains auteurs suggèrent que des lipides-A non-classiques puissent être reconnus par le TLR2 (Smith, *et al.*, 2003) (Werts *et al.*, 2001). Cette idée est néanmoins controversée (Lapaque *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les bactéries pathogènes *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, et *Bartonella bacilliformis*, dont la mobilité est nécessaire à l'infection efficace de l'hôte dispose d'une flagelline atypique non reconnue par le TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

3.5 Modifier les PAMPs.

Il a été décrit que certains pathogènes sont capables de modifier des PAMPs sans que ces changements n'affectent leur viabilité ou leur capacité à établir une infection.

Ainsi, certaines bactéries gram-négatives, altèrent au cours de l'infection, la structure du lipide A de leur LPS pour éviter leur détection mais également pour les protéger des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales (Ernst *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dispose d'un senseur de l'environnement qui induit l'expression de gènes codant diverses enzymes de modification du lipide A (addition de palmitate, d'aminoarabinose et de phosphoethanolamine, hydroxylation et deacylation de certains acides gras) (Fig. 31). Les formes modifiées du lipide A activant jusqu'à cent fois moins le TLR4 lui permettent d'éviter une réaction inflammatoire (Guo *et al.*, 1997) (Kawasaki *et al.*, 2004)

Cette stratégie a également été bien décrite dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, responsable d'infection pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose (Ernst *et al.*, 1999). L'altération du lipide A de son LPS (forme penta-acylée) lors des étapes précoces de l'infection lui permet de coloniser la surface du poumon en évitant la réponse immunitaire. Une fois l'infection établie, la bactérie exprime un lipide A activateur du TLR4 (forme hexa-acylée) qui déclenche une forte réaction inflammatoire responsable de la pathologie (Fig.32)

4. Interférer avec le traitement de l'information.

Puisque le rôle essentiel des PAMPs réduit considérablement la possibilité de les altérer, les pathogènes ont développé une stratégie alternative d'immunoévasion, à savoir l'interférence avec les voies de signalisation déclenchées par l'activation des PRRs cellulaires.

Ainsi, divers pathogènes perturbent, à différents niveaux, le bon déroulement des voies TLRs-dépendantes qui conduisent à la réponse inflammatoire. Le pathogène atténue ainsi la réponse effectrice de l'immunité innée et coupe les ponts qui lient celle-ci à l'immunité adaptative.

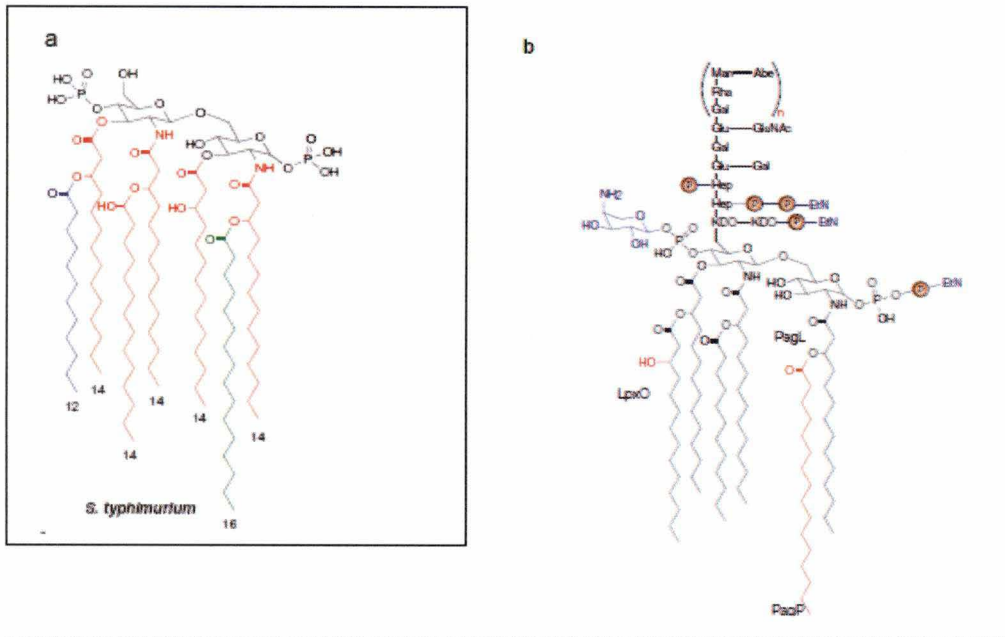


Figure 31. Modifications du lipide A par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (d'après Miller et al., 2005). a. Structure du lipide A non modifiée de *S. enterica* serovar Typhimurium. b. Modifications chimiques régulées lors d'une infection.

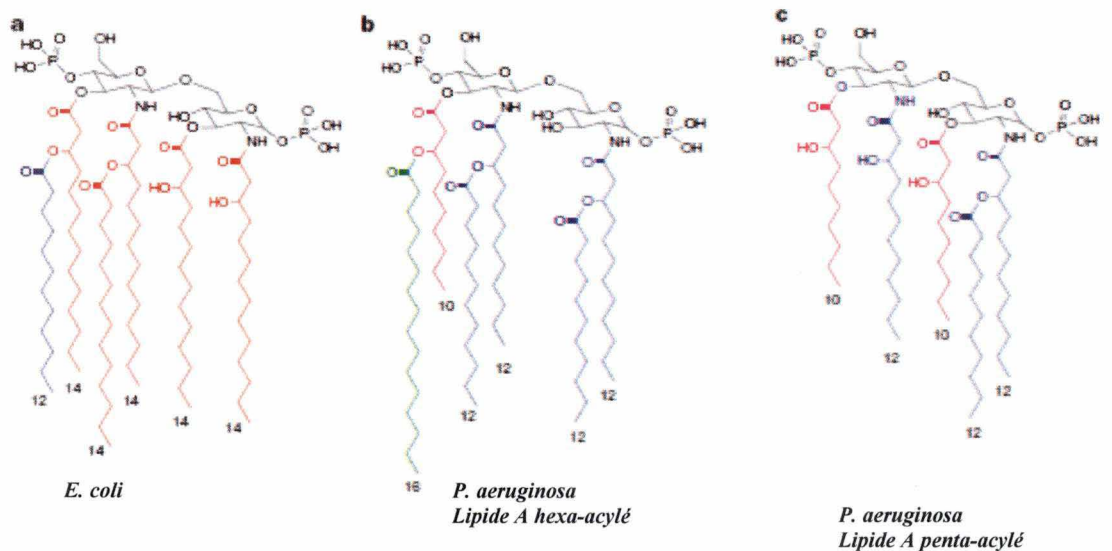


Figure 32. Structure du lipide A classique d'*E.coli*, et des lipides A penta- et hexa-acylé de *Pseudomonas aeruginosa* (d'après Miller et al., 2005). Le lipide A classique hexa-acylé est reconnu par le TLR4 et il stimule la production de cytokines pro inflammatoires par l'hôte. *P. aeruginosa* convertit son lipide A en fonction du stade de l'infection. Lors de la phase précoce, son LPS porte la forme penta-acylée du lipide A, non stimulatrice du TLR4. Le lipide A hexa-acylé est quant à lui reconnu par le TLR4 qui déclenche une réponse pro inflammatoire.

Certains virus disposent de protéines effectrices qui perturbent la formation du complexe multiprotéique sous la membrane plasmique après l'activation des TLRs et des récepteurs du type *IL-1R*.

Ainsi, deux protéines du virus de la vaccine, *A46R* et *A52R*, montrent une similarité de séquence avec le domaine *TIR* typiquement eucaryote caractéristique des TLRs, des membres de la famille *IL-1R* et de leurs protéines adaptatrices (Bowie *et al.*, 2000). Il a été montré que la protéine *A52R* agit comme un dominant négatif de *MyD88* en bloquant la voie de signalisation induite par l'*IL-1* nécessaire à la résistance au virus (Spriggs *et al.*, 1992). La protéine *A46R*, dont l'importance pour la virulence du virus est démontrée chez un mutant, inhibe les voies de signalisation initiées par de nombreux TLRs en séquestrant les protéines adaptatrices *MyD88*, *Mal*, *Trif* et *Tram* (Stack *et al.*, 2005).

Le virus de l'hépatite C dispose lui de la protéine *NS3/4A* qui interfère avec la voie indépendante de *MyD88* en clivant la protéine adaptatrice *TRIF*. Celle-ci est nécessaire à la voie de signalisation initiée par le TLR3 lors d'une infection virale et aboutissant à la synthèse et sécrétion d'*IFN-β*. En empêchant cette réponse, la protéine *NS3/4A* contribue donc à la persistance du virus (Li *et al.*, 2005).

Récemment, certains auteurs ont rapporté la présence d'une protéine à domaine *TIR* chez *Salmonella enterica* serovar Enteritidis qui interfère également avec la voie *NF-κB*. Même si son mécanisme précis d'action reste inconnu, l'activation du facteur de transcription et dès lors l'induction de l'expression des cytokines pro inflammatoires n'ont pas lieu (Newman *et al.*, 2006).

D'autres bactéries pathogènes bloquent la voie *NF-κB* en agissant en aval du recrutement des protéines adaptatrices. Ainsi, *Yersinia* (Orth *et al.*, 2000) et *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, par deux mécanismes différents empêchent la translocation de *NF-κB* dans le noyau (Collier-Hyams *et al.*, 2002) (Fig.33).

Il faut noter que, contrairement aux virus, pour interférer avec les processus cellulaires eucaryotes, la bactérie doit être dotée d'un système de translocation de ses toxines ou de ses protéines immunomodulatrices au sein du cytoplasme de ces cellules.

5. Tirer profit de la reconnaissance.

De manière tout à fait surprenante, certaines bactéries extracellulaires et intracellulaires ont acquis la capacité de tirer profit de leur reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée.

Ainsi, *Yersinia pestis* produit une protéine agoniste du TLR2, la protéine LcrV (Fig.33). En interagissant avec le TLR2, elle modifie la production de cytokines par les macrophages. En effet, elle induit la sécrétion d'*IL-10* qui atténue la réponse inflammatoire et favorise la survie de la bactérie (Sing *et al.*, 2002). Il est étonnant de voir que cette stratégie fait du TLR2 un point faible, en rendant des souris plus susceptibles à l'infection par *Yersinia*.

Certaines bactéries intracellulaires empêchent leur détection par les récepteurs cytoplasmiques de l'immunité innée, par exemple, en empêchant le processing de leur peptidoglycan et la reconnaissance de ses dérivés par les NODs (Boneca, 2005) Par contre, *Listeria monocytogenes* sécrète des hydrolases du peptidoglycan qui ont été identifiées comme facteurs de virulence (Lenz *et al.*, 2003), ce qui laisse supposer qu'en clivant le peptidoglycan et en exploitant les protéines NODs, il détourne la réponse inflammatoire à leur avantage (O'Connell *et al.*, 2004).

Le virus West Nile bénéficie de sa reconnaissance par le TLR3 des astrocytes car la réponse inflammatoire qu'elle déclenche lui ouvre la porte de la barrière hématoencéphalique. En accord avec cette observation, des souris KO pour le TLR3 sont plus résistantes à l'infection par ce virus.

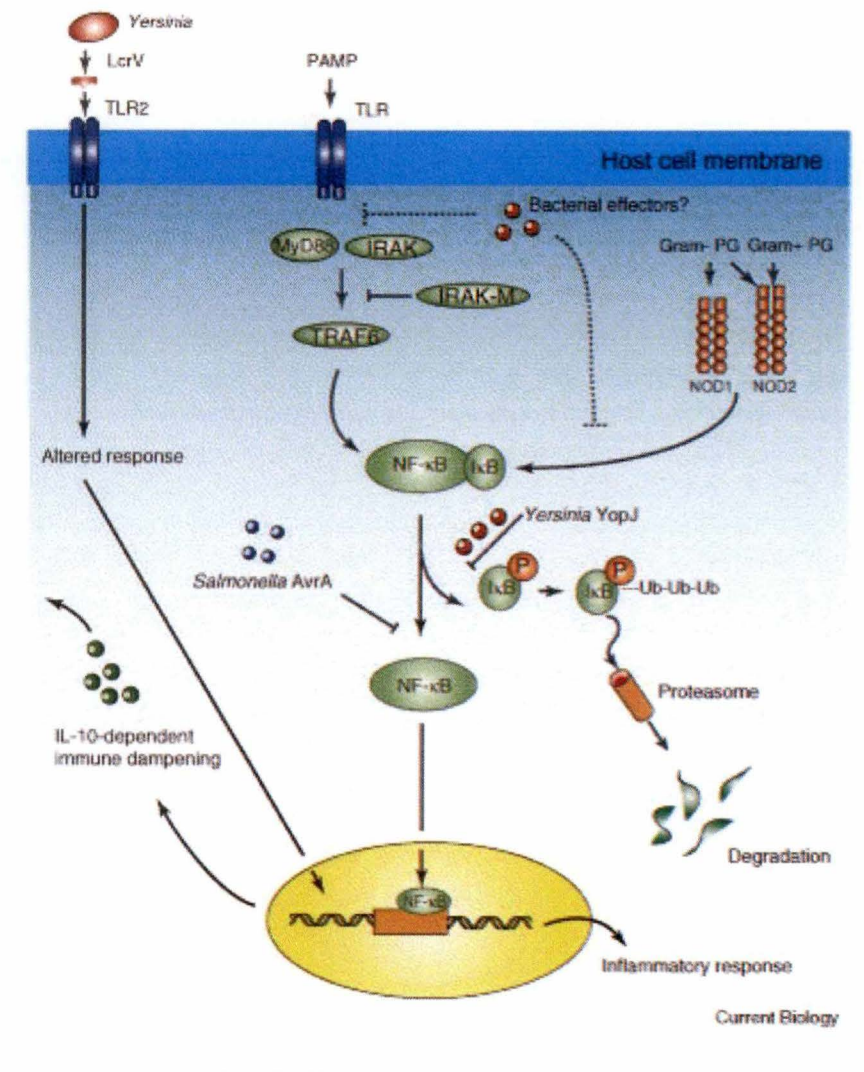


Figure 33. Détournement par les bactéries de voies de signalisation impliquées dans la réponse immune. Plusieurs protéines immunomodulatrices ont été décrites chez différentes bactéries. *Yersinia* sécrète la protéine LcrV, un agoniste du TLR2 qui module la réponse de celui-ci en favorisant la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10. YopJ et AvrA respectivement produit par *Yersinia* et *Salmonella* empêchent l'activation de NF-κB. La capacité d'altérer la réponse déclenchée par les TLRs en agissant au niveau de leur domaine TIR est peu connue chez les bactéries.

C. Le genre *Brucella*.

1. Généralités.

Les bactéries du genre *Brucella* sont des coccobacilles gram-négatifs, pathogènes intracellulaires facultatifs. Elles appartiennent à la sous-classe α -2 des protéobactériacées (Moreno et al., 1990) qui regroupe des bactéries pathogènes d'animaux telles *Rickettsia* spp. et *Bartonella* spp., des bactéries pathogènes de plantes comme *Agrobacterium tumefaciens*, et des bactéries symbiotiques de plantes telle *Sinorhizobium meliloti*.

Ce genre regroupe six espèces distinguées sur base de tests biochimiques, de tests immunologiques et de leur préférence d'hôte ; *B. melitensis* (chèvre et mouton), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien) et *B. neotome* (rat du désert) (Boschiroli et al., 2001). *Brucella* est l'agent de la brucellose, une zoonose mondiale, particulièrement répandue dans le bassin méditerranéen, le Golfe Persique et en Amérique Latine, qui provoque l'avortement et la stérilité des mâles chez les animaux domestiques et sauvages.

Chez l'homme, *B. melitensis*, *B. suis* et *B. abortus* sont responsables d'une maladie connue sous le nom de fièvre de Malte. L'infection aiguë est principalement caractérisée par une asthénie et des fièvres ondulantes alors que la phase chronique, atteinte dans 30% des cas d'infection, est caractérisée par de nombreuses complications, endocardite, spondylarthrite, encéphalite, problèmes pulmonaires, urogénitaux, hépatobiliaires,... (Ariza et al., 1995). Le type de symptômes détermine l'évolution de la maladie dont l'issue peut parfois être fatale (Rahman et al., 2001). Cependant, la brucellose est efficacement traitée par une cure d'antibiotiques de deux mois, alliant généralement doxycycline, aminoglycoside et/ou rifampicine.

2. Pathogénie.

2.1. Généralités.

Brucella est un pathogène intracellulaire qui survit et se réplique au sein des cellules phagocytaires professionnelles et des cellules phagocytaires non professionnelles de l'hôte. La bactérie pénètre dans leur hôte par les muqueuses et se propagent, probablement via les neutrophiles et les macrophages du sang, à travers tout l'organisme pour se retrouver dans la rate, le système lymphatique et, excepté chez l'homme, dans le tractus génital et les glandes mammaires. De nombreux types de tissus peuvent par la suite être envahis (Pizzaro-Cerdà, 1999).

2.2. *Brucella*, une bactérie furtive.

Le macrophage, une des cellules centrales de l'immunité innée, est décrit comme une cible majeure de l'infection par *Brucella*.

On peut distinguer deux types de bactéries intracellulaires du macrophage en fonction de leur relation avec celui-ci. La première catégorie, qui comprend notamment *Salmonella*, *Shigella* et *Listeria* regroupe celles qui perturbent profondément la physiologie de la cellule hôte avant de la tuer et d'en infecter une nouvelle. La seconde inclut des bactéries comme *Mycobacterium* et *Chlamydia* qui paraissent moins agressives puisqu'elles maintiennent leur cellule hôte en vie. *Brucella* fait partie de cette seconde catégorie. Si celle-ci est capable de préserver sa cellule hôte, c'est qu'elle a su tirer profit des avantages de cette niche de répllication tout en évitant ses inconvénients. Et ceux-ci sont de taille dans une cellule comme le macrophage.

Sa survie au sein du macrophage, l'absence majeure de réponse inflammatoire de sa part et la description du statut immunitaire d'une personne infectée supportent l'hypothèse

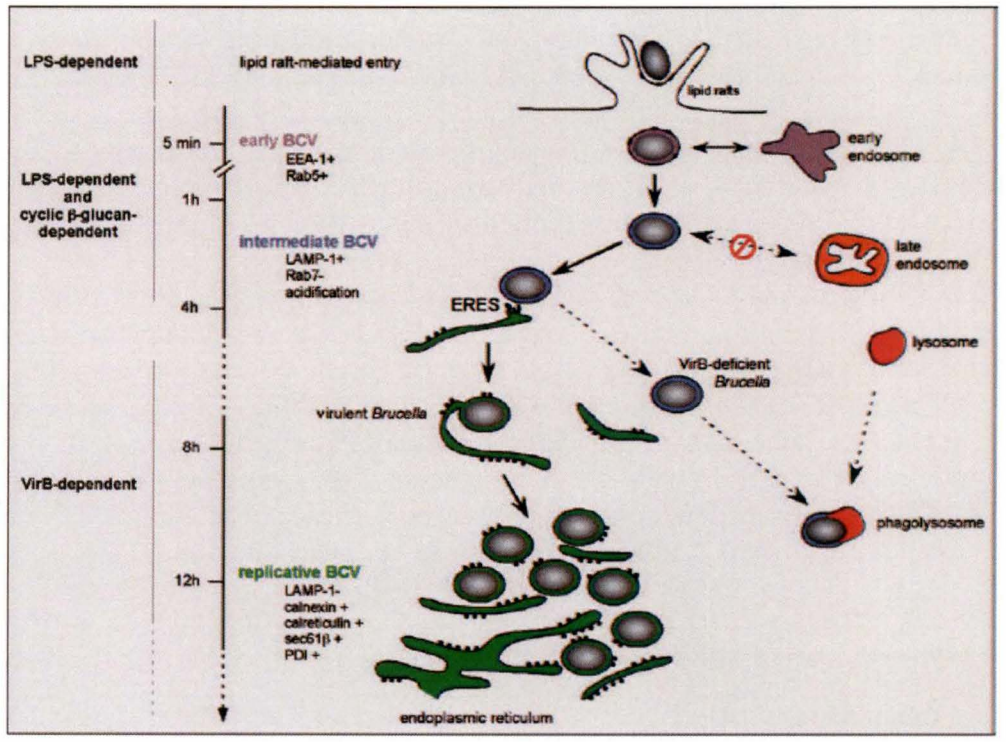


Figure 34. Trafic intracellulaire de *Brucella* au sein d'un macrophage. Après son entrée induite au sein du macrophage via les lipid rafts, elle se retrouve dans une BCV (*Brucella Containing Vacuole*) qui interagit avec l'endosome précoce. Après avoir acquis les protéines EEA-1 et Rab5, la vacuole s'acidifie. Elle accumule alors LAMP-1, mais pas Rab-7 pour éviter la fusion avec l'endosome tardif et le lysosome. La vacuole se dirige ensuite vers des sites privilégiés du reticulum endoplasmique où elle établit sa niche de réplication. Le facteur de virulence LPS est nécessaire pour induire l'entrée via les lipid rafts et éviter la voie classique de phagocytose. Le système de sécrétion de type IV, encodé par l'opéron virB, est essentiel pour éviter la fusion lysosomale.

d'une perturbation profonde de la réponse immunitaire par *Brucella* qui empêche son élimination.

2.2.1 Une porte d'entrée peu commune.

Le macrophage, dans bien des cas, est capable de débarrasser l'hôte d'un pathogène par phagocytose. Cependant, il a été mis en évidence que *Brucella* induit son entrée et ne suit pas la voie normale de phagocytose (Liautard *et al.*, 1996) (Fig.34). En effet, elle provoque son entrée dans la cellule cible par l'interaction de son *smooth-LPS* (S-LPS) avec les *lipid rafts*, microdomaines particuliers au sein de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Naroeni *et al.*, 2002). Le point culminant de l'interaction de *Brucella* avec la cellule hôte est l'inhibition de la fusion phago-lysosomale et la déviation du trafic vacuolaire qui conduit la bactérie dans sa niche de réplication. Cette dernière vacuole, appelée "brucellosome", (Kohler *et al.*, 2003) est entourée d'une seule membrane qui entretient des contacts étroits avec le réticulum endoplasmique rugueux (ER) (Celli *et al.*, 2003) au niveau des sites ERES (Celli *et al.*, 2005)

2.2.2 *Brucella* paralyse la réponse du macrophage.

En plus d'échapper à la voie normale de phagocytose des macrophages, *Brucella*, en empêchant, par un mécanisme non identifié, la sécrétion par celui-ci d'une cytokine pro inflammatoire importante, le TNF- α évite l'activation des mécanismes bactéricides de sa cellule hôte et des macrophages voisins (Caron *et al.*, 1994).

3. A la recherche de ses stratégies anti-immunitaires.

La réussite de *Brucella* au sein du macrophage, truffé de mécanismes anti-microbiens, et, en tant qu'APC, carrefour entre l'immunité innée et l'immunité adaptative témoigne de l'acquisition de stratégies immunoévasives.

Des analyses réalisées chez un homme infecté confirment que *Brucella* empêche d'une façon ou d'une autre la mise en place de la réponse immune adaptée (Rodriguez-Zapata *et al.*, 1996) (Giambartolomei *et al.*, 2002).

Les mécanismes anti-immunitaires de *Brucella* doivent encore être largement étudiés, cependant, deux facteurs de virulence, le LPS et le système de sécrétion de type IV (T4SS) ont été identifiés.

3.1. Le rôle important de son LPS.

La plupart des souches sauvages de *Brucella* dispose d'un S-LPS présentant une longue chaîne-O terminale et une structure atypique de son lipide A qui lui confère plusieurs avantages.

Tout d'abord, la longue chaîne-O protège *Brucella* de la lyse par le système du complément avant son entrée dans la cellule hôte (Eisenschenk *et al.*, 1999). D'autre part, c'est le LPS qui induit l'interaction avec les *lipid rafts*. Ensuite, le LPS contribue à éviter la voie agressive de la phagocytose. Une fois dans le phagosome, la chaîne-O confère la résistance de la bactérie à l'environnement phagosomal et son acidification (Allen *et al.*, 1998)

Le rôle clé du LPS et, plus particulièrement de sa chaîne-O, au cours des premières étapes de l'interaction avec la cellule hôte est mis en évidence chez des souches de *Brucella* ne possédant pas cette dernière et dont la virulence est atténuée. Ces souches n'entrent pas par les *lipid rafts*, sont phagocytées plus rapidement et sont acheminées vers le phagolysosome où elles ne peuvent résister à la dégradation (Rittig *et al.*, 2003) (Porte *et al.*, 1999)

En plus d'être essentiel à la survie extracellulaire et à l'atteinte de la niche de réplication intracellulaire, il a été montré que le lipide A atypique du LPS de *Brucella* n'induit

pas la sécrétion de TNF- α par le macrophage infecté, contribuant ainsi à éviter la réponse inflammatoire (Lapaque *et al.*, 2006).

3.2. Identification d'un système de sécrétion de type IV.

Une approche génétique a identifié un autre facteur de virulence chez *Brucella*, le système de sécrétion de type IV (T4SS), homologue au système *VirB* d'*Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan *et al.*, 1999)

L'injection d'effecteurs à l'intérieur des cellules de l'hôte par des bactéries pathogènes gram-négatives extra- et intracellulaires via un système de translocation de ce type peut favoriser l'infection, en permettant au pathogène d'exploiter divers processus cellulaires ou en modulant la réponse immunitaire de l'hôte.

Il est actuellement clairement établi que le T4SS de *Brucella* joue un rôle crucial dans le processus infectieux en permettant le "vacuolar jacking" mais à ce jour aucun effecteur transloqué n'a été identifié (Delrue *et al.*, 2001) (Delrue *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est probable que ce système assure la translocation intra-cytoplasmique d'effecteurs bactériens contribuant au maintien de leur cellule hôte en empêchant l'apoptose (Gross *et al.*, 2000) et peut-être d'effecteurs qui paralysent la réponse inflammatoire.

Objectif du mémoire.

Après avoir montré dans la section précédente l'importance des mécanismes de reconnaissance de l'immunité innée et l'acquisition de stratégies immunoévasives par divers pathogènes, la description de la réussite de *Brucella* en tant que pathogène intracellulaire supporte l'hypothèse qu'elle dispose de tels mécanismes.

Aussi, il a été proposé que cette bactérie injecte dans la cellule hôte des effecteurs qui, en interférant avec divers processus cellulaires, favorise l'établissement de sa niche de réplication. Néanmoins, à ce jour, aucun effecteur n'a été identifié.

Une recherche menée sur le génome de *B. melitensis* 16M a mis en évidence une protéine hypothétique partageant une homologie de séquence avec le domaine TIR essentiel aux voies de signalisation initiées par les TLRs. Celles-ci sont destinées à activer les mécanismes de défense de la cellule infectée, mais également à mobiliser les différents acteurs du système immunitaire. On a dès lors proposé que la translocation d'une telle protéine au sein de la cellule hôte de *B. melitensis* 16M pourrait contribuer à réduire cette réponse immune visant *in fine* à l'éradiquer.

L'objectif de ce travail est de contribuer à la caractérisation de cet effecteur putatif. Dans cette optique, on a cherché à savoir :

- 1- si cette protéine est exprimée par *B. melitensis* 16M,
- 2- si elle est susceptible d'atteindre le cytosol de la cellule hôte,
- 3- si elle contribue au processus infectieux de la bactérie,
- 4- quels sont les mécanismes moléculaires eucaryotiques ciblés pour cet effecteur.

RESULTATS

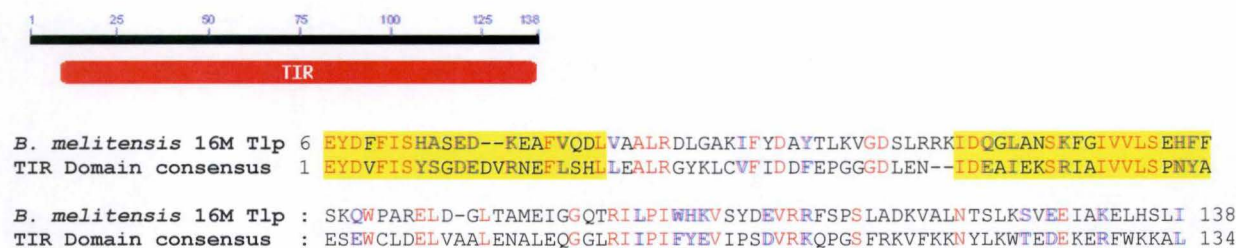


Figure 35 (d'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) Résultat de la recherche de domaines au sein de la protéine hypothétique *Tlp* renseignée par la base de données de *B. melitensis* 16M. La représentation schématique montre que la protéine hypothétique *Tlp* de *B. melitensis* 16M proposée par la base de données de l'URBM (en trait noir) est caractérisée par un domaine TIR (*Toll/IL-1-Receptor/Resistance*) (en rouge) qui constitue presque l'entièreté de la protéine. L'alignement du domaine TIR de *Tlp* avec la séquence consensus établie de celui-ci, montre la conservation des box-1 et box-2 (en jaune).

	Score (bits)	E value
Hypothetical protein BMEI1674.[Brucella melitensis]	273	2e-72
Hypothetical protein.[Brucella abortus]	271	5e-72
Hypothetical protein.[Brucella abortus]	271	5e-72
TIR.[Paracoccus denitrificans PD1222]	166	2e-40
TIR.[Mycobacterium sp]	150	1e-35
TIR.[Mycobacterium sp]	150	1e-35
Hypothetical protein.[Flavobacteria bacterium]	149	4e-35
Hypothetical protein.[Escherichia coli O6]	136	3e-31
TIR.[Syntrophomonas wolfei subsp]	132	3e-30
Hypothetical protein.[Staphylococcus aureus]	105	6e-22
Hypothetical protein.[Xanthomonas campestris]	77	2e-13
Hypothetical protein Chloroflexus aurantiacus	75	5e-13
Hypothetical protein.[Xanthobacter sp]	72	6e-12
Hypothetical protein.[Vibrio angustum S14]	70	2e-11
Hypothetical protein.[Geobacter sulfurreducens]	70	2e-11
Hypothetical protein.[158]	66	3e-10
Hypothetical protein.[Polaromonas sp]	65	7e-10
TPR repeat.[Frankia sp]	64	2e-09
TIR; Disease resistance protein,...Medicago truncatula	64	2e-09
Conserved domain protein.[Methylococcus capsulatus]	63	4e-09
Hypothetical protein.[Nitrobacter winogradskyi]	62	5e-09
Disease resistance protein.[Arabidopsis thaliana]	62	6e-09
Arabidopsis thaliana genomic DNA,...	61	1e-08
TIR domain protein.[Chlorobium tepidum]	60	2e-08
F1L3.30.[Arabidopsis thaliana]	60	2e-08
F3N23.6 Arabidopsis thaliana	60	2e-08
F3N23.4 Arabidopsis thaliana	60	3e-08

Figure 36. Aperçu du Blastp de séquence de la protéine hypothétique *Tlp* de *B. melitensis* 16M obtenu en utilisant une banque de séquences protéiques non redondante.

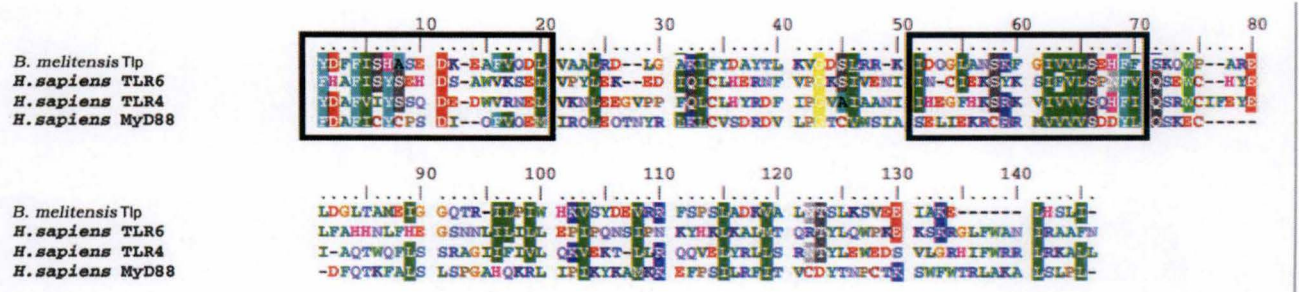


Figure 37. (Adapté de Newman et al., 2006). Alignement du domaine TIR prédit de la protéine hypothétique *Tlp* de *B. melitensis* 16M avec celui des protéines humaines TLR4, TLR6 et MyD88. Il montre la conservation de séquence des box-1 et box-2 (encadrées en noir) qui caractérise le domaine TIR eucaryote.

Résultats

A. Identification d'une protéine à domaine TIR chez *Brucella melitensis*.

1. BMEI1674, mise en évidence d'un gène codant un effecteur potentiel.

On a postulé que la mise en évidence de protéines de *Brucella melitensis* 16M homologues à des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'immunité innée pouvait conduire à l'identification de facteurs de virulence (potentiellement transloqués par le T4SS). Aussi, la recherche d'une protéine présentant une homologie de séquence avec le domaine eucaryote TIR (*Toll-IL-1 Receptor/Resistance*) dans le génome de *B. melitensis* 16M a été entreprise par l'utilisation d'une base de données disponible au laboratoire². Cette recherche a permis d'identifier l'ORF BMEI1674, codant une "hypothetical protein" de fonction inconnue.

Cette ORF, par la suite désignée *Tlp* (*TIR-like protein*), comprend 417 nucléotides et code une protéine Tlp de 138 acides aminés dont 132 forment le domaine TIR (Fig. 35).

Le résultat du Blastp de séquence de Tlp contre une banque de séquences protéiques non redondantes, présenté à la figure 36, révèle l'existence d'une protéine homologue chez *Brucella abortus*, mais pas chez *Brucella suis*. Chez les autres α -protéobactéries telles *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* ou *Caulobacter crescentus*, aucune protéine homologue n'est observée. Par contre, on observe une homologie de séquence de la Tlp de *B. melitensis* 16M avec des protéines de résistance de plantes, ainsi qu'avec des protéines hypothétiques de bactéries très diverses, comme, *Staphylococcus aureus*, un pathogène opportuniste. La comparaison de séquences du domaine TIR de Tlp avec celui des protéines humaines TLR6, TLR4 et MyD88 montre une homologie de séquence avec conservation des *box1* et *box2*, caractéristique de tous les domaines TIR connus (Fig. 37).

2. Une erreur d'annotation de l'ORF ?

La base de données de *B. melitensis* 16M indique donc une protéine hypothétique Tlp constituée exclusivement du domaine TIR. Cependant, une recherche approfondie a montré que la séquence génomique présente quatre phases ouvertes de lecture plus larges (Fig. 38).

De plus, d'autres bases de données³ disponibles en ligne proposent une ORF *Tlp* de 753 nucléotides qui résulte de la considération du deuxième codon start. Cette ORF code une protéine hypothétique de 250 acides aminés à domaine TIR C-terminal de 132 acides aminés qui possède également un domaine N-terminal adoptant vraisemblablement une conformation

² Une base de donnée de *B. melitensis* 16M a été développée par l'URBM. Elle contient une série d'informations sur chaque ORF du génome ; séquences, structure, domaines, résultats de Blast ainsi que les données biologiques pertinentes. Elle est accessible à l'adresse http://serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/Brucella_melitensis/

³ KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ; http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bme:BMEI1674
PUMA2 (*high-throughput genetic sequence analysis and metabolic reconstructions from sequence data*); http://compbio.mcs.anl.gov/puma2/cgi-bin/protein.cgi?id_type=NCBI_GI&id=17987957
NCBI ; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_540591.1

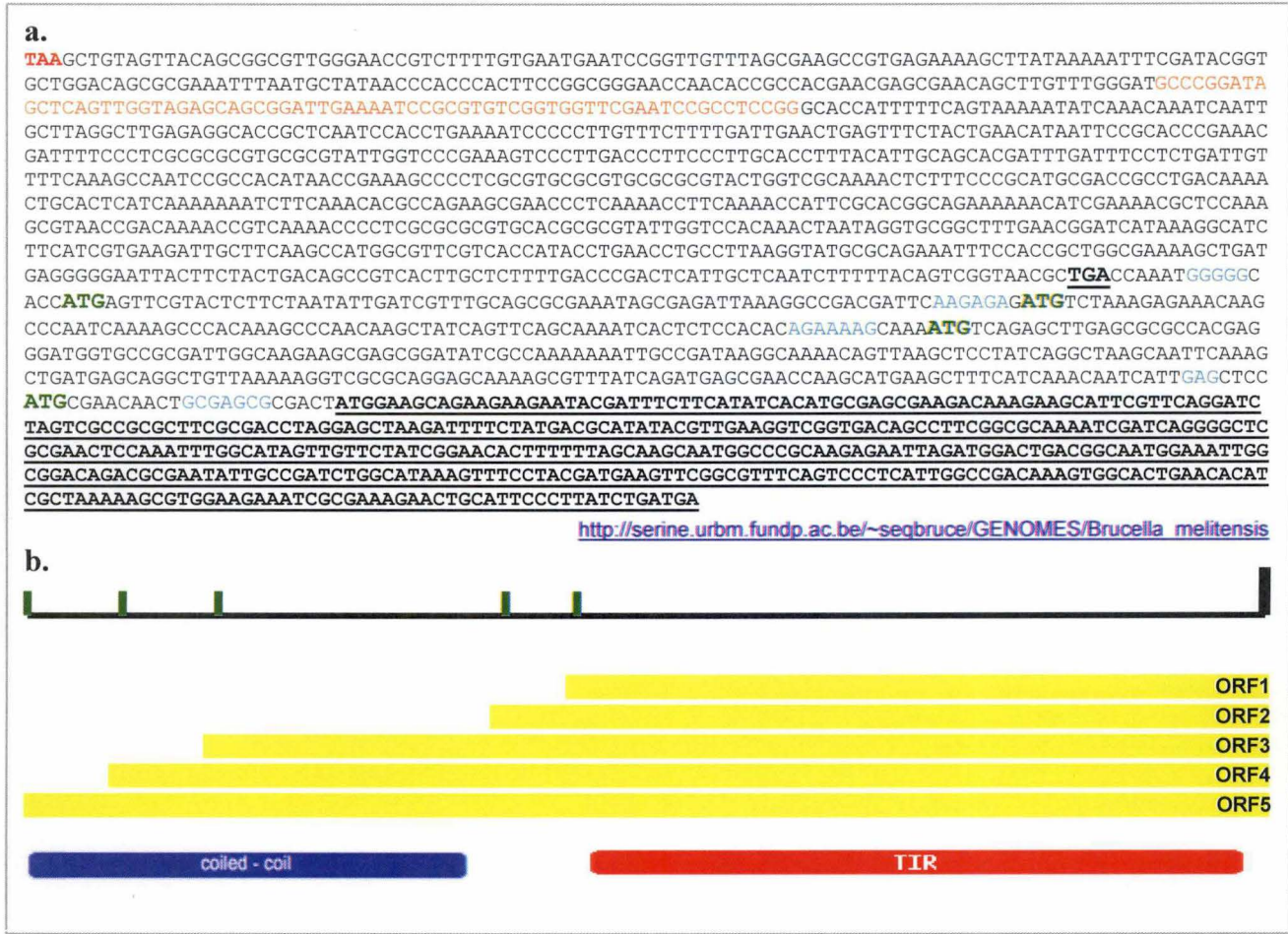


Figure 38. (a) Séquence génomique située en amont de l'ORF *Tlp* de *B. melitensis* 16M. Elle débute avec le codon stop (en rouge) de l'ORF BMEI1673. L'ORF *Tlp* proposée par la banque de données de *B.melitensis* 16M est soulignée. La séquence notée en orange (BMEI38) intercalée entre les ORFs BMEI1673 et *Tlp* est transcrite en tRNA (tRNA-Phe). Quatre codons start (en vert) en phase avec l'ORF *Tlp* révèlent la présence de phases de lectures ouvertes plus longues que celle proposée par la base de données. On retrouve donc cinq ORFs potentielles, de la plus courte à la plus longue, l'ORF1, l'ORF2, l'ORF3, l'ORF4 et l'ORF5. Leur RBS putatif apparaît en bleu. Le codon stop TGA, en phase avec les cinq codons start mis en évidence, marque le point d'arrêt de la recherche d'ORFs *Tlp*. **(b)** Comparaison schématique de la taille de ces différentes ORFs hypothétiques et du ou des domaine(s) qu'elles contiennent.

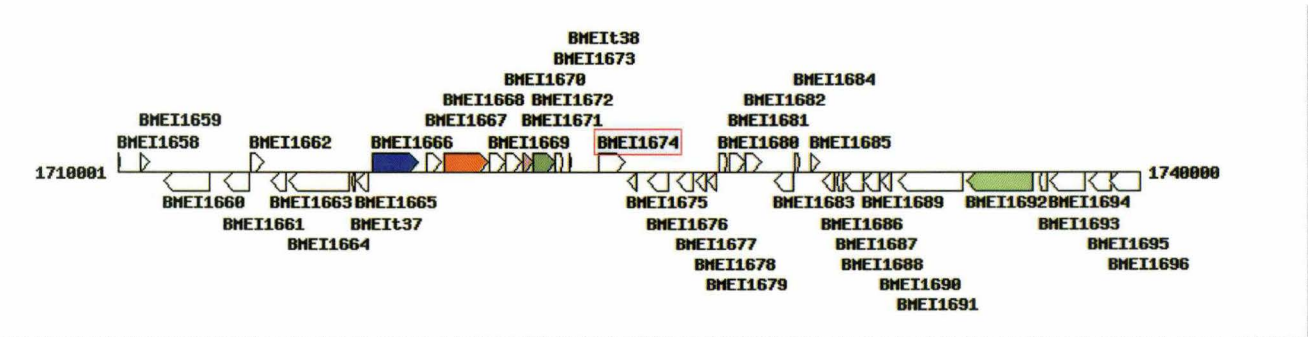


Figure 39. Représentation schématique de la localisation génomique de l'ORF *Tlp* (BMEI1674). Elle fait partie d'un groupe de protéines hypothétiques apparaissant en blanc.

coiled-coil⁴. Ce dernier a été mis en évidence par l'utilisation d'un programme calculant la probabilité qu'une séquence en acides aminés donnée adopte cette conformation⁵ (Lupas, Van Dyke & Stock, 1991).

Ainsi, on a émis l'hypothèse d'une erreur d'annotation de l'ORF dans la publication du génome de *B. melitensis* 16M qui a alimenté la base de données de l'URBM.

Parmi les cinq ORFs *Tlp* potentielles, deux groupes se distinguent. D'une part, les ORFs 1 et 2 coderaient ce que l'on appellera des "versions courtes" de *Tlp*, constituées uniquement du domaine TIR C-terminal. D'autre part, les ORFs 3, 4 et 5 coderaient des "versions longues" qui disposent également du domaine coiled-coil N-terminal (tableau 5).

	ORF1-Tlp	ORF2-Tlp	ORF3-Tlp	ORF4-Tlp	ORF5-Tlp
Taille de la protéine (a.a.)	138	146	220	250	275
Poids moléculaire de la protéine (kDa)	15,648	16,467	24,769	27,997	30,920
Domaine C-terminal	TIR	TIR	TIR	TIR	TIR
Domaine N-terminal	-	-	Coiled-coil	Coiled-coil	Coiled-coil

Tableau 5. Caractéristiques des protéines hypothétiques issues des cinq ORFs *Tlp* potentielles.

Ni la recherche de *Ribosome Binding Sites* (RBS) ou *séquences Shine-Dalgarno*, ni l'analyse de l'usage des codons n'ont permis de déterminer l'ORF réelle de *Tlp*. Le RBS dont la séquence consensus est AGGAGGU sur l'ARNm, est constitué de 4 à 7 nucléotides situés à moins de 10 nucléotides en amont du codon start. Aucun ATG des ORFs de *Tlp* proposées par les différentes bases de données ne semble présenter un RBS plus séduisant qu'un autre (Fig.38). Par ailleurs, l'analyse de l'usage des codons ne permet pas de délimiter la région intergénique séparant les ORFs BMEI1673 et BMEI1674.

Face à ce dilemme, nous avons considéré, dans la suite de ce travail, deux ORFs de *Tlp*. D'une part, en vue d'éviter toute perte d'information, on a travaillé avec la plus longue phase ouverte de lecture (ORF5). Elle comprend 829 nucléotides et code une protéine *Tlp* de 275 acides aminés qui porte le domaine TIR C-terminal de 132 acides aminés et un domaine *coiled-coil* N-terminal. D'autre part, on a considéré la plus petite ORF (ORF1) ne contenant que le domaine TIR, car elle est disponible au laboratoire, dans l'ORFéome.

Ces deux ORFs retenues coderont pour ce que l'on appellera dès-à-présent respectivement la "version la plus longue" de la *TIR-like protein* hypothétique de *B. melitensis* 16M ou *longTlp* et sa "version la plus courte" *shortTlp*.

3. BMEI1674, une protéine hypothétique parmi d'autres.

La présence chez une bactérie pathogène d'une protéine à domaine TIR typiquement eucaryotique et intervenant dans les voies de signalisation de l'immunité en fait un candidat effecteur sérieux.

L'ORF *Tlp* est située au sein d'un groupe de près de 20 ORFs hypothétiques (Fig. 39) qui forment une région de plus de 10kb, trop grande pour constituer une région intergénique. On peut donc être amené à penser que *Tlp* fait partie d'un cluster de gènes qui coderaient des effecteurs.

⁴ Un domaine coiled-coil est un motif structural partagé par des protéines très diverses. Il est formé de 2 à 5 hélices- α constituées de patterns d'acides aminés hydrophobes, qui s'enroulent ensemble (à la façon des brins d'une corde). Cette structure est maintenue par des forces hydrophobes. Elle est impliquée dans des interactions protéines-protéines, dans lesquelles les hélices- α des domaines coiled-coil de deux ou plusieurs protéines s'entrelacent.

⁵ Nous avons utilisé le programme COILS (*Prediction of Coiled Coil Regions in Proteins*) accessible à l'adresse suivante : http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

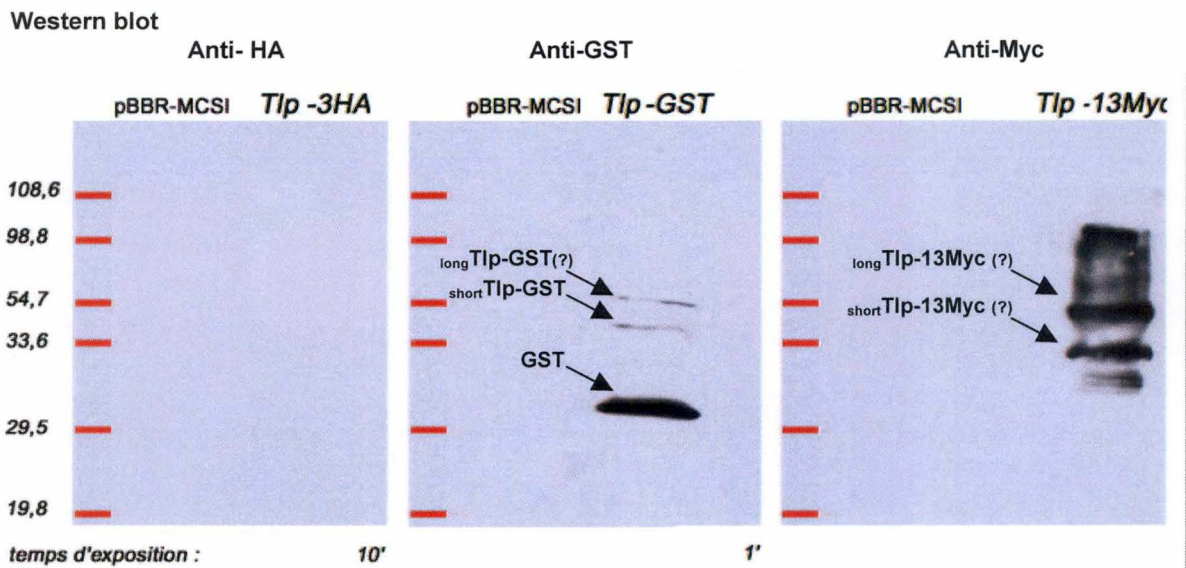


Figure 40. Test de l'expression des tags 3HA, GST et 13Myc chez *B. melitensis* 16M (Le poids moléculaire P.M. des protéines du marqueur est exprimé en kDa). La figure présente le résultat des western blots anti-HA, anti-GST et anti-Myc réalisés sur les extraits protéiques de souches sauvages de *B. melitensis* 16M transformées individuellement respectivement par les plasmides réplicatifs *medium copy* pBBR-MCSI-*longTlp-3HA-cat* (*Tlp-3HA*), pBBR-MCSI-*longTlp-GST-cat* (*Tlp-GST*) et pBBR-MCSI-*longTlp-13Myc-cat* (*Tlp-13Myc*). Les pistes pBBR-MCSI correspondent aux western blots effectués sur un extrait protéique de souche sauvage de *B. melitensis* 16M transformée par le plasmide pBBR-MCSI ne portant pas d'insert. Il est utilisé afin de contrôler un éventuel manque de spécificité des anticorps. Aucun signal n'est détecté pour le tag 3HA. Pour les tags GST et 13Myc, des protéines de P.M. compatible avec celui des protéines de fusion *longTlp-GST* et *longTlp-13Myc* sont détectées. De plus dans chacun des cas, une seconde bande révèle une protéine dont le P.M. est proche de celui de *shortTlp-tag*. Dans le cas de l'utilisation de la GST, une bande est observée à un P.M. correspondant à celui du tag.

L'expression du gène *Tlp* et la synthèse de la protéine correspondante pourraient conférer à *B. melitensis* 16M la capacité d'interférer avec les voies de transduction du signal déclenchées suite à sa reconnaissance par les *TLRs*. La protéine Tlp permettrait ainsi de moduler la réponse inflammatoire des cellules infectées par la bactérie.

Dans la suite de ce travail, nous avons tenté de mettre en évidence l'expression de la protéine Tlp et sa sécrétion par *B. melitensis* 16M. Par ailleurs, nous avons testé la virulence d'une souche mutée pour *Tlp* avant de nous attacher à essayer de comprendre les mécanismes d'action de cette protéine au sein de la cellule infectée.

B. Bmel1674, protéine hypothétique ou protéine exprimée ?

La protéine Tlp étant annotée comme protéine hypothétique, on a tout d'abord tenté de mettre en évidence son expression. Pour ce faire, une fusion traductionnelle de son ORF à la séquence codant un tag a été réalisée au locus génomique. L'ORF codant la protéine de fusion Tlp-tag est donc sous le contrôle du promoteur natif du gène.

L'expression de la protéine par *B. melitensis* 16M a, d'une part, été testée in vitro, pour être suivie au cours de différentes phases de croissance de la bactérie. D'autre part, l'expression a été testée en condition d'infection cellulaire.

1. Validation et choix des tags.

Quatre tags et des anticorps monoclonaux dirigés contre ceux-ci sont disponibles au laboratoire : les tags eGFP, 3HA, GST et 13 Myc.

Parmi ceux-ci, l'expression du tag rapporteur eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) a été validée chez *B. melitensis* 16M, préalablement à ce travail (Hallez R., thèse en cours).

Dans ce mémoire, on a tenté de valider par western blot (cfr. Matériel et méthodes) l'expression des trois autres tags en fusion de l'ORF *longTlp* portée par un vecteur répliquatif chez *B. melitensis* 16M. Sur celui-ci, l'ORF de la protéine de fusion *longTlp-tag* est surexprimée par le promoteur pLac. La construction des vecteurs utilisés lors de ce test est résumée dans l'encadré *Construction des plasmides destinés aux divers contrôles* à la page 31.

Aucun signal n'est observé suite à l'utilisation de l'anticorps anti-HA (Fig. 40). Par contre, la protéine est détectée en fusion avec les tags GST et 13Myc. La taille des bandes observées sera discutée plus longuement par la suite. D'emblée, on peut dire que deux protéines dont les poids moléculaires sont compatibles avec celui de la fusion *longTlp-tag* d'une part et celui de la protéine *shortTlp-tag* d'autre part, sont obtenues. On observe une bande correspondant à la taille du tag GST. Celle-ci peut résulter soit d'une traduction opéronique entre notre protéine d'intérêt et le tag, soit d'un important clivage protéolytique de la protéine de fusion *longTlp-GST* libérant le tag. L'absence de signal dans les puits contrôles atteste la spécificité des anticorps.

Puisque les tags (excepté 3HA) sont fonctionnels chez *B. melitensis* 16M, et que le signal détecté par l'utilisation du tag GST est plus net, on a porté notre choix sur celui-ci et sur le tag eGFP pour réaliser la construction souhaitée.

Pour obtenir une souche de *B. melitensis* 16M codant la protéine de fusion Tlp-GST ou Tlp-eGFP sous le contrôle du promoteur natif, nous avons construit des plasmides non répliquatifs chez *Brucella* portant ces ORFs.

2. Construction des vecteurs suicides Tlp-eGFP et Tlp-GST chez *B. melitensis*.

Afin de cloner l'ORF de *shortTlp* dans un vecteur non répliquatif et mobilisable chez *B. melitensis* 16M qui permette une fusion en phase à la séquence de l'eGFP ou de la GST

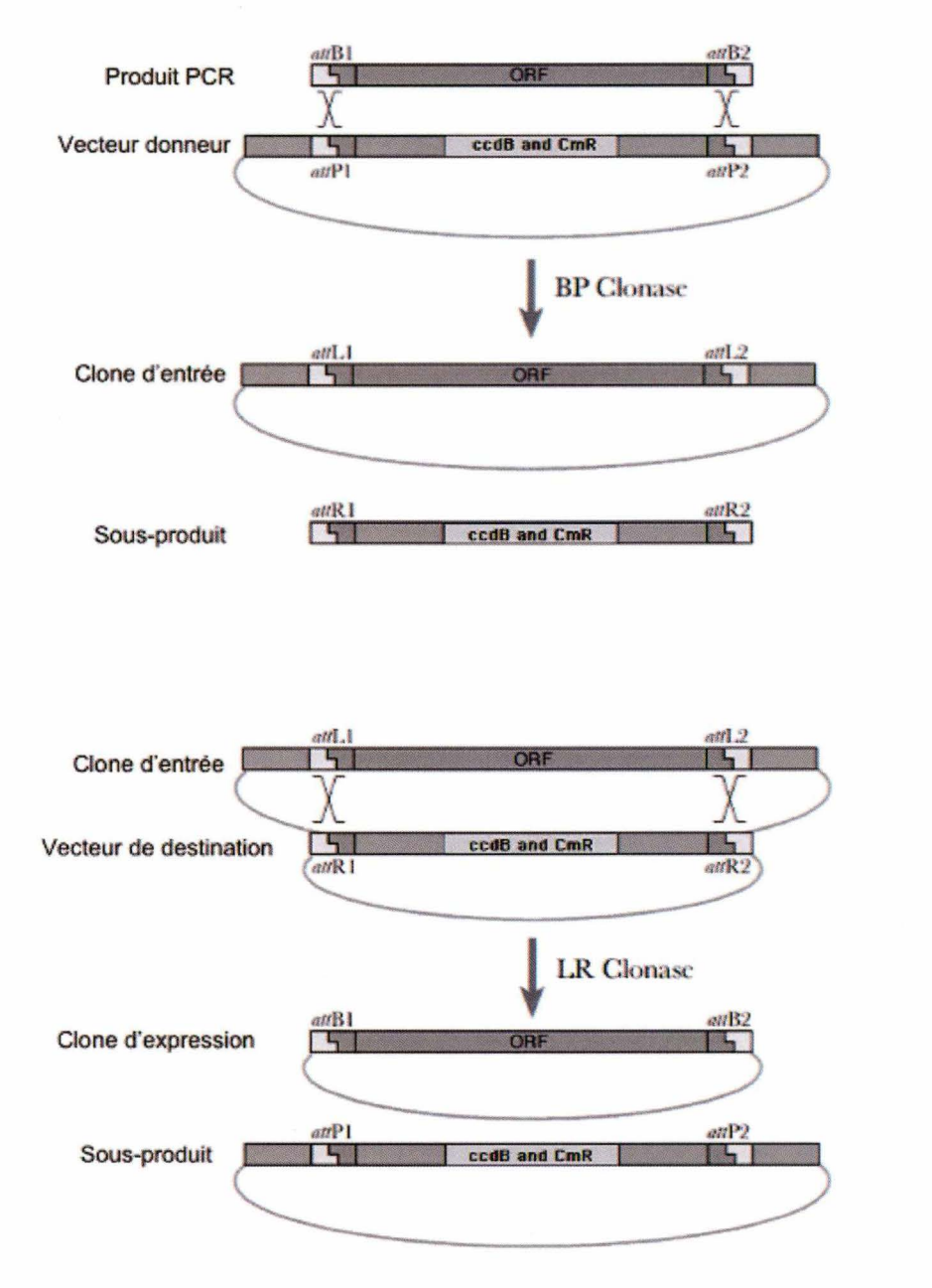


Figure 41. Schéma des réactions de recombinaison du système de clonage GATEWAY™. La réaction BP permet de cloner un produit PCR d'intérêt flanqué des sites de recombinaison *attB* dans un vecteur donneur contenant les séquences de recombinaison *attP*. Ce clonage permet l'échange entre l'insert et la cassette Gateway™ qui contient le gène toxique *ccdB* et le gène de résistance au chloramphénicol. La recombinaison génère un vecteur d'entrée portant le produit PCR entouré des sites *attL*. La réaction est catalysée par le « mix BP clonase » contenant les enzymes Int et IHF. La réaction LR permet le clonage de l'insert porté par le vecteur d'entrée dans un vecteur de destination par recombinaison entre les sites *attL* et *attR*. Le vecteur ainsi obtenu porte l'insert flanqué des sites *attB*. La réaction est catalysée par le mix « LR clonase », contenant Int, IHF et Xis.

(tags C-terminaux), nous avons utilisé le système Gateway™ de clonage par recombinaison (cfr. Matériel et méthodes). Celui-ci est brièvement décrit à la figure 41. Le vecteur d'entrée (pDONR201-BMEI1674) portant l'ORF de *shortTlp* est disponible dans l'ORFéome⁶ de *B. melitensis* 16M (Dricot *et al.*, 2004).

Une réaction LR a été réalisée entre ce vecteur pDONR201-BMEI1674 d'entrée et, soit le vecteur de destination pSKoriT-*eGFP-bla-kan^R*, soit le vecteur de destination pSKoriT-*GST-cat*. Ces deux vecteurs de destination portent la cassette Gateway™ (constituée du gène *ccdB*, toxique pour certaines souches d'*E. coli* et du gène *cat* de résistance au chloramphénicol) flanquée des sites de recombinaison *attR1* et *attR2*. Directement en aval de ce dernier, se trouve la séquence codant le tag, GST ou eGFP, selon le vecteur. La réaction LR permet la fusion transcriptionnelle de l'ORF *shortTlp* avec le tag, elle code alors une protéine de fusion C-terminale.

Les produits de réaction LR (Fig.42) ont été transformés individuellement dans la souche DH10B d'*E. coli*. En fonction du vecteur, les transformants ont été sélectionnés en présence d'ampicilline ou de chloramphénicol. Une extraction d'ADN plasmidique a été effectuée sur plusieurs candidats transformants et la présence de l'insert au sein des deux types de plasmides récupérés a été validée par restriction diagnostique (résultats non montrés).

Les plasmides validés pSKoriT-*shortTlp-eGFP-bla-kan^R* et pSKoriT-*shortTlp-GST-cat* ont été transformés individuellement dans la souche conjugante S17 d'*E. coli*. La mise en présence de *B. melitensis* 16M permet le transfert des plasmides individuels par conjugaison. Les transformants *B. melitensis* 16M pSKoriT-*shortTlp-eGFP-bla-kan^R* et *B. melitensis* 16M pSKoriT-*shortTlp-GST-cat* sont sélectionnés sur kanamycine et chloramphénicol respectivement.

3. *Tlp-eGFP* et *Tlp-GST* au locus génomique de *B. melitensis* 16M.

Les vecteurs pSKoriT-*shortTlp-eGFP-amp-kan* et pSKoriT-*shortTlp-GST-cat* ne possédant pas d'origine de réplication fonctionnelle chez *Brucella*, les clones de *B. melitensis* 16M qui poussent sur milieu sélectif l'ont intégré dans leur génome par recombinaison entre l'ORF_{*shortTlp*} que porte le plasmide et le gène *Tlp* de leur génome (Fig.43). L'intégration de ces vecteurs duplique l'ORF *Tlp*. Cependant, seule l'ORF fusionnée à la séquence du tag se trouve sous le contrôle du promoteur natif. Pour chacun des plasmides, l'intégration a été validée par PCR sur lysat bactérien (cfr Matériel et méthodes). Cela consiste à réaliser une PCR sur le surnageant d'une colonie bactérienne resuspendue dans un tampon isotonique, après centrifugation à haute vitesse.

Pour valider l'intégration des vecteurs, les PCR utilisent une amorce *forward* Am1 (Amont1) qui s'hybride 500pb en amont de l'ATG de *longTlp* et une amorce *reverse* universelle s'hybridant sur le plasmide intégré. Les résultats sont présentés aux figures 44 et 45, ils confirment l'intégration pour les deux vecteurs utilisés.

On dispose dès lors de deux souches de *B. melitensis* 16M codant une protéine de fusion, l'une code la *Tlp-eGFP*, l'autre, la *Tlp-GST*. Dans ces souches, la séquence codant la protéine de fusion est au locus génomique de *Tlp*, sous le contrôle de son promoteur authentique.

⁶ Un ORFéome est la collection complète des ORFs correspondant à l'ensemble des protéines potentiellement encodées au sein d'un organisme, clonées dans un vecteur. Pour *B. melitensis* 16M, cela représente environ 3200 ORFs clonées dans un vecteur d'entrée Gateway™. Une transformation de la souche DH10B d'*E. coli* est ensuite réalisée pour chaque vecteur d'entrée pDONR201-ORF. Ces souches sont conservées à -80°C dans du LB-glycérol 15%.

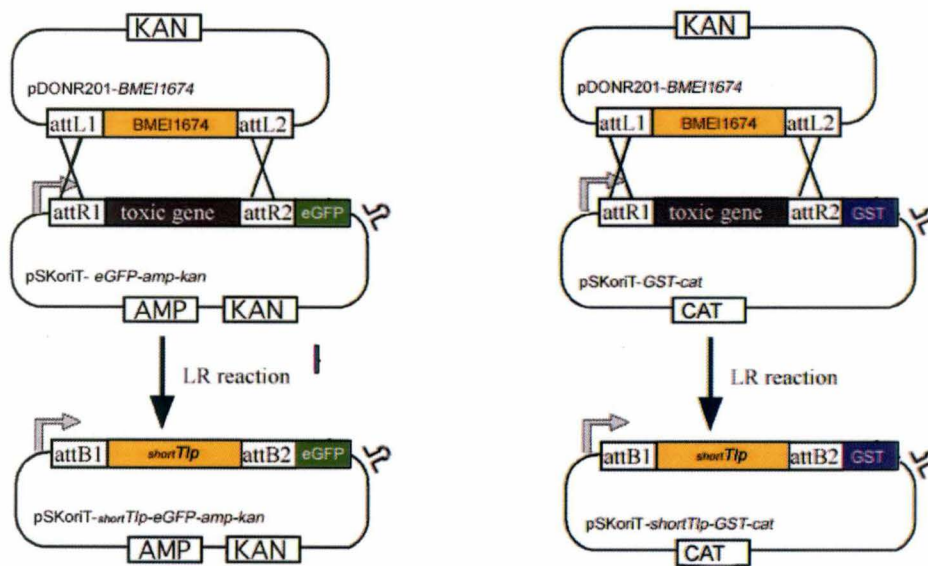


Figure 42. Représentations schématiques des réactions LR générant les vecteurs pSKoriT-*shortTlp-eGFP-amp-kan* et pSKoriT-*shortTlp-GST-cat* utilisés pour l'étude de l'expression de la protéine Tlp par *B. melitensis* 16M.

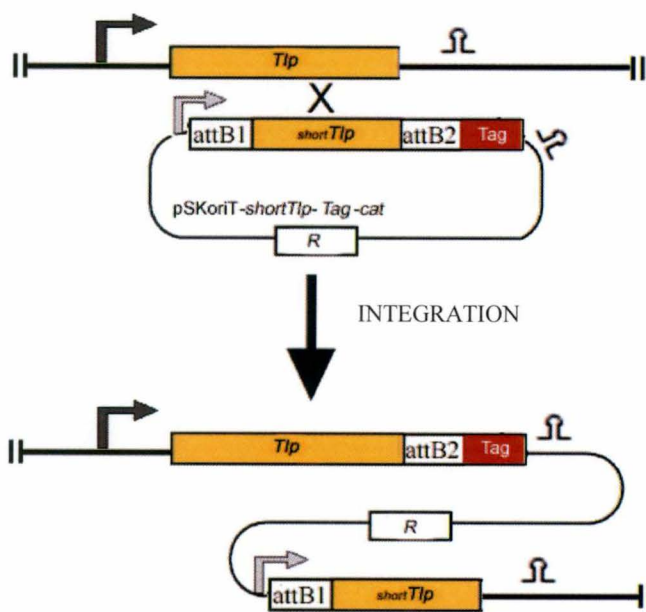


Figure 43. Représentation schématique de l'intégration de l'ORF codant une protéine de fusion Tlp-Tag au locus génomique. L'ORF *Tlp* (en jaune) se trouve sous le contrôle de son promoteur natif (flèche noire) au locus génomique (en trait noir). L'ORF de la protéine de fusion *shortTlp-tag* (en jaune et rouge) est portée par un plasmide suicide chez *Brucella* sous le contrôle du promoteur pLac (flèche grise). Une recombinaison entre ces deux ORFs place l'ORF codant la protéine de fusion Tlp-tag sous le contrôle du promoteur natif de *Tlp* au locus génomique. Tag : GST ou eGFP ; R : gène de résistance à un antibiotique.

4. Etude in vitro de l'expression de la protéine Tlp par western blot.

4.1. Extraits protéiques préparés.

La technique de western blot (cfr. Matériel et méthodes) a été utilisée pour détecter l'expression de la protéine Tlp taguée chez *B. melitensis* 16M en culture in vitro. Les différentes souches utilisées et les conditions d'extraction de leurs protéines sont résumées dans le tableau suivant.

Souches de Bmei	Transformation	Tlp	Promoteur	culture	Extraits protéiques ⁷
Wt	-	Tlp	Natif	2YT	1h, 6h, 24h
<i>Tlp-eGFP</i>	-	Tlp-eGFP	Natif	2YT-kan	24h
Wt	pMR-MCS10- <i>shortTlp-eGFP-cat</i>	<i>shortTlp-eGFP</i>	pLac	2YT-cm	-
Wt	pMR-MCS10- <i>longTlp-eGFP-cat</i>	<i>longTlp-eGFP</i>	pLac	2YT-cm	-
<i>Tlp-GST</i>	-	Tlp-GST	Natif	2YT-cm	1h, 6h, 24h
Wt	pBBR-MCSI- <i>shortTlp-GST-cat</i>	<i>shortTlp-GST</i>	pLac	2YT-cm	24h
Wt	pBBR-MCSI- <i>longTlp-GST-cat</i>	<i>longTlp-GST</i>	pLac	2YT-cm	24h

Tableau 6. Conditions de réalisation du western blot. Souches de Bmei, souches de *B. melitensis* 16M à partir desquelles les extraits protéiques ont été préparés, wt : souche sauvage ou *wild type*, *Tlp-eGFP* : souche codant la protéine de fusion Tlp-eGFP (fusion C-terminale) sous le contrôle du promoteur natif du gène *Tlp*, *Tlp-GST* : souche codant la protéine de fusion Tlp-GST (fusion C-terminale) sous le contrôle du promoteur natif du gène *Tlp* (Ces deux dernières souches ont été décrites au point 2 et 3 ci dessus) ; **Transformation**, la souche sauvage a été transformée ou non par un vecteur, pMR-MCS10 : plasmide répliquatif et à faible nombre de copies chez *Brucella*, pBBR-MCSI : plasmide répliquatif et à moyen nombre de copies chez *Brucella* ; **Tlp**, forme de la protéine Tlp (éventuellement) exprimée par la souche ; **Promoteur**, promoteur contrôlant l'expression du gène *Tlp*, pLac : promoteur fort de l'opéron lactose chez *E. coli*, Natif : promoteur authentique du gène *Tlp* ; **Culture**, condition de mise en culture liquide de la souche, cm : chloramphénicol, kan : kanamycine ; **Extraits protéiques**, temps de culture de la souche après lesquels les extraits protéiques ont été préparés. Les lignes apparaissant en bleu concernent les souches qui nous permettront de tester l'expression de la protéine hypothétique Tlp.

Les extraits protéiques préparés à partir des souches de *B. melitensis* 16M, qui possèdent soit l'ORF *Tlp-GST*, soit l'ORF *Tlp-eGFP* au locus génomique sous le contrôle du promoteur natif, constituent les échantillons tests. L'extraction protéique a été réalisée pour trois phases de croissance distinctes, la phase de latence (1 heure), la phase exponentielle (6 heures) et la phase stationnaire (24 heures). Cela permettra de mettre en évidence une éventuelle induction de l'expression de la protéine Tlp au cours d'une phase donnée.

L'extrait protéique de la souche sauvage non transformée est utilisé comme contrôle négatif, il permet de mettre en évidence un éventuel manque de spécificité de l'anticorps utilisé.

Les extraits protéiques des diverses souches sauvages transformées individuellement par un plasmide répliquatif portant l'ORF d'une protéine de fusion (*shortTlp-eGFP*, *longTlp-eGFP*, *shortTlp-GST* ou *longTlp-eGFP*) sous le contrôle du promoteur constitutif pLac sont destinés à mettre en évidence la taille de celles-ci. L'extraction protéique est réalisée lors de la phase stationnaire de leur croissance. La construction de ces vecteurs est résumée dans

⁷ Pour des raisons techniques, l'étude de l'expression utilisant la protéine taguée Tlp-eGFP n'a pu être réalisée qu'en phase stationnaire de croissance. Les plasmides pMR-MCS10-*shortTlp-eGFP-cat* et pMR-MCS10-*longTlp-eGFP-cat* construits n'ont pu être utilisés endéans le temps imparti.

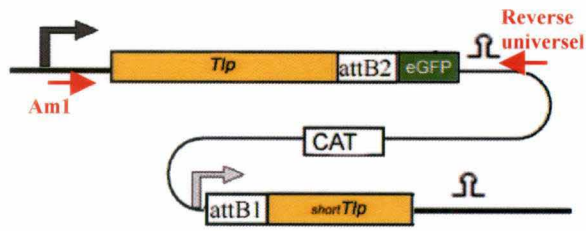
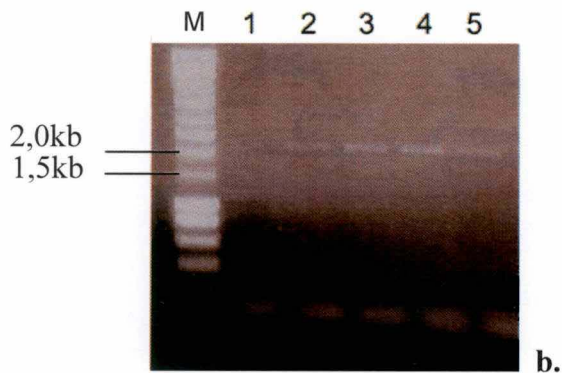


Figure 44. Validation de l'intégration du plasmide pSKoriT-*shortTlp-eGFP-bla-kan* dans le génome de *B. melitensis* 16M par PCR sur lysat bactérien.

(a) Représentation schématique du fragment génomique à amplifier et des primers utilisés.

(b) Electrophorèse en gel d'agarose montrant le produit PCR correspondant à l'amplification du fragment entre les deux amorces d'une taille de 2,3 kb.



M : marqueur de poids moléculaires (Hyperladder).

1 : contrôle négatif de PCR.

2 à 5 : PCR réalisée sur des clones d'intérêt de *B. melitensis* 16M.

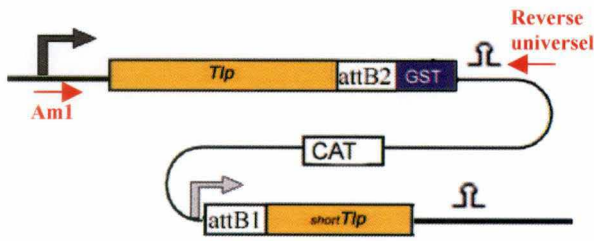
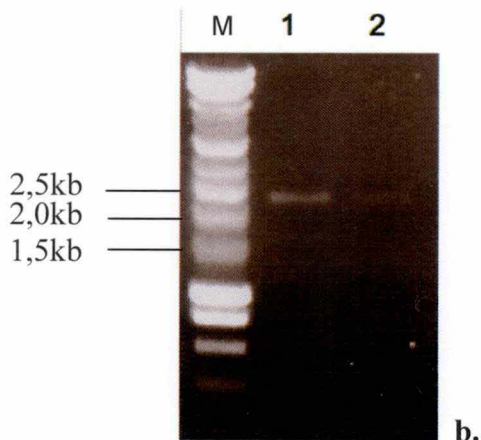


Figure 45. Validation de l'intégration du plasmide pSKoriT-*shortTlp-GST-cat* dans le génome de *B. melitensis* 16M par PCR sur lysat bactérien.

(a) Représentation schématique du fragment génomique à amplifier et des primers utilisés.

(b) Electrophorèse en gel d'agarose montrant le produit PCR correspondant à l'amplification du fragment entre les deux amorces d'une taille de 2,4 kb.



M : marqueur de poids moléculaires (Hyperladder)

1 et 2 : PCR réalisée sur des clones d'intérêt de *B. melitensis* 16M.

l'encadré *Construction des plasmides destinés aux divers contrôles* ci-dessous. Celui-ci peut-être passé par le lecteur sans nuire à la compréhension de la suite du travail.

Construction des plasmides destinés aux divers contrôles.

Plusieurs plasmides réplicatifs chez *Brucella* ont été construits au cours de ce mémoire pour servir de contrôle au test d'expression de la Tlp. Ces vecteurs ont tous été obtenus en utilisant le système GatewayTM de clonage par recombinaison. Leur construction est résumée dans le tableau qui suit (tableau b). Le vecteur d'entrée pDONR201-BMEI1674 qui porte l'ORF *shortTlp* est disponible dans l'ORFéome de *B.melitensis* 16M. Le vecteur d'entrée pDONR201-*longTlp* a été construit par réaction BP (Fig. 7) entre l'ORF *longTlp* flanquée des sites attB1 et attB2, issue d'une amplification PCR sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M (tableau a).

Vecteur donneur	Produit PCR	Produit de réaction BP	Vecteur construit en vue de...
pDONR201	attB1- <i>longTlp</i> -attB2	pDONR201- <i>longTlp</i>	Son utilisation lors des réactions LR présentées dans le tableau b.

Tableau a. Réaction BP permettant d'obtenir le vecteur d'entrée pDONR201-*longTlp*.

Vecteur d'entrée	Vecteur de destination	Produit de réaction LR	Vecteur construit en vue de...
pDONR201- <i>longTlp</i>	pBBR-MCSI-3HA- <i>cat</i>	pBBR-MCSI- <i>longTlp</i> -3HA- <i>cat</i>	Tester l'expression du tag 3HA par <i>B.melitensis</i> 16M.
pDONR201- <i>longTlp</i>	pBBR-MCSI-GST- <i>cat</i>	pBBR-MCSI- <i>longTlp</i> -GST- <i>cat</i>	Tester l'expression du tag GST par <i>B.melitensis</i> 16M. Mettre en évidence la taille de la protéine de fusion <i>longTlp</i> -GST
pDONR201- <i>longTlp</i>	pBBR-MCSI-13Myc- <i>cat</i>	pBBR-MCSI- <i>longTlp</i> -13Myc- <i>cat</i>	Test de l'expression du tag 13Myc par <i>B.melitensis</i> 16M.
pDONR201- <i>longTlp</i>	PMR-MCS10-eGFP- <i>cat</i>	PMR-MCS10- <i>longTlp</i> -eGFP- <i>cat</i>	Mettre en évidence la taille de la protéine de fusion <i>longTlp</i> -eGFP
pDONR201- <i>shortTlp</i>	PMR-MCS10-eGFP- <i>cat</i>	PMR-MCS10- <i>shortTlp</i> -eGFP- <i>cat</i>	Mettre en évidence la taille de la protéine de fusion <i>shortTlp</i> -eGFP
pDONR201- <i>shortTlp</i>	pBBR-MCSI-GST- <i>cat</i>	pBBR-MCSI- <i>shortTlp</i> -GST- <i>cat</i>	Mettre en évidence la taille de la protéine de fusion <i>shortTlp</i> -GST

Tableau b. Réactions LR réalisées en vue d'obtenir des plasmides nécessaires à la réalisation du test d'expression de la Tlp.

4.2. Mise en évidence de l'expression de la Tlp par *B. melitensis* 16M.

Le résultat est présenté à la figure 46. La surexpression de la protéine *shortTlp*-GST permet de la visualiser par western blot à une taille comprise entre 40 kDa et 50 kDa (Fig 46a). Sa taille calculée est de 43,601 kDa, comme le propose le tableau 3 résumant les différentes tailles de protéines potentiellement observables lors du test.

L'expression de la protéine *longTlp*-GST sous le contrôle du promoteur constitutif fort pLac confirme ce qui a été observé lors du test d'expression du tag (Fig. 40). Ainsi, une protéine d'un poids moléculaire d'environ 52,2 kDa compatible avec celui de *longTlp*-GST (58,873 kDa) et une protéine de poids moléculaire proche de celui de *shortTlp*-GST, sont détectées (Fig. 46a). Dans les deux pistes "contrôle de taille", la bande intense observée aux alentours de 29 kDa correspond au tag GST (27, 971 kDa).

Aucun signal n'est détecté dans les pistes correspondant aux extraits protéiques de la souche *Tlp*-GST pour les différents temps de croissance, et ce, malgré un temps d'exposition prolongé (Fig. 46c). Afin de contrôler les extraits protéiques réalisés dans chaque condition et leur chargement correct, la membrane du western blot a été *strippée* et incubée en présence d'un anticorps monoclonal anti-*omp89* (*outer membrane protein 89kDa*) (Fig. 46b). La protéine de 89 kDa est détectée en quantité plus ou moins équivalente dans chaque échantillon. Ce résultat indiquerait l'absence d'expression de la protéine Tlp *in vitro* en quantité détectable.

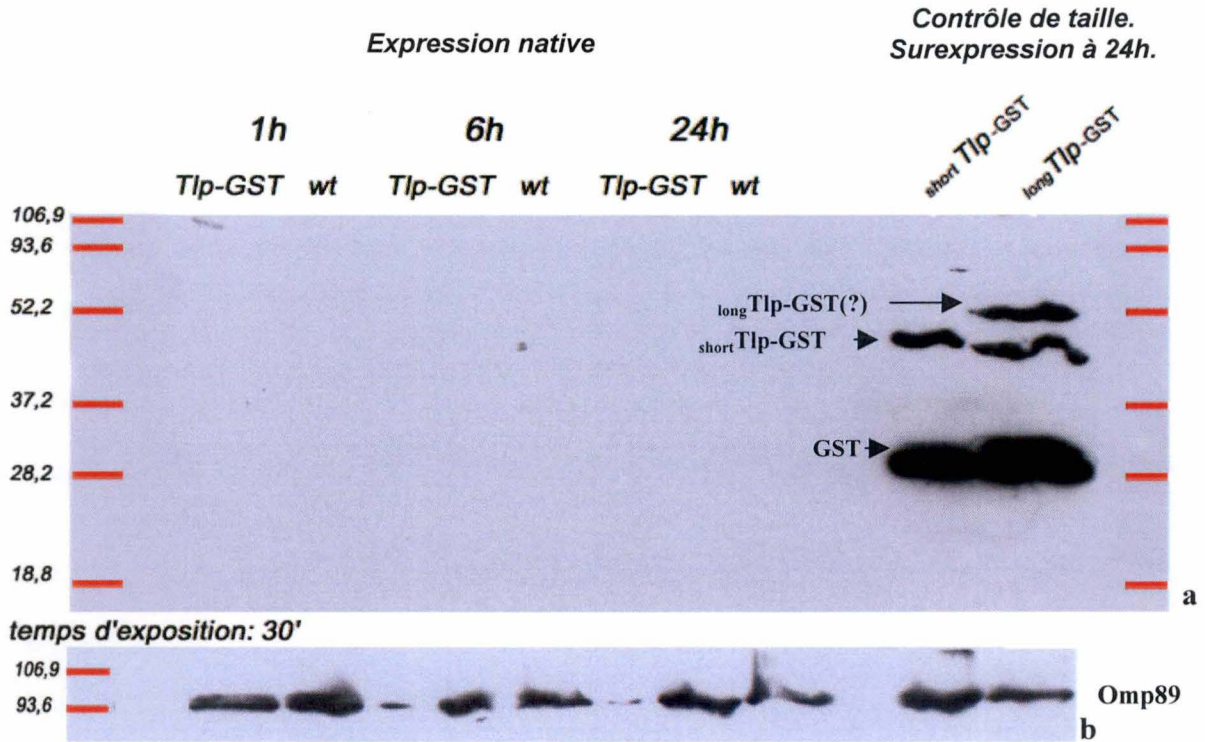
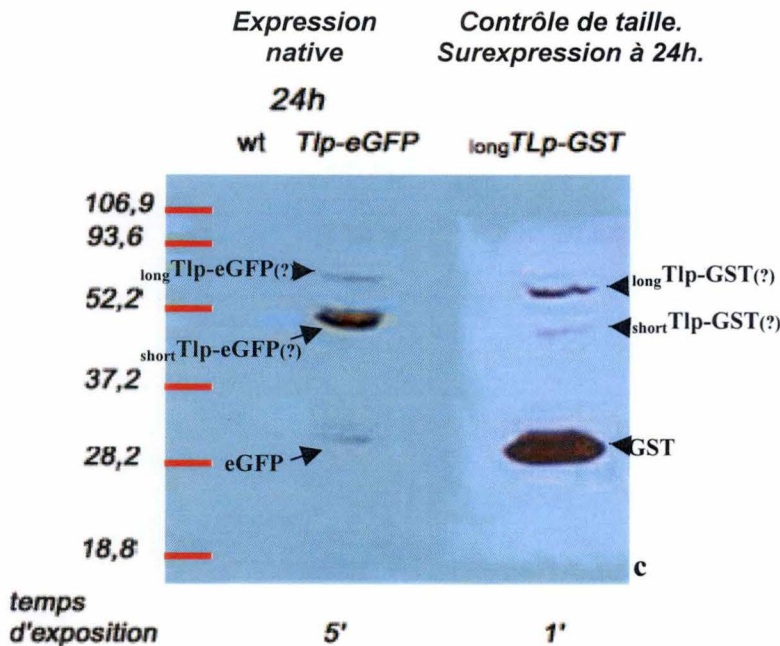


Figure 46. Etude in vitro de l'expression de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M par western blot (La taille des protéines du marqueur est exprimée en kDa).

a. Résultat du western blot anti-GST réalisé sur les extraits protéiques des souches sauvage (wt) et *Tlp-GST* (*Tlp-GST*) de *B. melitensis* 16M, préparés à partir de bactéries en phase de latence (1h), en phase exponentielle de croissance (6h) et en phase stationnaire (24h). A droite, figure le résultat du western blot anti-GST réalisé sur les extraits protéiques de *B. melitensis* 16M sauvages transformées individuellement, soit par le pBBR-MCSI-*shortTlp-GST-cat* (*shortTlp-GST*), soit par le pBBR-MCSI-*longTlp-GST-cat* (*longTlp-GST*). Aucun signal n'est détecté dans les pistes *Tlp-GST*. Les pistes *shortTlp-GST* et *longTlp-GST* mettent en évidence une différence de taille entre les produits protéiques des deux versions de l'ORF *Tlp* que nous avons retenues. La piste *longTlp-GST* révèle la présence de protéines de deux tailles. La bande aux alentours de 28kDa correspond au tag GST.



b. Résultat du western blot anti-omp 89 après strippage de la membrane. Ce contrôle met en évidence que l'absence de signal en **a** n'est pas dû à l'absence de protéines dans les échantillons chargés.

c. Résultat du western blot anti-GFP réalisé sur les extraits protéiques de la souche sauvage (wt), de la souche *Tlp-eGFP* (*Tlp-eGFP*) et de la souche sauvage transformée par le plasmide répliatif pBBR-MCSI-*longTlp-GST-cat* (*longTlp-GST*) préparés à partir de cultures en phase stationnaire (24h). La piste *longTlp-GST* peut être utilisée comme contrôle de taille vu le P.M. proche des tags GST et eGFP. La bande obtenue à plus de 52,2 kDa reflète l'expression d'une version longue de la protéine Tlp. Une bande de taille inférieure ainsi qu'une bande correspondant au tag eGFP sont également détectée.

Par contre, un signal est détecté, après un temps d'exposition prolongé (5 minutes) sur l'extrait protéique de la souche *Tlp-eGFP* en phase stationnaire de croissance (Fig. 46c). Le profil à trois bandes observé est semblable à celui obtenu après le western blot anti-GST réalisé sur l'échantillon protéique de *B. melitensis* 16 M surexprimant la protéine *longTlp*. Les poids moléculaires des tags eGFP et GST sont très proches (tableau 7), ils correspondent à la plus petite bande qui reflète de nouveau soit une traduction opéronique, soit une protéolyse (probablement) au site de fusion. Les deux autres bandes révèlent la présence d'une version longue et d'une version courte de la Tlp.

Ainsi, l'anticorps anti-GFP permet de mettre en évidence l'expression de la protéine Tlp par *B. melitensis* 16M in vitro. Les bandes obtenues nous amènent à penser d'une part, que la bactérie pourrait exprimer une version longue de la protéine, c'est-à-dire une version dont la taille est compatible avec la présence des domaines TIR et coiled-coil (entre 53 et 60 kDa lorsque fusionnée à la eGFP), et d'autre part, une version courte qui ne porte que le domaine TIR (dont le P.M. est situé entre 40 et 50 kDa lorsque fusionnée à la eGFP) pourrait être exprimée à partir de l'ORF de grande taille du génome.

Cependant, ni pour les échantillons utilisés pour le contrôle de taille de la *longTlp*, ni pour l'échantillon protéique issu de la souche *longTlp-eGFP*, le test ne permet de déterminer la taille exacte des protéines détectées et d'identifier les ORF ainsi transcrites. En effet, les différences de taille entre les trois versions longues potentielles de la Tlp (à savoir les protéines issues des *ORF3*, *ORF4* et *longTlp*) fusionnées au tag eGFP sont minimales du point de vue de la technique employée. Il en va de même pour les produits des ORFs potentielles, *shortTlp* et *ORF2*.

Cette bande correspondant à une protéine Tlp de faible poids moléculaire, systématiquement détectée lorsque la bactérie exprime une version longue de celle-ci, pourrait néanmoins simplement révéler un clivage protéolytique à un site préférentiel, situé entre les deux domaines de la *longTlp*-tag.

	<i>shortTlp</i>	<i>ORF2-Tlp</i>	<i>ORF3-Tlp</i>	<i>ORF4-Tlp</i>	<i>longTlp</i>
Poids moléculaire de la protéine fusionnée au tag GST (kDa)	43,601	44,420	52,722	55,950	58,873
Poids moléculaire de la protéine fusionnée au tag eGFP (kDa)	42,571	43,390	51,692	54,920	57,843
Poids moléculaires du tag GST : 27,971kDa (239 a.a.)					
Poids moléculaires du tag eGFP : 26,941kDa (239 a.a.)					

Tableau 7. Poids moléculaire (en kDa) des différentes versions hypothétiques de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M fusionnées au tag GST ou eGFP. Les protéines hypothétiques issues de l'expression des ORFs *shortTlp* et *ORF2-Tlp* (cfr. Fig. 4) ne pourraient être distinguées avec précision sur un western blot anti-GST ou anti-GFP. Elles seraient de petite taille et dépourvues de domaine coiled-coil. Les différences de taille entre les protéines hypothétiques issues des *ORF3-Tlp*, *ORF4-Tlp* et *longTlp* qui portent un domaine coiled-coil N-terminal, sont également trop petites pour permettre de les discriminer par western blot.

Même si le western blot anti-GST n'a pas permis de le montrer, la détection de la protéine Tlp par l'utilisation du tag eGFP suffit à attester du fait que cette protéine est exprimée. BMEI1674 abandonne ainsi son statut de protéine hypothétique, et on peut parler de *TIR-like protein*.

5. Etude de l'expression de la protéine Tlp par fluorescence.

5.1. Etude in vitro de l'expression de la protéine Tlp.

Un petit volume de culture liquide de la souche *Bmei Tlp-eGFP* en phase stationnaire a été déposée sur *agarose pad* afin d'être observé en microscopie à fluorescence (cfr. Matériel

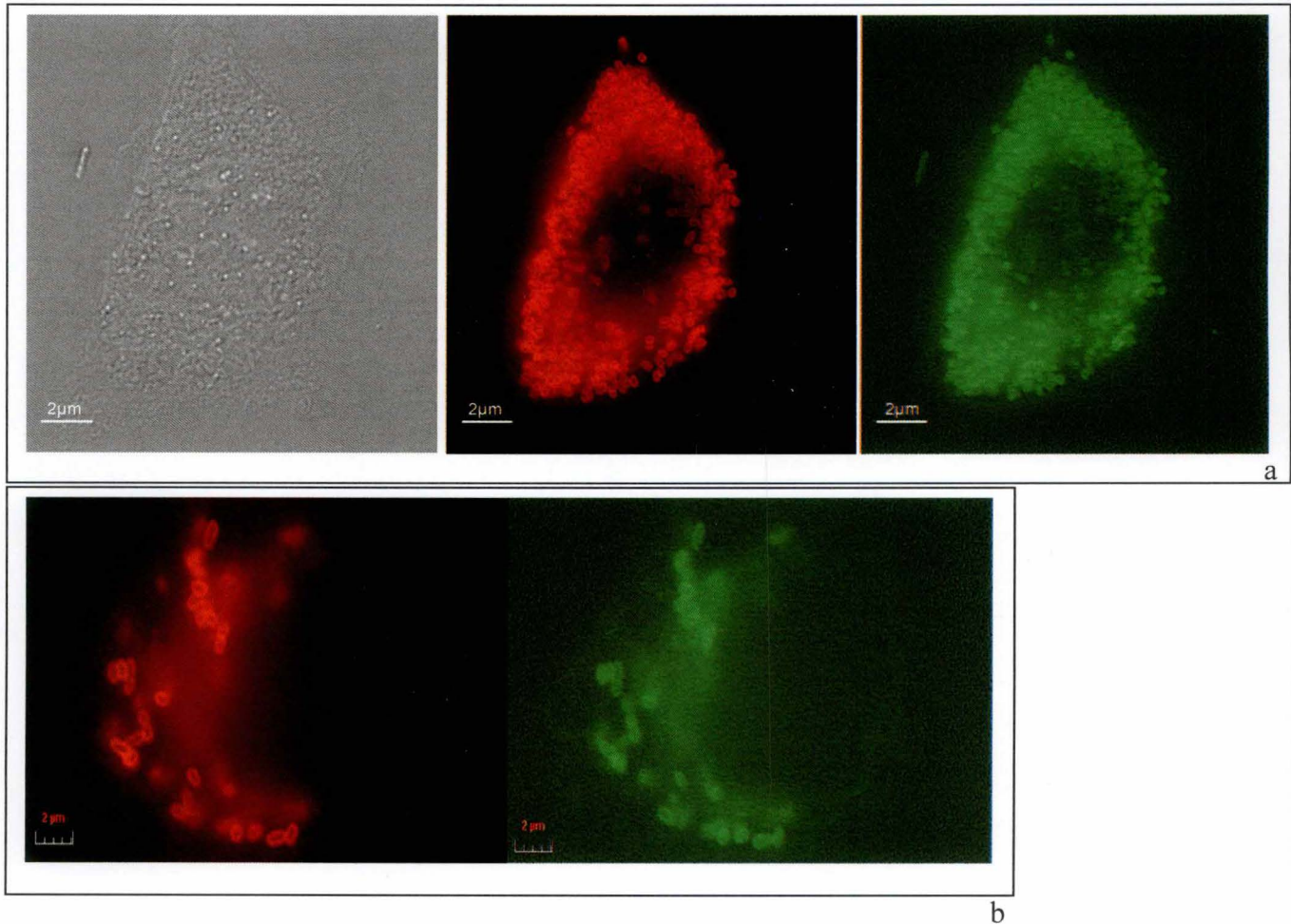


Figure 47. Etude ex-vivo de l'expression de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M par fluorescence. (a) Les trois images montrent un macrophage bovin SV40 infecté par la souche *Tlp-eGFP* de *B. melitensis* 16M. Respectivement de gauche à droite, observation du macrophage en DIC (Differential Interference Contrast), observation du LPS (en rouge) des bactéries au sein du macrophage et observation d'un signal potentiellement émis par la *Tlp-eGFP*. (b) Plan d'observation rapproché des bactéries au sein d'un macrophage. A gauche, observation du LPS (en rouge) des bactéries au sein du macrophage ; à droite, observation d'un signal potentiellement émis par la *Tlp-eGFP*. Le signal vert fluorescent recueilli est localisé en membrane des bactéries. Il est vraisemblablement associé au fluorochrome utilisé pour observer le LPS, puisque le même résultat est observé lors de l'infection par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (résultat non montré).

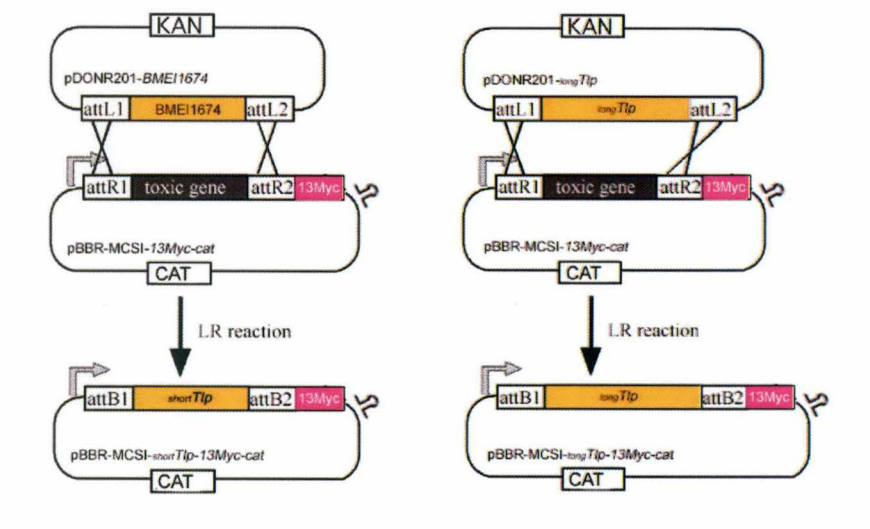


Figure 48. Représentations schématiques des réactions LR générant les vecteurs pBBR-MCSI-*shortTlp-13Myc-cat* et pBBR-MCSI-*longTlp-13Myc-cat* utilisés pour l'étude de l'expression de la protéine Tlp par *B. melitensis* 16M.

et méthodes). En comparaison de la souche sauvage, on ne détecte pas de signal du tag rapporteur eGFP (résultat non montré).

5.2. Etude ex-vivo de l'expression de la protéine Tlp.

Nous avons également tenté de mettre en évidence l'expression de la protéine Tlp lors de l'infection de cellules par *B. melitensis* 16M, une condition dans laquelle elle serait susceptible d'exprimer l'effecteur hypothétique.

5.2.1. Infection de macrophages.

La souche *Bmei Tlp-eGFP* a été utilisée lors de l'infection d'une monocouche de macrophages bovins SV40 (cfr. Matériel et méthodes). La *multiplicity of infection* (MOI), c'est-à-dire le nombre de bactéries déposées par cellule eucaryote est de 300. L'infection a été réalisée en triplicat et on dispose d'un contrôle, des macrophages infectés par la souche sauvage avec la même MOI. Après avoir éliminé les bactéries qui ne sont pas entrées dans les cellules par un traitement antibiotique, les macrophages sont incubés pendant 48 heures. A ce stade, les bactéries ont établi leur niche de réplication au sein de la cellule hôte, et elles s'y multiplient activement.

5.2.2. Observation des cellules infectées au microscope à fluorescence.

Avant d'observer les macrophages au microscope à fluorescence, ils ont été fixés, perméabilisés et incubés en présence d'un anticorps primaire anti-LPS puis d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa 568nm émettant dans le rouge après excitation. L'utilisation de ces anticorps permet de mettre en évidence les bactéries. On observe 48 heures après l'infection, que le cytosol des macrophages infectés est chargé de *Brucella*.

L'observation des macrophages infectés par la souche *Bmei Tlp-eGFP*, après excitation du tag fluorescent eGFP, ne permet pas de révéler la présence de Tlp. En effet, le signal recueilli dans le vert pour ces macrophages (Fig.47) est semblable à celui que l'on observe pour les macrophages infectés par la souche sauvage. Il est peu intense et localisé en membrane, et reflète vraisemblablement un signal issu fluorochrome utilisé pour visualiser le LPS.

C. La TIR-like protein, protéine sécrétée ?

Après avoir démontré que *B. melitensis* 16M exprime une protéine à domaine TIR, nous avons émis l'hypothèse qu'elle est un effecteur capable d'interférer avec l'immunité innée de l'hôte.

Pour interférer avec les voies de signalisation TIR dépendante déclenchées par les TLRs ou par les récepteurs de la famille IL-1R, la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M doit atteindre le cytoplasme de la cellule infectée, et dès lors être sécrétée par la bactérie. Nous avons ainsi tenté de mettre en évidence la capacité de sécrétion de cette protéine par *B. melitensis* 16M, et également cherché à savoir si cette protéine pouvait être transloquée par le système de sécrétion de type IV.

Pour ce faire, on a tenté de détecter, par western blot, la protéine Tlp fusionnée à un tag dans le surnageant d'une culture de la souche sauvage de *B. melitensis* 16M d'une part et d'une souche mutée pour le T4SS d'autre part.

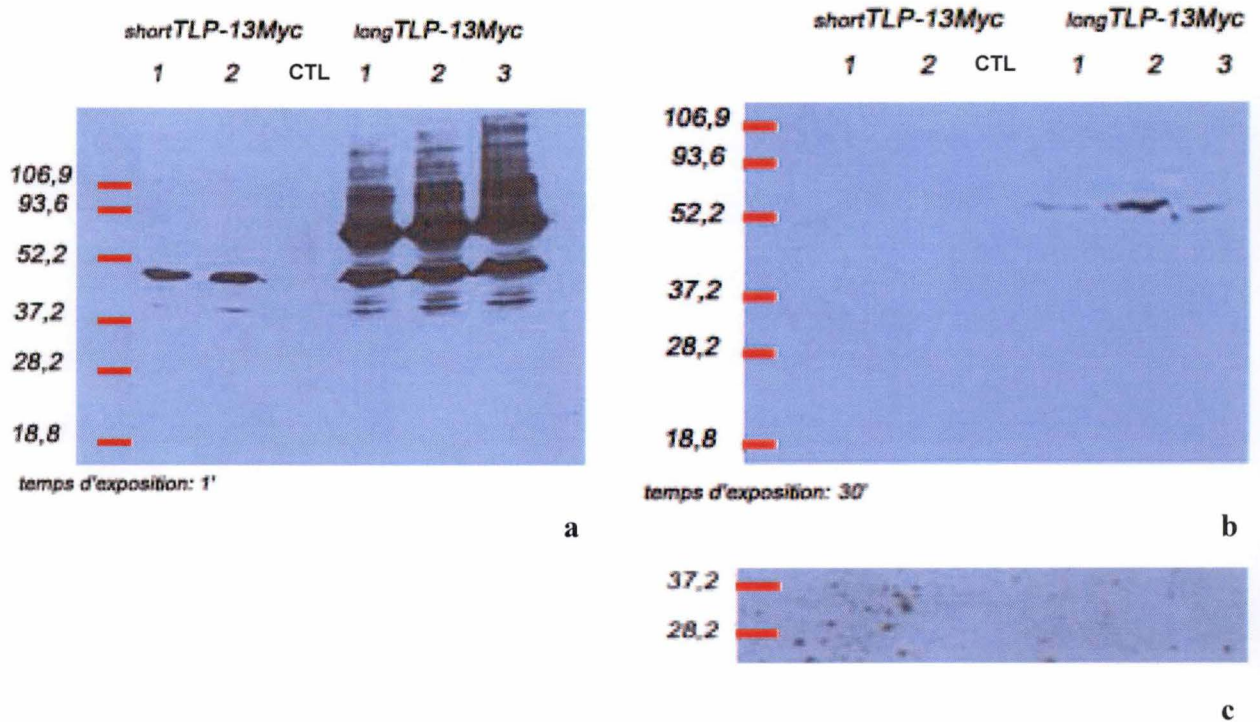


Figure 49. Etude in vitro de la sécrétion de la protéine Tlp par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (La taille des protéines du marqueur est exprimée en kDa).

a. Résultat du western blot anti-Myc réalisé sur les extraits protéiques de plusieurs clones de souches sauvages transformées soit par pBBR-MCSI-*shortTlp-13Myc-cat* (*shortTlp-13Myc*, 2clones), soit par pBBR-MCSI-*longTlp-13Myc-cat* (*longTlp-13Myc*, 3clones). Le résultat montre la présence des protéines de fusion dans le culot bactérien. La piste *longTlp-13Myc* révèle la présence de deux bandes intenses, une correspondant à une version longue de la protéine de fusion, l'autre correspondant à une version courte de celle-ci.

b. Résultat du western blot anti-Myc réalisé sur le surnageant de culture des souches utilisées en **a**. Il révèle la présence d'une protéine de taille compatible à celle de la protéine de fusion *longTlp-13Myc*. Elle est détectée pour les trois clones. La bande de taille inférieure systématiquement détectée dans le culot n'apparaît pas. La protéine *shortTlp-13Myc* n'est, quant à elle, pas détectée.

c. Résultat du western blot anti-CtrA réalisé sur les échantillons de **b**. Aucun signal n'est détecté.

1. Construction de vecteurs réplicatifs Tlp-13Myc.

Afin de pouvoir détecter spécifiquement la protéine en western blot sans entraver sa sécrétion éventuelle, on a utilisé une construction plasmidique codant la protéine de fusion Tlp-13Myc⁸.

De la même manière que le résultat du test d'expression de Tlp en western blot peut porter à croire que deux versions de la protéine seraient exprimées, on a voulu savoir si les deux versions seraient susceptibles d'être sécrétées. On a dès lors travaillé avec la protéine de fusion *long*Tlp-13Myc ainsi que la protéine *short*Tlp-13Myc.

Plus précisément, on a cloné les ORFs *longTlp* et *shortTlp* par GatewayTM dans un vecteur de destination *medium copy* réplicatif chez *Brucella* qui permet leur fusion en phase à la séquence codant le tag 13Myc, le pBBR-MCSI-13Myc-cat (Fig.48). Dans celui-ci, l'expression de l'ORF de la protéine de fusion est contrôlée par le promoteur constitutif Plac. Utiliser un plasmide réplicatif et un promoteur fort permet de minimiser le volume de culture de la bactérie pathogène nécessaire à l'expérience. Les deux constructions ont été validées par restriction diagnostique (résultat non montré) avant d'être transférées individuellement par conjugaison dans la souche sauvage de *B. melitensis* 16M. Les transformants sont sélectionnés en présence de chloramphénicol.

2. Etude de la sécrétion chez la souche sauvage de *B. melitensis*.

On dispose ainsi d'une souche sauvage de *B. melitensis* 16M exprimant la protéine *short*Tlp-13Myc (C-terminal) et d'une souche sauvage exprimant la protéine de fusion *long*Tlp-13Myc (C-terminal). Celles-ci sont mises individuellement en culture liquide pendant 24 heures, en présence de chloramphénicol afin de maintenir la pression de sélection.

Un western blot anti-Myc sur l'extrait protéique du culot bactérien atteste l'expression de chacune des protéines de fusion (Fig. 49a). Les tailles attendues pour chaque version potentielle de la Tlp fusionnée au tag 13Myc sont résumées dans le tableau 8. On remarque que la protéine *long*Tlp-13Myc est exprimée à un niveau plus élevé que *short*Tlp-13Myc. Encore une fois, la version longue est associée à une version courte de Tlp. L'extrait protéique d'une souche sauvage de *B. melitensis* 16M transformée par le plasmide pBBR-MCSI exempt d'insert et de cassette GatewayTM est utilisé comme contrôle négatif, il permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé.

	<i>short</i> Tlp	ORF2-Tlp	ORF3-Tlp	ORF4-Tlp	<i>long</i> Tlp
Poids moléculaire de la protéine fusionnée au tag 13Myc (kDa)	36,123	36,942	45,244	48,472	51,395
Poids moléculaires du tag 13Myc : 20,493kDa (183 a.a.)					

Tableau 8. Poids moléculaire (en kDa) des différentes versions potentielles de la protéine Tlp de *B.melitensis* 16M fusionnées au tag 13Myc.

Par ailleurs, après filtration de chaque culture, les protéines du surnageant ont été concentrées par précipitation (cfr. Matériel et méthodes) et un western blot utilisant le même anticorps a été réalisé (Fig. 49b).

Le résultat met en évidence une bande compatible avec le poids moléculaire de *long*Tlp (bande aux alentours de 52kDa). Une version longue de la protéine Tlp se retrouve dans le surnageant de la culture. La *short*Tlp semble quant à elle en être absente. De manière

⁸ On ne disposait pas de tag plus petit pour diverses raisons. Le tag 3HA n'a donné aucun résultat en western blot sur les extraits protéiques de *Brucella* et les tags FLAG et Lumio ne sont pas (encore) disponibles sur un vecteur de destination réplicatif chez *Brucella*.

intéressante, la protéine de faible P.M. systématiquement détectée en même temps que la protéine de haut P.M. lors des western blots sur culot bactérien, n'apparaît pas lors du western sur surnageant de culture. Ainsi, la détection de la seule version longue de la protéine Tlp dans le surnageant permet de proposer qu'elle soit sécrétée. Pour confirmer qu'il s'agit bien d'une sécrétion et non pas d'une lyse bactérienne en culture, on a tenté de détecter une protéine typiquement cytoplasmique dans le surnageant de culture. Ainsi, après avoir été *strippée*, la membrane a été incubée en présence d'un anticorps anti-CtrA. CtrA est une protéine de grande taille (29kDa) abondante dans le cytoplasme et qui n'est pas sécrétée par *Brucella*. L'absence de signal dans le surnageant des différentes cultures reflète un niveau de lyse trop faible pour détecter en western blot les protéines libérées (Fig. 49c).

3. Etude de la sécrétion chez *B. melitensis* Δ VirB.

Après avoir proposé que la protéine Tlp est sécrétée par *B. melitensis* 16M en phase stationnaire, on a voulu savoir si elle est transloquée par le système de sécrétion de type IV (T4SS). Celui-ci est encodé par l'opéron *virB* constitué de 12 gènes (Delrue et al., 2001). Un mutant de délétion de l'opéron *virB* a été construit au laboratoire (Nijskens C., thèse en cours).

Aussi, pour répondre à la question, on a transféré individuellement les plasmides pBBR-MCSI-*longTlp-13Myc-cat* et pBBR-MCSI-*shortTlp-13Myc-cat* dans la souche *B. melitensis* 16M Δ VirB. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu pourvu de chloramphénicol.

La présence de la protéine de fusion sera contrôlée par western blot anti-Myc sur les extraits protéiques issus de ces souches. Après précipitation des protéines du surnageant de culture, la présence de *longTlp-13Myc* et *shortTlp-13Myc* sera testée par un western blot utilisant le même anticorps.

D. La TIR-like protein, un facteur de virulence ?

La protéine Tlp est exprimée par *B. melitensis* 16M et sécrétée dans le surnageant d'une culture en phase stationnaire. En condition d'infection, cela suggère que la protéine Tlp pourrait être transloquée, directement ou non, dans le cytoplasme de la cellule infectée. Avant d'essayer de mettre en évidence sa capacité à interférer avec les processus cellulaires eucaryotes, on a voulu déterminer l'importance de son rôle durant l'infection. Ainsi, on a construit une souche de *B. melitensis* 16M délétée pour le gène codant cet effecteur potentiel⁹. La virulence résiduelle de cette souche mutée a été ensuite testée en modèle d'infection cellulaire et en modèle murin.

1. Construction d'une souche *B. melitensis* 16M Δ *longTlp*.

L'obtention de la souche de *B. melitensis* 16M délétée pour la séquence codant la protéine *longTlp* a nécessité la construction préalable d'un vecteur portant la version délétée du gène d'intérêt.

Afin de réaliser ce vecteur, les séquences de 500pb situées directement en amont et en aval de l'ORF *longTlp* ont été amplifiées par PCR, mises bout à bout avant que le fragment résultant de 1kb ne soit également amplifié par PCR. Ce dernier a été cloné dans un vecteur intermédiaire, le pGEM-T easy avant de passer dans le pJQ200-*genta*, plasmide suicide et

⁹ Deux souches de *B. melitensis* 16M mutées pour le gène *longTlp* ont été obtenues par deux moyens, la délétion simple Δ *longTlp* et le remplacement allélique Δ *longTlp* :: *aphA4*. La première souche a été utilisée au cours de la suite de ce travail.

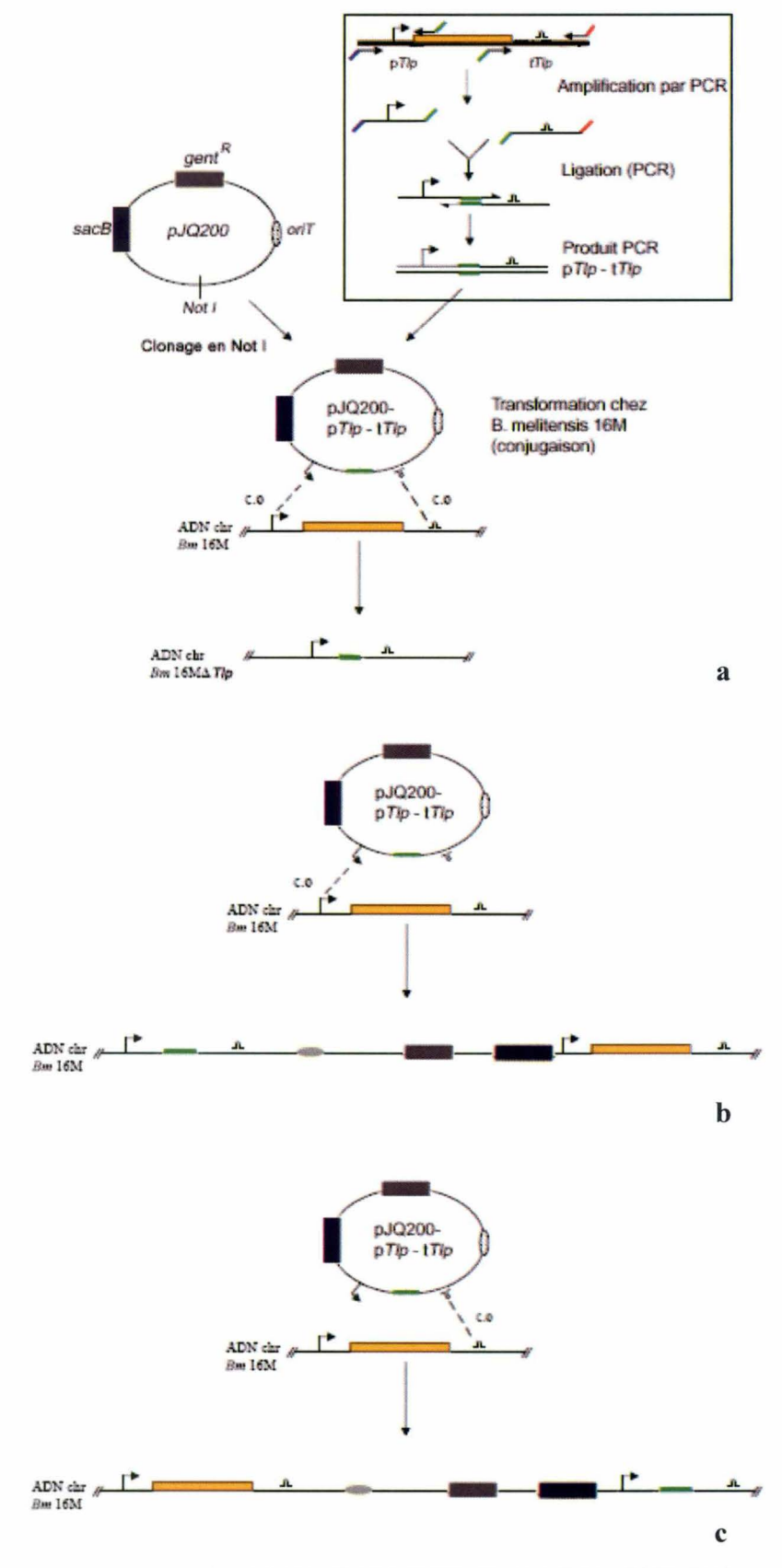


Figure 50. Représentation schématique de la construction de la souche ΔTlp de *B. melitensis* 16M.

Les étapes importantes sont reprises en a. Le génotype d'un *délétant*, conjuguant de *B. melitensis* 16M ayant subi un double événement de recombinaison est présenté en a. Les génotypes d'*intégrants*, conjuguant ayant subi un simple événement de recombinaison sont présentés en b et c.

$pTlp$, promoteur natif du gène Tlp ; $tTlp$, terminateur du gène Tlp ; $gent^R$, gène de résistance à la gentamycine; $sacB$, gène encodant la levansucrase de *Bacillus subtilis*; $oriT$, origine de transfert; $Not I$, site de restriction reconnu par l'enzyme $Not I$; $c.o.$, crossing-over; $ADN\ chr\ Bm\ 16M$, ADN chromosomique de *B. melitensis* 16M.

mobilisable chez *Brucella* qui porte le gène de résistance à la gentamycine et le gène SacB (Fig.50a). La résistance à la gentamycine permet de sélectionner les bactéries qui ont intégré (pop in) le vecteur par simple recombinaison au niveau de la région "amont" ou "aval" de la séquence codant *longTlp* (Fig.50b et Fig.50c). Ces clones recombinants dits *intégrants*, possèdent l'allèle sauvage du gène d'intérêt ainsi que la version délétée. Par la suite, le passage sur un milieu sucrose 5% permet de sélectionner les bactéries qui ont connu un second événement de recombinaison (pop out) et perdu le gène *sacB*, toxique dans ces conditions¹⁰, ainsi que l'allèle sauvage du gène *longTlp*. Ces clones sont des *délétants* (Fig. 50a).

Le génotype des candidats *délétants* obtenus a été analysé par PCR pour confirmer l'absence de l'ORF *longTlp*.

1.1. Amplification par PCR des parties amont et aval de l'ORF *longTlp*.

a) Définition des amorces.

Les amorces nucléotidiques ont été définies de manière à amplifier deux fragments de 500pb correspondant respectivement aux parties "amont" et "aval" de l'ORF *longTlp*. Quatre amorces ont donc été utilisées, deux pour la partie amont (désignées Am1 et Am2 pour amont 1 et 2) et deux pour la partie aval (désignées Av1 et Av2 pour aval 1 et 2) (Fig. 51).

Deux séquences complémentaires ont été ajoutées aux extrémités 5' des amorces Am2 et Av1 pour permettre, par la suite, de fusionner les parties "amont" et "aval" de l'ORF *longTlp*, amplifiées par PCR (Fig. 51).

b) Amplification par PCR.

L'amplification des régions "amont" et "aval" de l'ORF de *longTlp* a été réalisée par la Taq DNA polymérase à partir d'une préparation d'ADN génomique de la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M. Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%, et ont la taille attendue de 500pb (Fig. 52). Ils ont ensuite été purifiés.

La fusion des parties "amont" et "aval" a également été réalisée par amplification PCR. Le produit, analysé par électrophorèse en gel d'agarose 1%, a la taille attendue de 1kb (Fig. 53). Il a été purifié avant d'être utilisé par la suite.

1.2. Clonage intermédiaire dans le pGEM-T Easy.

Le fragment PCR purifié correspondant à la fusion "amont-aval", que l'on désignera par la suite Δ *longTlp*, a été cloné dans le pGEMTeasy. Le produit de ligation a été transformé dans une souche DH10B d'*E. coli* CaCl₂ compétente étalée par la suite sur milieu sélectif (LBagar-ampicilline) additionné d'IPTG et de X-gal pour un test blanc/bleu. Les colonies blanches, transformées par un plasmide dont le gène *lacZ'* a été disrupté par l'insert Δ *longTlp* ont été sélectionnées en vue d'une extraction d'ADN plasmidique. La construction ainsi récupérée a été validée par restriction diagnostique. Plusieurs clones candidats montrent le profil de restriction attendu (Fig. 54).

¹⁰ Le gène *SacB* de *Bacillus subtilis* encode une levansucrase responsable de la production de levan (un polymère de fructose de haut poids moléculaire) à partir de sucrose. Chez la plupart des bactéries gram-négatives la synthèse de ce sucre dans l'espace pérplasmique est létale.

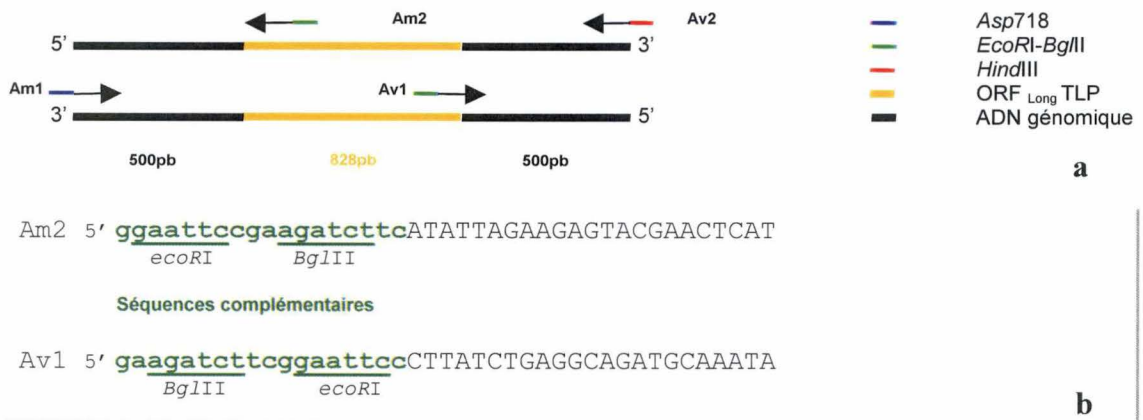


Figure 51. Définition des amorces utilisées en vue de la construction de la souche ΔTlp de *B. melitensis* 16M. a.

Localisation des amorces sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M. **b.** Complémentarité (en vert) des extrémités 5' des amorces Am2 et Av1 qui portent les sites de restriction *ecoRI* et *BglII*.

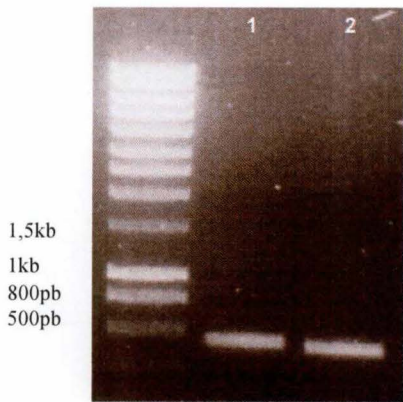


Figure 52. Electrophorèse en gel d'agarose montrant les produits d'amplification PCR des régions "amont" (1) et "aval" (2) de l'ORF_{Long}TLP. Ils ont la taille de 500 pb attendue.

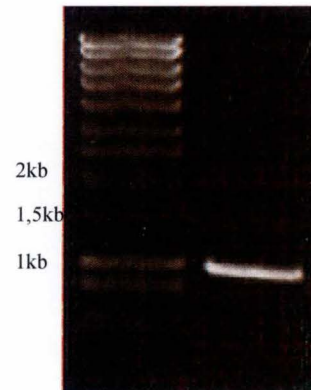


Figure 53.

Electrophorèse en gel d'agarose montrant le produit PCR correspondant à la fusion des régions "amont" et "aval" de l'ORF_{Long}TLP. Il a la taille de 1kb attendue

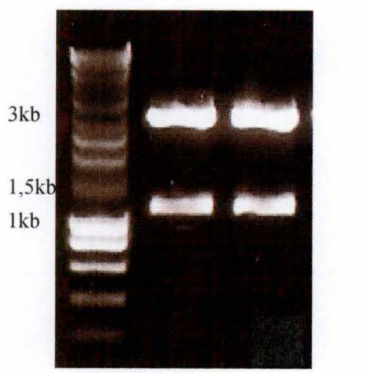


Figure 54. Electrophorèse en gel d'agarose montrant le résultat des restrictions diagnostiques du pGEM-Teasy Δ_{long} Tlp de deux candidats (1 et 2) avec l'enzyme NotI. Le profil attendu est obtenu. On retrouve d'une part une bande à 3kb correspondant à la matrice du vecteur linéarisé pGEM-T Easy et d'autre part, une bande à 1,2kb correspondant à notre insert Δ_{long} Tlp.

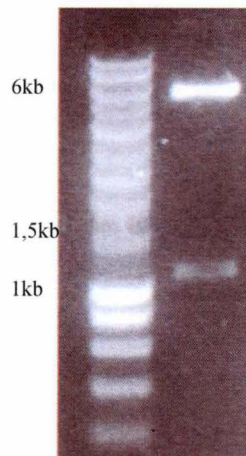


Figure 55. Electrophorèse en gel d'agarose montrant le résultat de la restriction diagnostique du pJQ200 Δ_{long} Tlp de deux candidats (1 et 2) avec l'enzyme NotI. Le profil attendu est observé. On retrouve d'une part, une bande à 6kb correspondant à la matrice du vecteur pJQ200 linéarisé et d'autre part, une bande à 1,2kb correspondant à notre insert Δ_{long} Tlp.

1.3. Délétion de l'ORF *longTlp*.

L'insert $\Delta_{longTlp}$ a été extrait du pGEM-T Easy par une restriction *NotI*¹¹ et cloné dans le pJQ200-*genta* linéarisé par la même enzyme. Une souche d'*E.coli* DH10B CaCl₂ compétente a été transformée par le produit de ligation, puis étalée sur un milieu sélectif (LBagar-gentamycine) contenant de l'IPTG et de l'X-gal pour un test blanc/bleu. On a procédé à l'extraction de l'ADN plasmidique de colonies blanches et une restriction diagnostique a permis de vérifier la présence de l'insert (Fig. 55)

Une souche S17 CaCl₂ compétente d'*E.coli* a ensuite été transformée par le vecteur pJQ200-*genta*- $\Delta_{longTlp}$ construit. Celui-ci est transféré par conjugaison chez *B.melitensis* 16M. Les clones ayant ainsi intégré le vecteur par simple recombinaison au niveau de la région amont ou aval de la séquence codant *longTlp*, ont été sélectionnés sur 2YTagar en présence d'acide nalidixique et de gentamycine. Ces clones *Nal*^R et *Genta*^R, sont des *intégrants*, ils ont une copie sauvage du gène *longTlp* et une copie délétée $\Delta_{longTlp}$ de celui-ci (Fig.50b et c). Ceux-ci sont alors mis en culture liquide 2YT sans pression de sélection. La culture est diluée deux fois pour permettre aux générations de se succéder et ce, afin de disposer de quelques clones ayant subi un deuxième événement de recombinaison (Fig.50a). En étalant un petit volume de la culture diluée sur un milieu 2YT sucrose 5%, on sélectionne ces derniers. En effet, les clones qui se développent sur ce milieu ont perdu SacB, gène toxique en présence de sucrose, ainsi que la copie sauvage du gène *longTlp*. Pour différencier les candidats *délétants*, des souches intégrantes mutées dans le gène SacB, on les repique sur 2YT*genta* puis 2YT. Les intégrants sont *Genta*^R alors que les candidats délétants sont *Genta*^S.

Même si cela reste peu probable, des intégrants peuvent être mutés simultanément au niveau du gène SacB et du gène de résistance à la gentamycine. Aussi, afin de s'assurer du génotype de clones après sélection une PCR diagnostique a été réalisée sur l'ADN génomique de quelques candidats. Parmi ceux-ci, trois clones ont le profil PCR d'un délétant (Fig. 56).

Les souches de *B. melitensis* 16M $\Delta_{longTlp}$ poussent normalement sur 2YT-Nal, le gène n'est pas essentiel et elles présentent un phénotype normal sur boîte ainsi qu'au microscope.

2. Tester la virulence du mutant $\Delta_{longTlp}$ lors d'une infection de macrophages.

Afin de déterminer si la protéine Tlp est requise lors de l'infection, la souche $\Delta_{longTlp}$ de *B. melitensis* 16M a été utilisée pour infecter des macrophages. Les bactéries ont été déposées sur une monocouche de macrophages bovins SV40 avec une MOI (ou dose infectante) de 300 bactéries par cellule eucaryote. Des dilutions de la dose infectante ont été étalées sur 2YTagar et les colonies comptées, après incubation, afin de contrôler celle-ci.

La phase d'invasion a duré 1 heure, elle a été suivie d'un traitement à la gentamycine destiné à tuer les bactéries extracellulaires. Après 1 heure et 48 heures d'incubation, les macrophages ont été lysés. Les CFU intracellulaires ont été dénombrées par étalement de dilutions du lysat sur 2YTagar.

Le point 1heure est destiné à estimer la capacité d'invasion du mutant par rapport à la souche sauvage, il a été réalisé une fois en triplicat pour les souches sauvages et $\Delta_{longTlp}$ (résultat non montré). Le point 48heures, permettant d'évaluer la capacité à établir une niche de réplication, à y survivre et s'y multiplier, a été réalisé deux fois en triplicat pour les souches sauvages et $\Delta_{longTlp}$ (Fig. 57).

Les résultats indiquent, d'une part, que la capacité d'invasion de la souche $\Delta_{longTlp}$ n'est pas altérée en comparaison de la souche sauvage et, d'autre part, que sa capacité à atteindre et à se répliquer au sein de la cellule hôte n'est pas affectée. L'infection de macrophages par la souche Δ_{vjBr} de *B. melitensis* 16M caractérisée par son incapacité à éviter

¹¹ L'utilisation simultanée de l'enzyme de restriction *ScaI* qui clive le pGEM-T Easy favorise l'événement d'intégration de l'insert dans le plasmide de destination plutôt que son retour dans le plasmide d'origine.

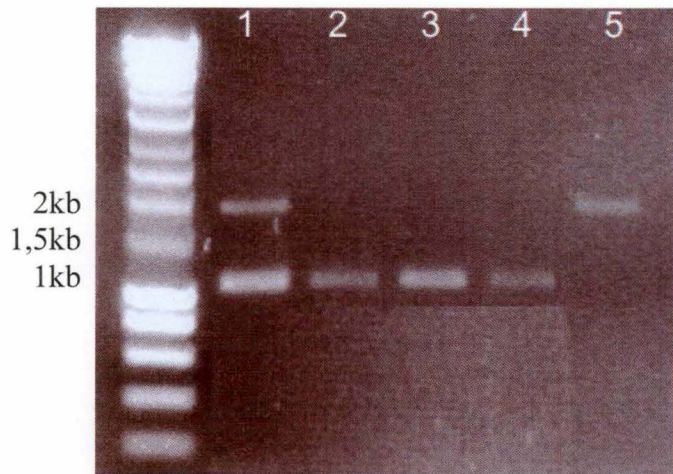
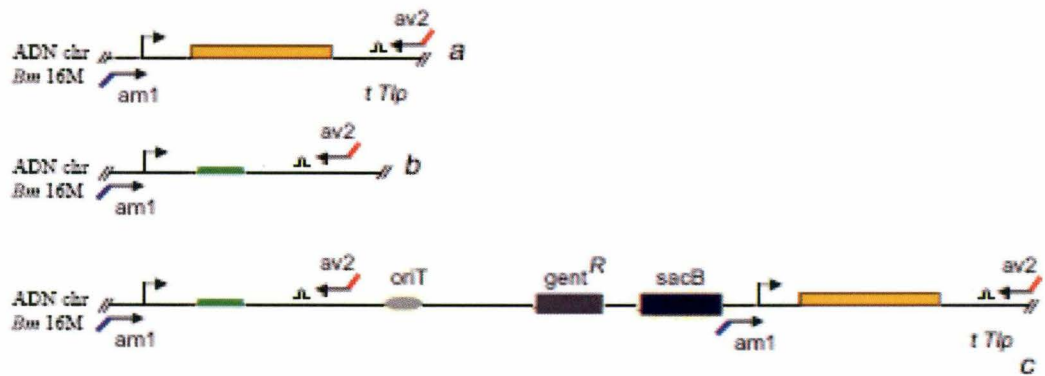


Figure 56. Electrophorèse en gel d'agarose présentant les résultats de la PCR diagnostique réalisée sur l'ADN génomique de clones de *B. melitensis* 16M candidats délétants ΔTlp , d'un clone intégrant et de la souche sauvage. Les amorces Am1 et Av2 amplifient le gène *longTlp* de la souche sauvage (5, a) (1,8kb). L'intégrant (1, c) possède l'allèle sauvage du gène *longTlp* (1,8kb) et l'allèle $\Delta_{longTlp}$ (1kb), les délétants (2, 3, 4 et b) possèdent uniquement l'allèle $\Delta_{longTlp}$ (1kb).



la fusion phagolysosomale est utilisée comme contrôle, elle montre le phénotype en CFU d'une souche dont la virulence est atténuée *ex-vivo*.

L'absence de phénotype en terme de CFU indique que l'expression de la protéine Tlp par *B. melitensis* n'est pas essentielle au bon déroulement de l'infection de macrophages. Ainsi, l'invasion d'une cellule hôte, l'atteinte de la niche de réplication et la capacité de survie et de multiplication au sein de celle-ci ne dépendent pas de l'expression de la Tlp.

3. Tester la virulence du mutant $\Delta_{long}Tlp$ lors de l'infection de souris.

Toujours en vue de définir le rôle de la protéine Tlp dans la virulence de la bactérie, des groupes de souris C56/Black6j ont été infectés par la souche mutante $\Delta_{long}Tlp$ de *B. melitensis* 16M (cfr. Matériel et méthodes). Les souris contrôles ont été infectées par la souche sauvage. Chaque souris a reçu une dose de 4.10^4 CFU bactériens dilués dans du RPMI par injection intrapéritonéale. La dose infectante a été contrôlée par étalement de dilutions sur 2YTagar et comptage des colonies.

La rate des souris a été prélevée après cinq jours. Elle a ensuite été broyée et ses cellules lysées. Les CFU de *B. melitensis* 16M ont ensuite été évalués par le comptage de dilutions étalées et cultivées à 37°C sur 2YTagar.

L'analyse cinq jours post-infection montre une diminution d'un logarithme du nombre de CFU récupérées par rate pour la souche $\Delta_{long}Tlp$ par rapport à la souche sauvage (Fig. 58). Ce résultat reflète l'importance de Tlp dans la survie et la réplication de *B. melitensis* 16M dans un contexte immunitaire, c'est-à-dire lors de l'infection de l'organisme hôte.

Le phénotype mis en évidence doit cependant encore être confirmé. Cela passera par l'infection de souris par la souche $\Delta_{long}Tlp$ de *B. melitensis* 16M complétée grâce à l'expression en trans de l'allèle sauvage porté par un plasmide répliatif à faible nombre de copies chez *Brucella*.

E. La TIR-like protein, une protéine immunomodulatrice ?

Après avoir mis en évidence que la Tlp est une protéine exprimée et sécrétée par *B. melitensis* et qu'elle favorise, d'une manière ou d'une autre, la réplication de la bactérie *in vivo*, nous avons tenté de déterminer les mécanismes par lesquels elle contribue à sa virulence.

La mise en évidence de la sécrétion probable de la Tlp ne constitue pas une preuve de sa translocation dans le cytoplasme de la cellule hôte (elle pourrait en effet rester localisée dans la vacuole). Cependant, la possession d'un domaine TIR nous permet de poser l'hypothèse plausible qu'elle atteint celui-ci.

Sur base de ce postulat, nous avons recherché des partenaires protéiques eucaryotes susceptibles d'interagir en double hybride avec la Tlp. Et, d'autre part, nous avons mis au point des outils qui permettront de tester la capacité de cette protéine à interférer avec la voie d'activation de NF- κ B TIR-dépendante. Ces résultats devraient nous permettre d'établir un modèle d'action de la Tlp au sein de la cellule hôte. A priori, on suppose qu'elle peut interférer, via son domaine TIR, avec les voies de signalisation TIR dépendante initiée par les TLRs ou les récepteurs de la famille IL-1R.

1. Recherche en double-hybride de partenaires eucaryotes interagissant avec la Tlp.

Afin d'éclaircir le rôle de la protéine Tlp au sein de la cellule infectée par *B. melitensis* 16M, on a tenté de mettre en évidence son interaction physique avec des partenaires protéiques eucaryotes. On a utilisé, pour ce faire, le test double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

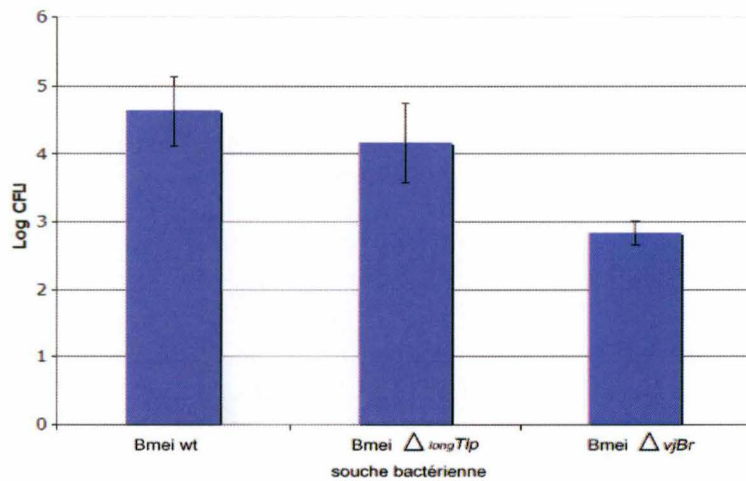


Figure 57. Résultat de l'infection de macrophages bovins SV40 par différentes souches de *B. melitensis* 16M (Bmei). Le graphique présente en ordonnée le logarithme des CFUs intracellulaires après 48heures d'incubation des macrophages, et en abscisse les différentes souches utilisées : la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (Bmei wt), la souche délétée pour *longTlp* ($\Delta_{longTlp}$) et la souche délétée pour *VjBr* (Δ_{VjBr}). La souche Bmei Δ_{VjBr} qui présente une atténuation connue de 2 logarithmes est utilisée comme contrôle d'atténuation. Aucune atténuation significative n'est observée pour la souche Bmei $\Delta_{longTlp}$ en comparaison à la souche Bmei wt. Les barres d'erreurs représentent deux écarts types, le test a été réalisé sur quatre triplicats indépendants par souche.

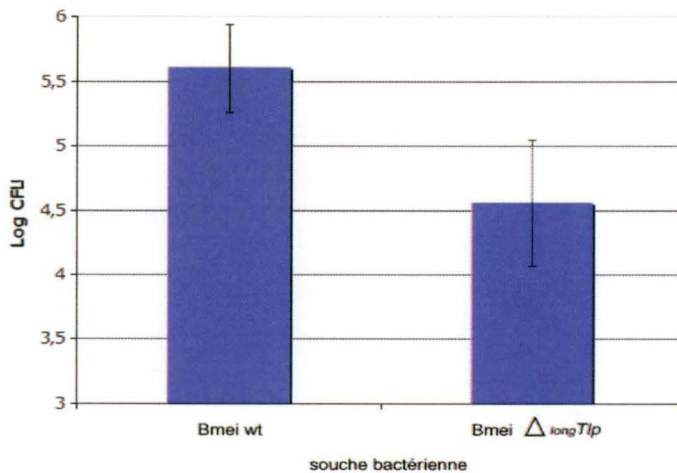


Figure 58. Résultat de l'infection de souris C57/Black6j par les souches sauvage et $\Delta_{longTlp}$ de *B. melitensis* 16M (Bmei). Le graphique présente en ordonnée le logarithme des CFUs bactériens récupérés dans la rate 5 jours post-infection, et en abscisse les deux souches utilisées : la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (Bmei wt), la souche délétée pour *longTlp* ($\Delta_{longTlp}$). Une atténuation significative d'un logarithme des CFUs est observée en comparaison à la souche Bmei wt. Les barres d'erreurs représentent deux écarts types, le test a été réalisé sur deux groupes de cinq souris.

Nous commencerons par un bref descriptif du principe et des étapes de la technique avant de présenter les résultats obtenus.

1.1. Principe du test d'interaction en double-hybride.

Le système double-hybride utilise la mise en évidence de l'expression d'un gène rapporteur comme révélatrice d'une interaction entre deux protéines. Cette méthode fait appel à des transactivateurs tels Gal4, transactivateur de l'ORF *Gall* codant la β -galactosidase. Un transactivateur est un facteur trans capable de moduler la transcription d'un gène en se liant à un élément cis de l'ADN appelé UAS (Upstream Activating Sequence) situé en amont du promoteur de ce gène. Il est constitué d'un domaine d'activation ou AD (Activating Domain) qui recrute la machinerie de transcription et d'un domaine de liaison à l'ADN ou BD (Binding Domain). La séparation physique de ces deux domaines entraîne la perte de fonction du transactivateur dans la mesure où ni le domaine AD n'est capable de lier l'ADN, ni le domaine BD ne peut activer seul la transcription (Fields & Song, 1989) (Walhout & Vidal, 2001).

En liant par génie génétique chacun de ces domaines individuellement à des protéines X et Y, on peut reconstituer un facteur de transcription fonctionnel si ces dernières interagissent ensemble. L'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle d'un promoteur liant le transactivateur reconstitué signalera l'interaction des deux protéines (Fig. 59).

1.2. Réalisation d'un crible double-hybride : la protéine *long*Tlp utilisée comme appât contre une banque de cDNA de leucocytes humains.

En vue d'identifier des protéines de l'hôte qui interagissent avec la protéine Tlp de *B. melitensis*, un crible double hybride en levure a été réalisé en testant cette dernière comme appât vis-à-vis d'une librairie de proies établie à partir d'une banque de cDNA de leucocytes humains (BD Biosciences Clontech, Human Leukocyte Matchmaker cDNA Library).

a) Co-transformation de levures.

Pour ce faire, des levures ont été transformées avec le plasmide contenant *long*Tlp en fusion avec BD, puis co-transformées avec la banque de cDNA de leucocytes humains fusionnés avec AD. Elles ont ensuite été étalées sur un milieu complet dépourvu de tryptophane (pour la sélection de la présence du plasmide contenant BD), de leucine (pour la sélection de la présence du plasmide contenant AD), d'histidine (pour la sélection d'une interaction. cfr. ci-dessous). Seules les levures transformées par les deux plasmides (plus précisément, par le premier plasmide et au moins un plasmide portant une fusion *protéine humaine-BD*) et au sein desquels le transactivateur Gal4 a été reconstitué par l'interaction physique entre *long*Tlp et une protéine humaine, se développent sur ce milieu sélectif. Par ailleurs, les levures ont été étalées sur un milieu déplété en tryptophane et en leucine pour estimer l'efficacité de co-transformation.

b) Mise en évidence des interactions.

L'activation de la transcription du gène rapporteur *HIS3* sous le contrôle du promoteur Gal4p a été utilisée pour mettre en évidence l'interaction physique de *long*Tlp avec des protéines humaines, qui reconstitue un transactivateur Gal4 fonctionnel.

HIS3 code l'enzyme imidazole-glycérol-phosphate déshydratase nécessaire à la biosynthèse de l'histidine. Cultiver les levures auxotrophes pour l'histidine sur un milieu sans histidine permet donc de sélectionner celles qui possèdent le transactivateur Gal4 reconstitué. Le 3AT (1,2,4-triaminotriazole), inhibiteur compétitif de l'enzyme, est ajouté au milieu pour éviter l'observation de la transcription basale du gène rapporteur.

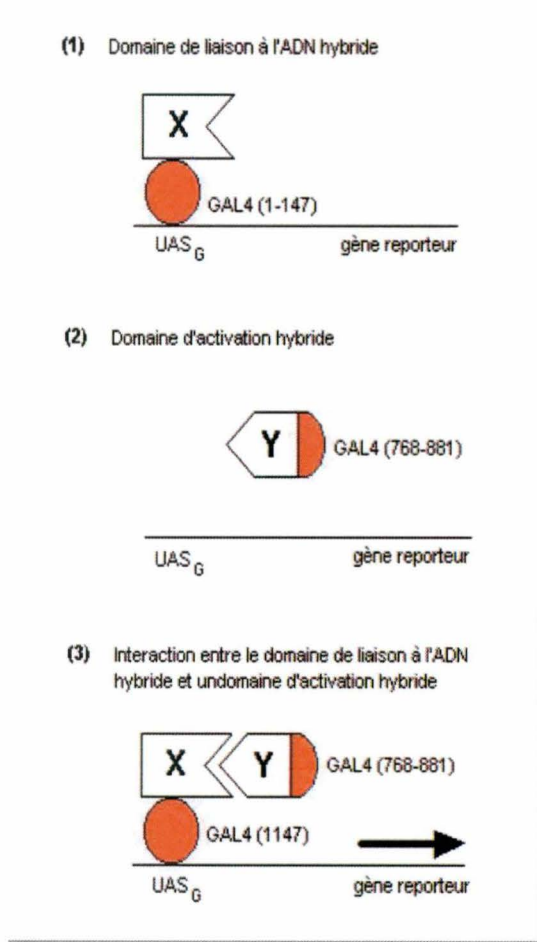


Figure 59. Principe de détection d'interactions physique entre protéines par le système double hybride.

Un premier plasmide code une protéine hybride, fusion de la protéine X au domaine de liaison à l'ADN du transactivateur GAL4 (1). Un second plasmide code la protéine de fusion entre Y et le domaine activateur de transcription de GAL4 (2). Une souche de levure est transformée par ces deux plasmides.

Si les protéines X et Y interagissent physiquement, un transactivateur GAL4 fonctionnel est reconstitué (3). Le gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur contenant un site de liaison à GAL4 est exprimé.

La protéine X associée au domaine de liaison à l'ADN est appelée "appât", la protéine Y associée au domaine activateur de la transcription étant la "proie".

(d'après http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/interact_adn/facteur_trscrpt/gal4/introGal4.htm)

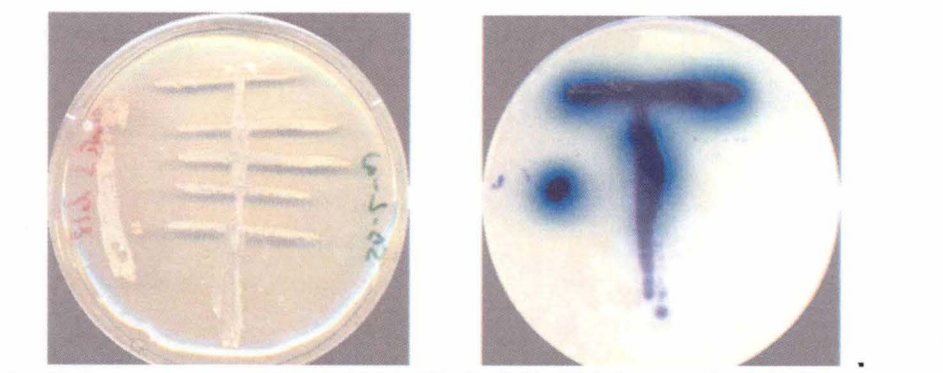


Figure 60. Résultat du crible double-hybride. Mise en évidence de l'expression de deux gènes rapporteurs, en (a) *HIS3* et en (b) *LacZ*, révélant l'interaction de $_{long}$ Tlp avec la protéine eucaryote RanBP9 qui reconstitue le transactivateur Gal4.

L'expression du gène rapporteur *LacZ* est utilisée afin de confirmer les interactions potentiellement mises en évidence. Celui-ci code la β -galactosidase, enzyme de dégradation du lactose, qui peut cliver le X-gal, libérant ainsi un chromophore bleu. Lorsque, suite à la reconstitution de Gal4, *LacZ* est exprimé par les levures, les colonies sont bleues sur un milieu contenant du X-gal.

Une colonie est considérée comme positive si elle pousse sur un milieu dépourvu en histidine supplémenté en 3AT et si elle est positive en test d'activité de la β -galactosidase. Seul un clone s'est révélé positif (Fig. 60).

c) Identification d'un interactant.

L'extraction des plasmides du clone positif a été suivie d'une PCR utilisant une paire d'amorces encadrant l'insert pour amplifier la séquence codant l'interactant de *longTlp*. Le séquençage¹² a permis de l'identifier, il s'agit de la *Ran Binding Protein 9* humaine (RanBP9 ou RBPM). Cette protéine a été décrite comme interagissant avec la GTPase ran, principalement impliquée dans le transport nucléocytoplasmique de protéines (Weis *et al.*, 2003). Ce résultat sera discuté plus loin.

2. Etude de la capacité d'interférence de la Tlp avec l'activation TIR-dépendante de NF- κ B.

La protéine Tlp de *B. melitensis* 16M a été identifiée sur base de son homologie avec le domaine TIR des protéines eucaryotes impliquées dans des voies de signalisation de l'immunité innée. C'est pourquoi il est intéressant de tester l'effet de celle-ci sur l'activation, par la voie TIR-dépendante, du facteur de transcription NF- κ B dans des cellules mammaliennes.

Pour ce faire, des cellules mammaliennes sont transfectées par un vecteur portant l'ORF *longTlp* (ou *shortTlp*) sous le contrôle d'un promoteur d'expression eucaryote. On observe alors l'effet de l'expression de la protéine Tlp sur l'activation de NF- κ B.

2.1. Construction de plasmides d'expression eucaryotes portant l'ORF Tlp.

On a entrepris de cloner les ORFs *longTlp* et *shortTlp* par GatewayTM dans divers vecteurs d'expression eucaryotes. Ceux-ci permettent de fusionner l'ORF d'intérêt à un tag carboxy- ou amino-terminal et de placer la séquence codant la protéine de fusion sous le contrôle du promoteur CMV.

Le promoteur CMV (Cytomégalovirus) assure l'expression de l'ORF clonée après transfection de cellules mammaliennes avec le vecteur tandis que le tag fusionné à la protéine d'intérêt permet d'estimer l'efficacité de transfection.

Une série de réactions LR, résumée ci-dessous, a été réalisée.

Plasmide d'entrée	Plasmide de destination	Produit de réaction LR
pDONR201-BME11674	pDest-472 (CMV, C- eGFP, amp)	pDest-472-CMV- <i>shortTlp</i> -eGFP-amp
pDONR201- <i>longTlp</i>	pDest-472 (CMV, C- eGFP, amp)	pDest-472-CMV- <i>longTlp</i> -eGFP-amp
pDONR201-BME11674	pDest-474 (CMV, C- myc, amp)	pDest-474-CMV- <i>shortTlp</i> -myc-amp
pDONR201- <i>longTlp</i>	pDest-474 (CMV, C- myc, amp)	pDest-474-CMV- <i>longTlp</i> -myc-amp
pDONR201-BME11674	pDest-490 (CMV, C- FLAG, amp)	pDest-490-CMV- <i>shortTlp</i> -FLAG-amp
pDONR201- <i>longTlp</i>	pDest-490 (CMV, C- FLAG, amp)	pDest-490-CMV- <i>longTlp</i> -FLAG-amp
pDONR201-BME11674	pDest-CMV4 (CMV, N- FLAG, amp)	pDEST-CMV4-CMV-FLAG- <i>shortTlp</i> -amp
pDONR201- <i>longTlp</i>	pDest-CMV4(CMV, N- FLAG, amp)	pDEST-CMV4-CMV-FLAG- <i>longTlp</i> -amp

Tableau 9. Plasmides d'entrée et de destination utilisés en vue de la construction de vecteurs d'expression eucaryotes codant une protéine de fusion Tlp-tag.

¹² L'analyse a révélé que la séquence du partenaire protéique d'interaction issu de la banque de cDNA était bien en phase avec la séquence codant l'Activating Domain.

Les produits de réaction LR ont été transformés individuellement dans la souche DH10B d'*E. coli* cultivées ensuite sur milieu sélectif (LBagar-ampicilline) et une minipréparation d'ADN plasmidique a permis de les récupérer. Celle-ci a été réalisée en condition stérile en vue d'une transfection de cellules mammaliennes. Etant donné que la carte des plasmides de destination n'était pas à notre disposition, une restriction ainsi qu'une PCR diagnostiques ont été réalisées afin de valider les constructions (résultat non montré).

2.2. Principe du test.

La stimulation à l'interleukine-1 (IL-1) de cellules eucaryotes portant des récepteurs IL-1R à leur surface déclenche une voie de signalisation MyD88-dépendante en tout point semblable à celle déclenchée par la plupart des *TLRs* (Fig.27). Le point culminant de cette voie est la délocalisation de NF- κ B du cytoplasme vers le noyau où il induit l'expression de médiateurs pro inflammatoires. Celle-ci peut être suivie en marquant par fluorescence le facteur de transcription et l'ADN (donc le noyau) et en mettant ainsi en évidence leur colocalisation dans les cellules stimulées.

On a cherché à montrer de cette manière l'effet de la Tlp sur l'activation de NF- κ B dans des cellules mammaliennes transfectées pour exprimer cette protéine procaryote, et stimulées à l'IL-1.

Les vecteurs pDest-472-CMV-*shortTlp-eGFP-amp* et pDest-472-CMV-*longTlp-eGFP-amp* ont été sélectionnés pour transfecter des cellules Hela. Le tag rapporteur eGFP permet d'évaluer rapidement l'efficacité de transfection. Le choix des cellules Hela résulte d'un compromis entre des cellules qui transfectent plus ou moins bien et qui possèdent des récepteurs à l'IL-1.

2.3. Transfection de cellules Hela.

On a divisé la population de cellules Hela à disposition en sous-groupes de la façon suivante :

- Cellules non transfectées.
- Cellules transfectées par le pDest-472-CMV-eGFP-amp.
- Cellules transfectées par le pDest-472-CMV-*shortTlp-eGFP-amp*.
- Cellules transfectées par le pDest-472-CMV-*longTlp-eGFP-amp*.

Les différents plasmides utilisés ont été mélangés, en absence de sérum qui contient des agents opsonisants, au superfect, dendrimère de structure branchée qui protège l'ADN, neutralise sa charge et assure sa compaction pour faciliter son internalisation dans les cellules eucaryotes. Les cellules ont été mises en présence de l'ADN complexé à l'agent de transfection durant 3heures.

Une partie des cellules de chaque groupe a été traitée à l'IL-1. L'addition dans le milieu d'IL-1 mime une réponse classique d'une cellule eucaryote à la présence d'un pathogène. D'une part, parce que cette voie de signalisation est en tout point identique à la voie *MyD88* dépendante initiée par la plupart des *TLRs* après détection d'un pathogène. D'autre part parce que l'IL-1 est une cytokine pro inflammatoire sécrétée au cours de la réponse immune.

Après fixation et perméabilisation, les cellules de plusieurs groupes ont été incubées en présence d'un anticorps anti-p65 marquant cette sous-unité de NF- κ B. Un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568nm permet de suivre le facteur de transcription en fluorescence.

Les noyaux de chaque type de cellules ont ensuite été marqués au Topro, un agent intercalant et les lamelles ont été montées sur des lames avant d'être observées en microscopie confocale.

Cellules non stimulées

Cellules stimulées par l'IL-1

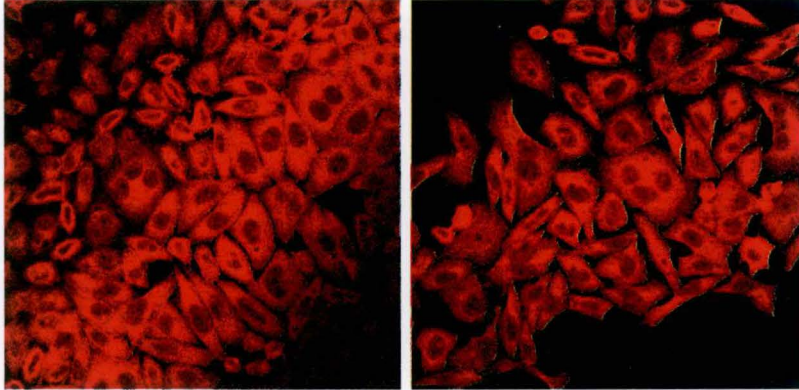


Figure 61. Observation en microscopie confocale du comportement de la sous-unité p65 de NF- κ B dans des cellules Hela non transfectées. A gauche, marquage de p65 dans des cellules non stimulées par l'IL-1. A droite, marquage de p65 dans des cellules stimulées par l'IL-1. Dans les deux cas, NF- κ B est localisé dans le cytosol des cellules. La translocation de NF- κ B dans le noyau attendue pour les cellules stimulées n'est pas observée

2.4. Observation des cellules en microscopie confocale.

Les groupes de cellules et les différents traitements subis sont résumés respectivement en tête de lignes et de colonnes du tableau 10. Les résultats de l'observation des différents groupes de cellules en microscopie confocale sont également présentés dans celui-ci.

	1	2	3	4
A		+Topro	-IL-1,+Topro, +Ac I, +AcII	+ IL-1,+Topro, +Ac I, +AcII
B	Cellules non transfectées	N	N, NF-κB (c)	N, NF-κB (c)
C	pDest-472-CMV-eGFP-amp	N	N, NF-κB (c)	N, NF-κB (c)
D	pDest-472-CMV-<i>shortTlp</i>-eGFP-amp	N, <i>shortTlp</i> -eGFP (c)	N, NF-κB (c), <i>shortTlp</i> -eGFP (c)	N, NF-κB (c), <i>shortTlp</i> -eGFP (c)
E	pDest-472-CMV-<i>longTlp</i>-eGFP-amp	N, <i>longTlp</i> -eGFP (c)	N, NF-κB (c), <i>longTlp</i> -eGFP (c)	N, NF-κB (c), <i>longTlp</i> -eGFP (c)

Tableau 10. Résumé des résultats obtenus pour le test visant à observer en microscopie confocale l'effet de l'expression de la Tlp de *B. melitensis* par une cellule mammalienne sur l'activation de la voie NF-κB TIR-dépendante. Chaque case représente un groupe de cellules transfectées par le plasmide repris en tête de ligne et ayant subi les traitements décrits en tête de colonne. Les résultats de l'observation de chacun de ces groupes de cellules en microscopie confocale est résumé dans chaque case. N, observation du noyau en bleu ; *shortTlp*-eGFP, observation d'un signal (vert) de la eGFP indiquant l'expression de la protéine Tlp procaryote ; *longTlp*-eGFP, observation d'un signal (vert) de la eGFP indiquant l'expression de la protéine Tlp procaryote ; NF-κB, observation d'un signal en rouge indiquant la présence du facteur de transcription. La lettre entre parenthèses symbolise le lieu d'observation ; (c), cytosol.

La présence d'un signal de la eGFP dans les cellules transfectées par les vecteurs pDest-472-CMV-*shortTlp*-eGFP-amp (case D2 du Tableau 10) et pDest-472-CMV-*longTlp*-eGFP-amp (E2) permet tout d'abord de valider les plasmides construits. D'autre part, le signal recueilli montre que les vecteurs ont été internalisés et que l'ORF des protéines de fusion qu'ils portent est exprimée. De plus, il révèle que la protéine Tlp n'est pas localisée dans le noyau de la cellule (résultat non montré).

Le marquage du facteur de transcription NF-κB permet de détecter sa présence majoritaire dans le cytosol des cellules non stimulées (colonne3).

Cependant, aucune indication sur la capacité suspectée de Tlp à interférer avec la voie TIR dépendante d'activation NF-κB n'a pu être tirée de cette expérience car la stimulation des cellules à l'IL-1 semble ne pas avoir fonctionné. On s'attend en effet à ce que le facteur de transcription soit transloqué vers le noyau des cellules non transfectées, ce qui n'est pas le cas (B4) (Fig. 61).

*DISCUSSION
& PERSPECTIVES*

Discussion et Perspectives

La capacité du système immunitaire d'un organisme à limiter efficacement la réplication et la dissémination de pathogènes en son sein, repose entièrement sur le système de surveillance de l'immunité innée. La réponse de l'hôte à l'infection est toujours initiée par la détection de l'agent infectieux via les récepteurs de l'immunité innée.

Parmi ceux-ci, les TLRs agissent en première ligne en reconnaissant des signatures moléculaires caractéristiques de pathogènes très divers. Ils déclenchent ensuite des voies de signalisation impliquant leur domaine TIR intracellulaire. En assurant la génération de médiateurs inflammatoires, ces voies contribuent à alerter le système de défense qui mobilise et active les mécanismes effecteurs innés et adaptatifs adéquats.

L'évolution conjointe des bactéries pathogènes avec leur hôte respectif les a dotées de stratégies variées destinées à éviter la réponse immunitaire de celui-ci. Elles peuvent échapper à la reconnaissance par les TLRs, en masquant leurs *PAMPs*, en les modifiant ou en disposant de *PAMPs* non stimulateurs. En injectant dans les cellules de l'hôte des facteurs de virulence, elles peuvent également paralyser la réponse déclenchée suite à leur reconnaissance. Les acteurs moléculaires impliqués dans le dynamisme du cytosquelette, le trafic vacuolaire ou diverses voies de signalisation, pro inflammatoires ou apoptotiques constituent des cibles de choix. Tout en assurant leur persistance, les bactéries pathogènes exploitent à leur profit les nutriments et divers processus cellulaires afin de promouvoir leur réplication et leur dissémination.

Brucella, une bactérie gram-négative pathogène intracellulaire des cellules phagocytaires de l'hôte, semble disposer de ces deux types de stratégies d'évasion. D'une part le lipide A atypique de son LPS n'induit pas l'expression de TNF- α (Lapaque, 2006). D'autre part, son système de sécrétion de type IV, essentiel au bon déroulement du processus infectieux, lui permettrait de transloquer des effecteurs (encore à identifier) au sein de la cellule hôte (Delrue et al., 2001) (Delrue et al., 2005).

L'ORF *Tlp* mise en évidence dans le génome de *B. melitensis* 16M, code un facteur de virulence potentiel, la *TIR-like protein*. En effet, *B. melitensis* 16M, en sécrétant cette mimique dans le cytoplasme de la cellule hôte, pourrait perturber le déroulement des voies de signalisation TIR dépendante initiées suite à sa reconnaissance.

A. Analyse génomique.

L'analyse du locus génomique de *Tlp* est intéressante à double titre. Elle met en évidence d'une part, qu'il existe cinq ORFs *Tlp* potentielles (Résultats Fig. 4) et, d'autre part, qu'elles sont situées au sein d'un cluster d'ORFs hypothétiques.

1. Définir l'ORF *Tlp*.

Parmi les cinq ORFs, trois coderaient des versions longues de la protéine *Tlp* qui présentent un domaine TIR C-terminal et un domaine coiled-coil N-terminal, deux coderaient des versions courtes présentant uniquement un domaine TIR.

De façon intéressante, les western blots réalisés sur des extraits protéiques de *B. melitensis* 16M codant une protéine de fusion ${}_{\text{long}}\text{Tlp-tag}^{13}$ sous le contrôle d'un promoteur constitutif pLac, montrent systématiquement au moins deux bandes (Résultats Fig.6, 12 et 15a). L'une correspond à l'expression d'une version longue de *Tlp*, l'autre pourrait correspondre à l'expression d'une version courte.

¹³ Tag : GST ou 13Myc.

Cette observation laisserait entrevoir la capacité potentielle du ribosome à initier la traduction à partir de deux RBS du messenger issu de *longTlp*. Le manque de précision du western blot ne nous permet cependant pas de définir les ORFs dont seraient issues ces deux protéines.

Bien qu'il soit excitant de penser que ces deux bandes correspondent à des versions distinctes de la Tlp, issues d'ORFs différentes, elles peuvent toutefois simplement refléter la protéolyse d'une version longue de la protéine Tlp à un site préférentiel de celle-ci.

Délimiter l'ORF *Tlp* réelle sur le génome de *B. melitensis* 16M reste une question importante. Et ce, car il est probable que la présence du domaine coiled-coil confère aux versions longues de la protéine des propriétés différentes des versions courtes, notamment en terme d'interactions avec les protéines de la cellule hôte. On peut également imaginer qu'une séquence N-terminale supplémentaire héberge des séquences signal de fonctions diverses, par exemple de sécrétion.

Un argument évolutif joue en faveur des ORFs codant une version longue de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M. En effet, la conservation du domaine coiled-coil est observée chez les protéines homologues TlpA (*TIR-like protein A*) de deux bactéries pathogènes phylogénétiquement distantes de *Brucella*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis et *Staphylococcus aureus* (Newman *et al.*, 2006).

Bien que l'on puisse tenter de définir avec précision l'ORF ou les ORFs réellement traduites en réalisant une étude comparée de l'expression des cinq ORFs en western blot ou en réalisant un séquençage N-terminal après purification des protéines séparées, la question biologique fondamentale reste néanmoins d'en déterminer les fonctions.

2. L'ORF *Tlp* dans un contexte particulier.

Indépendamment de sa taille, la présence de l'ORF *Tlp* au sein d'un groupe d'ORFs hypothétiques fait penser qu'il pourrait s'agir d'un cluster de gènes de fonctions communes, probablement des effecteurs potentiels. Celles-ci mériteraient d'être caractérisées. Sur base de cette observation, on peut émettre l'hypothèse que ce groupe d'ORFs aurait été acquis par *B. melitensis* 16M par transfert horizontal d'ADN. Une analyse approfondie des régions avoisinant l'ORF *Tlp*, du point de vue de leur contenu en GC ou de la présence de traces d'éléments génétiques mobiles permettrait de tester cette hypothèse.

B. La protéine Tlp est exprimée. Son expression est-elle régulée ?

Le test d'expression de la protéine Tlp par western blot a utilisé une souche portant l'ORF codant une protéine de fusion Tlp-tag¹⁴, sous le contrôle du promoteur authentique du gène *Tlp*. Il a permis de révéler la présence de Tlp au sein de *B. melitensis* 16M en phase stationnaire de croissance. La faible intensité du signal malgré un temps d'exposition prolongé met en évidence une protéine peu abondante dans ces conditions. Le niveau d'expression de la protéine et la différence probable d'affinité (et donc de sensibilité) des anticorps utilisés pourraient expliquer sa détection par l'un (anti-GFP) et pas par l'autre (anti-GST). De la même manière que le résultat des western blots réalisés sur des souches exprimant longTlp sous le contrôle du promoteur pLac, on retrouve deux bandes, correspondant à la taille d'une version longue et d'une version courte. On note que cette dernière est plus intense. Ici encore, on peut émettre deux hypothèses, soit la version courte observée sur ce western est l'ORF réellement traduite, soit cette bande reflète un produit de protéolyse plus stable dans la cellule.

On sait que *Brucella* a besoin de son système de sécrétion de type IV et effecteurs qu'il transloque uniquement lors du processus infectieux. Ceux-ci contribuent à établir la

¹⁴ Tag : GST ou eGFP.

niche de réplication au sein de la cellule hôte. Aussi, il a été montré que la transcription de l'opéron *virB* est induite en condition d'infection, et que l'acidification du phagosome contenant la bactérie serait le signal clé de cette induction. De la même manière, il est probable que l'expression des effecteurs sécrétés, et donc de la Tlp soit étroitement régulée.

1. Régulation de l'expression in vitro.

Bien que la logique voudrait que *Brucella* n'induisse l'expression de ses facteurs de virulence qu'en condition d'infection, on a montré que l'expression des gènes de l'opéron *virB*, est induite in vitro, avec un pic d'expression au cours en fin de phase exponentielle. Il n'est donc pas étonnant de mettre en évidence l'expression du facteur de virulence potentiel Tlp in vitro au cours de la phase stationnaire.

Il serait par la suite, intéressant de tester l'expression de la protéine Tlp, ou l'activité du promoteur de *Tlp* dans les trois phases de croissance en culture, et de comparer les profils obtenus à ceux de l'opéron *virB*.

Si le profil d'expression de la Tlp ou le profil d'activité de son promoteur révèlent l'induction à une phase de croissance, on pourrait tenter de mettre en évidence les signaux impliqués. On testerait, par exemple l'effet de l'acidification du milieu de culture sur l'expression de la protéine, ou une éventuelle régulation de l'expression impliquant les homosérines lactones de *Brucella*, actrices du système de *quorum sensing* connues pour réguler l'opéron *virB* (Delrue et al., 2005).

2. Régulation de l'expression ex-vivo.

Sur base de ces considérations, on a émis l'hypothèse qu'un signal d'induction de l'expression de la protéine Tlp serait rencontré au cours du processus infectieux. Son expression a donc été testée ex-vivo, en condition d'infection de macrophages.

Le résultat de l'observation des macrophages en microscopie à fluorescence visant à détecter la protéine Tlp fusionnée au tag rapporteur eGFP n'a permis ni de confirmer, ni d'infirmer l'hypothèse. Le signal vert détecté (Résultats Fig. 13) n'est pas plus intense que celui observé pour la souche sauvage (résultat non montré), et il est localisé en membrane. Soit ce signal reflète la protéine Tlp, auquel cas le niveau d'expression est faible et la protéine localisée en membrane, soit il est émis par le fluorochrome utilisé pour mettre en évidence le LPS. Pour essayer de trancher, il serait intéressant de renouveler le test sans marquer le LPS, ou d'utiliser un autre tag rapporteur fluorescent.

L'expression du tag eGFP par *B. melitensis* 16M, validée par ailleurs, n'est pas remise en cause. On peut par contre évoquer une différence de sensibilité entre les deux techniques utilisées, le western blot et l'observation en microscopie à fluorescence. Cette différence est confirmée par l'absence de détection de signal fluorescent de la eGFP sur *agarose pad* dans les mêmes conditions de culture que celles qui ont permis de révéler la protéine en western blot.

Ainsi, si l'expression de la Tlp est induite lors de l'infection d'une cellule, le niveau d'expression 48 heures post-infection serait sous le seuil de sensibilité de détection en fluorescence.

Bien que l'on puisse tester l'expression de la protéine Tlp in vivo, il n'y aucune raison de penser qu'elle soit induite uniquement dans cette condition d'infection. Et ce car, la mise en présence de *B. melitensis* avec des macrophages, suffit à lui imposer la pression des récepteurs et de mécanismes effecteurs de l'immunité innée.

C. Confirmer la sécrétion de la protéine Tlp.

Pour interférer avec les voies de signalisation TIR-dépendante, la protéine Tlp doit se retrouver dans le cytosol de la cellule hôte. L'absence de séquence signal de sécrétion par un

T4SS qui soit universellement conservée ne permet pas, à priori, de prédire la translocation de Tlp par celui-ci.

Le western blot réalisé sur le surnageant de cultures de *B. melitensis* 16M exprimant la protéine *short*Tlp-13Myc¹⁵ ne met pas en évidence cette dernière. Par contre, par la même méthode, on révèle la présence de *long*Tlp-13Myc dans le surnageant de la culture de *B. melitensis* 16M exprimant celle-ci (Résultats Fig. 15b).

A ce jour, aucun effecteur transloqué par *Brucella* n'a été mis en évidence, on ne dispose dès lors d'aucun contrôle positif de sécrétion. Un contrôle permettant d'estimer la proportion de Tlp libérée dans le surnageant suite à la lyse d'une partie de la population bactérienne est nécessaire. Dans cette optique, on a testé la présence de la protéine cytosolique CtrA dans le surnageant. Le contrôle s'est révélé négatif. Il nous amène donc à penser que le signal détecté reflète la sécrétion de la protéine d'intérêt.

Deux critiques peuvent être émises à propos de ce contrôle. Tout d'abord, les niveaux d'expression des protéines CtrA et *long*Tlp-13Myc sont probablement différents au sein de la bactérie. La première est sous le contrôle de son promoteur natif, la seconde, sous le contrôle du promoteur pLac. Donc, en postulant que l'activité du pLac est plus importante que celle du pCtrA, la lyse des bactéries larguera dans le surnageant une plus grande quantité de *long*Tlp - 13Myc, dès lors susceptible d'être détectée sans révéler la présence de CtrA. Détecter la présence de cette dernière dans le culot bactérien nous apporterait un élément de réponse. Par ailleurs, la détection de ces protéines utilise deux anticorps présentant probablement des différences d'affinité et donc de sensibilité.

Ainsi, le signal détecté pour *long*Tlp-13Myc pourrait refléter la présence de cette protéine de fusion dans le surnageant de culture suite à la lyse bactérienne. Et l'absence de signal pour la protéine *short*Tlp-13Myc serait due à sa moindre abondance dans le cytosol de la bactérie.

Cependant, l'absence de la bande systématiquement détectée dans le cytosol à une taille inférieure à *long*Tlp-13Myc (qui pourrait correspondre à une version courte de la protéine Tlp ou à un produit de clivage protéolytique) sur le résultat du western blot réalisé sur le surnageant de culture, constitue un argument en faveur de la sécrétion de *long*Tlp. En effet, un temps d'exposition court lors de la révélation montre que l'abondance de cette protéine de petite taille dépourvue du domaine coiled-coil, dans le cytosol est de l'ordre de celle de *long*Tlp-13Myc. Si la détection de la protéine de grande taille résultait de la lyse bactérienne, on aurait une bonne raison de penser que la bande correspondant à la version courte serait aussi mise en évidence.

Ce résultat propose donc que *B. melitensis* 16M a la capacité de faire passer une version longue de la protéine Tlp dans son environnement sans que le tag 13Myc C-terminal ne gêne la translocation. La (ou les) version(s) courte(s) de Tlp, qui ne possède(nt) pas de domaine aminoterminal ne semble(nt), quant à elle(s), pas transloquée(s).

Cette observation est intéressante à double titre. D'une part, elle suggère que la présence du domaine N-terminal est nécessaire à la translocation de la protéine. Cette idée est renforcée par le fait que le tag 13Myc C-terminal ne gêne pas la sécrétion de *long*Tlp, alors qu'il a déjà été montré qu'un tag de petite taille fusionné à une séquence signal de sécrétion pouvait empêcher celle-ci (Simone *et al.*, 2001). La portion N-terminale porterait ainsi une séquence signal de sécrétion ou, le domaine coiled-coil qu'elle porte serait requis pour assurer celle-ci. D'autre part, si on a émis l'hypothèse qu'une version longue et une version courte de la Tlp pourraient être exprimées, seule la première portant un domaine coiled-coil et un domaine TIR aurait un rôle physiologique en étant la seule à avoir potentiellement accès au cytosol de la cellule hôte.

¹⁵ L'ORF de la protéine de fusion est portée par un plasmide répliquatif chez *Brucella* où elle est sous le contrôle du promoteur fort pLac.

Ce résultat préliminaire est donc encourageant. Afin de le confirmer, on peut envisager de tester l'éjection de Tlp hors de la bactérie en temps réel, *in vitro* ou en condition d'infection de macrophages par l'utilisation du tag "lumio". Ce tag a été originellement décrit par Gaietta et al. (Gaietta *et al.*, 2002) et depuis utilisé pour suivre la sécrétion par le T3SS (Enninga et al., 2005). Il s'agit d'un petit peptide contenant quatre cystéines (CCXXCC) qui peut co-ordonner spécifiquement avec une haute affinité, un dérivé non fluorescent de la fluoresceine (FlAsH-EDT₂). Lorsque la liaison est réalisée, le dérivé FlAsH-EDT₂ fluoresce vivement dans le vert et permet de visualiser la protéine taguée. Ainsi, des bactéries exprimant la protéine de fusion Tlp-lumio seraient traitées par le FlAsH-EDT₂ avant d'infecter des cellules hôtes, ou d'être déposées sur *agarose pad*. Dans le premier cas, l'invasion serait suivie en temps réel au microscope à fluorescence (Time-lapse). Une perte de fluorescence au sein de la bactérie refléterait la sécrétion de la protéine Tlp-lumio.

Afin de déterminer si la sécrétion de Tlp dépend du T4SS, un western blot sur le surnageant de culture de la souche de *B. melitensis* 16M délétée pour l'opéron *virB* (Nijkskens, C., thèse en cours) transformée individuellement par un vecteur répliatif codant soit la protéine de fusion *longTlp*-13Myc, soit *shortTlp*-13Myc sera réalisé. Cette souche pourrait également être utilisée pour le test de sécrétion en temps réel décrit ci-dessus. S'il s'avérait que la protéine *longTlp* passe par le T4SS, l'hypothèse de la présence d'une séquence signal aminoterminal contrasterait avec le fait que les signaux de sécrétion de l'appareil de type IV proposés chez *A. tumefaciens* (Simone *et al.*, 2001) et *Legionella pneumophila* (Luo *et al.*, 2004) sont carboxy-terminaux.

D. Tlp, un facteur de virulence non requis *ex-vivo*.

La souche de *B. melitensis* 16M délétée ΔTlp obtenue au cours de ce mémoire ne présente ni phénotype morphologique, ni retard de croissance en culture. D'autre part, ses capacités d'invasion, de survie et de répliation au sein de macrophages en cultures ne sont pas altérées. En effet, le mutant ΔTlp ne présente pas de diminution significative des CFUs intracellulaires.

Cette observation est cohérente avec l'hypothèse du rôle immunomodulateur de Tlp. La perte de capacité de survie et de répliation de *Brucella* dans les macrophages est souvent liée à une incapacité à éviter la fusion du lysosome. C'est notamment le cas des souches rugueuses, ainsi que des souches mutées pour l'opéron *virB* (O'Callaghan et al., 1999), les gènes du système senseur BvrR/S (Sola Landa et al., 1998), ou encore le gène codant le régulateur transcriptionnel vjBr. Celles-ci montrent un phénotype d'atténuation en terme de CFUs. La protéine Tlp ne semble donc pas impliquée dans la déviation du trafic vacuolaire, et la souche ΔTlp atteint sa niche de répliation.

Dans le cytosol de macrophages infectés, la protéine Tlp modulerait la sécrétion de cytokines/chemokines, l'activation des mécanismes bactéricides du lysosome et l'acquisition des signaux nécessaires à la mise en place de la réponse adaptative. On propose donc que la souche ΔTlp est incapable d'agir de la sorte. Les macrophages qu'elle infecte voient leurs mécanismes anti-bactériens activés normalement, ils sécrètent des médiateurs inflammatoires destinés à mobiliser les cellules de l'immunité innée, et ils expriment les signaux requis pour l'activation de la réponse adaptative.

Cependant, la souche ΔTlp semble mener le processus infectieux aussi bien que la souche sauvage. Même si les mécanismes bactéricides sont activés dans le phagolysosome, les facteurs de virulence (autre que Tlp) permettent à la bactérie d'y échapper. De plus, si les macrophages infectés par la souche ΔTlp , acquièrent des signaux de surface et créent un environnement cytokiniques inflammatoires dans le milieu de culture, l'absence d'un contexte immunitaire *in vitro* empêche ces médiateurs de jouer leurs rôles. Sur base de ces considérations, on ne s'étonne pas de l'absence d'un phénotype en terme de CFUs.

Cette hypothèse pourrait être supportée par la mise en évidence d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les macrophages infectés par la souche *B. melitensis* 16M ΔTlp , ou d'une augmentation de l'activation de NF- κ B au sein de ceux-ci.

E. Tlp, un facteur de virulence requis *in vivo*.

L'infection de souris par la souche $\Delta_{long}Tlp$ de *B. melitensis* 16M construite au cours de ce mémoire, a permis de mettre en évidence un rôle de la protéine Tlp dans la survie et la réplication de la bactérie *in vivo*.

Le phénotype d'atténuation observé cinq jours post-infection devra néanmoins être complété. Pour ce faire, et dans l'optique de déterminer une fonction des versions courtes et longues de Tlp, le test de complémentation pourra être réalisé en utilisant les différentes ORFs. On essaierait ainsi de compléter avec une version courte ne portant que le domaine TIR, ou avec les différentes versions longues. On pourrait alors déterminer si le domaine coiled-coil est essentiel, ou si une séquence signal éventuellement portée par l'extrémité N-terminale est requise à l'action de la Tlp.

F. Comprendre les mécanismes d'action de la Tlp.

Afin de confirmer le rôle supposé de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M au sein de la cellule hôte, on peut envisager deux approches.

D'abord, une approche basée sur l'observation de l'homologie de Tlp avec les protéines à domaine TIR, viserait à tester sa capacité à interférer avec les voies de signalisation TIR-dépendante. Elle devrait ainsi permettre d'identifier les partenaires protéiques eucaryotiques d'interactions homotypiques TIR-TIR.

Par ailleurs, une approche sans *a priori* compléterait la compréhension des mécanismes d'action de Tlp. Elle permettrait éventuellement d'éclaircir le rôle du domaine coiled-coil. Ainsi, on peut penser que Tlp altère d'autres processus cellulaires de l'hôte en interagissant, via ce domaine, avec d'autres protéines eucaryotes. On n'exclut cependant pas que celui-ci soit nécessaire aux mécanismes d'interférence impliquant le domaine TIR.

1. Quels rôles pour le domaine TIR ?

Les protéines mammaliennes à domaine TIR sont impliquées dans des voies de signalisation qui convergent vers l'activation de NF- κ B. On a proposé que Tlp module l'activation TIR-dépendante de ce facteur de transcription. Aussi, l'expression de Tlp par des cellules mammaliennes et l'activation de la voie TIR-dépendante initiée par IL-1 devraient permettre de confirmer ce rôle putatif. La suppression de l'activation de NF- κ B a été montrée dans le cas de la protéine TlpA de *S. enterica* serovar Enteritidis, homologue à la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M (Newman *et al.*, 2006).

Il serait, par la suite intéressant de préciser les modalités d'action de la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M. Cela nécessiterait de tester sa capacité à interagir avec les différents TLRs et les protéines adaptatrices à domaine TIR. On a proposé, au début de ce travail, que le domaine TIR des TLRs présente une certaine spécificité qui permet un usage sélectif des protéines adaptatrices par les différents récepteurs (par exemple, l'interaction des domaines TIR du TLR3 et de MyD88 n'est jamais observée). Dans ce sens, il ne serait pas étonnant que la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M ne s'associe pas avec tous les TLRs. Cette hypothèse peut être testée en utilisant le système double hybride, avec le principal inconvénient qu'une absence d'interaction lors du test ne signifie pas l'absence d'interaction des protéines dans certaines conditions. Il est en effet envisageable que la protéine Tlp, à l'instar des protéines adaptatrices, ne s'associe au domaine TIR de certains TLRs qu'en condition d'activation de ceux-ci. Par ailleurs, on ne peut pas exclure que la Tlp altère ces voies de signalisation en

séquestrant des protéines adaptatrices. Et, une interaction avec MyD88 pourrait suffire à altérer la plupart des voies de signalisation TIR-dépendante.

L'atténuation significative de la capacité de réplication de la souche délétée pour *Tlp* en souris cinq jours post-infection, montre que son expression favorise la survie et la réplication de *B. melitensis* 16M dans un contexte immunitaire. Ce qui renforce l'idée qu'elle lui permet d'échapper à la réponse immune, probablement en évitant le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée. Aussi, la réponse de l'immunité innée de la souris, cinq jours après l'infection par la souche ΔTlp , serait plus vigoureuse.

Lors d'une infection chez une souris, le pic de réplication de *Brucella* est atteint cinq jours après le contact du pathogène. La diminution du nombre de CFUs qui s'ensuit, est provoquée par le développement d'une réponse adaptative. Afin de confirmer que la protéine Tlp pourrait contribuer à couper les ponts entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, il sera nécessaire de dénombrer les CFUs bactériens récupérés des rates de souris 21 jours après l'infection par la souche ΔTlp .

2. L'approche sans à priori.

Le crible double-hybride visant à identifier des partenaires protéiques eucaryotes d'interaction avec la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M a mis en évidence l'interaction de $_{long}Tlp$ avec la *Ran Binding Protein 9* (RanBP9 ou RanBPM).

Celle-ci a été initialement décrite comme une protéine interagissant avec la Ran, une petite GTPase de la famille Ras. La protéine Ran est impliquée dans divers processus, tels le transport nucléocytoplasmique de protéines ou la progression du cycle cellulaire. Bien que la plupart des *Ran Binding Proteins* joue un rôle dans le transport nucléaire, la RanBP9 ne semble pas impliquée dans ce processus. Sa fonction reste largement inconnue, elle est simplement décrite par les interactions qu'elle entretient avec une dizaine de protéines soit nucléaires, soit solubles dans le cytosol, soit associées à la membrane plasmique. Ces protéines qui lient la RanBP9 ne semblent avoir aucun lien fonctionnel. Il est donc difficile d'évaluer la pertinence de son interaction avec notre protéine d'intérêt $_{long}Tlp$.

Un papier récent (Wong and Chung, 2003) décrit néanmoins un rôle immunomodulateur de la petite GTPase ran impliquée dans le contrôle de l'activité de NF- κ B. Il serait toutefois présomptueux d'essayer de voir dans l'interaction putative de la $_{long}Tlp$ à la RanBP9, une possibilité d'interférence de cette protéine de *B. melitensis* 16M avec la réponse immune de l'hôte.

Cette interaction devra en outre être confirmée. Si c'est le cas, il conviendra d'évaluer la pertinence de cette interaction avec une protéine aux partenaires si divers.

G. Un modèle d'action de la protéine Tlp proposé a priori.

Sur base de la présence du domaine TIR, on a émis l'hypothèse que la protéine Tlp de *B. melitensis* 16M peut interférer, dans les cellules hôtes, avec la signalisation initiée par les récepteurs de l'immunité innée disposant du même domaine (Fig.62). Ces voies de transduction du signal déclenchées par les TLRs ou les récepteurs IL-1R jouent un rôle central dans la mise en place de la réponse immune. Et ce, en débouchant sur la génération de médiateurs pro inflammatoires qui recrutent et activent les acteurs de l'immunité innée et en activant les mécanismes bactéricides du lysosome. En outre, dans les cellules présentatrices d'antigènes ou APCs (qui constituent le "lien cellulaire" entre l'immunité innée et adaptative), ces voies induisent l'expression des signaux nécessaires à la mise en place d'une réponse adaptative.

A priori, on propose l'idée que Tlp peut agir en tant que dominant négatif des protéines adaptatrices. Cette mimique, en s'associant par liaison homotypique au domaine TIR des TLRs empêcherait la formation des complexes multiprotéiques après reconnaissance

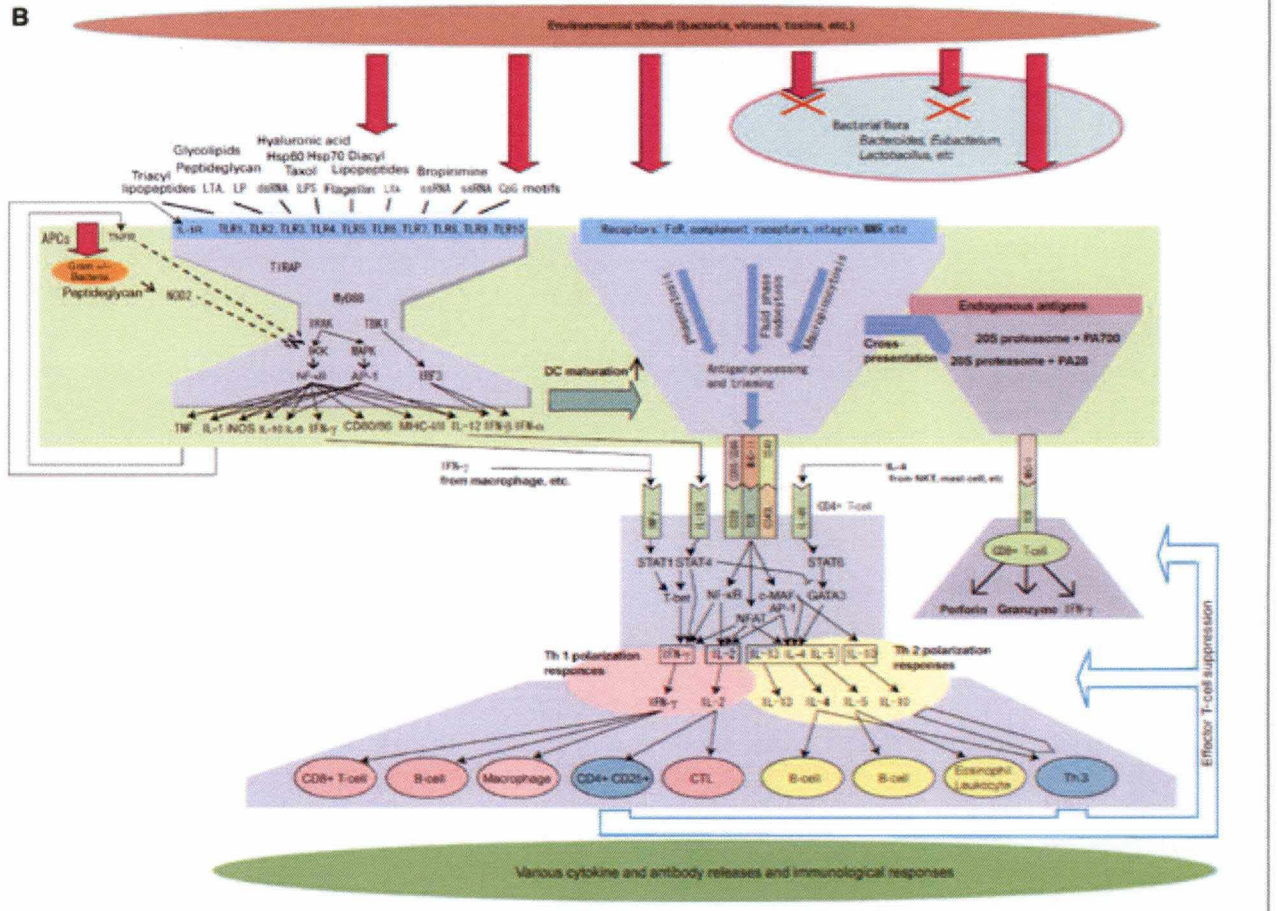


Figure 63. Le système immunitaire est un réseau présentant une structure en nœud papillon. Les cellules présentatrices d'antigènes constituent un point de convergence des réponses au pathogène, puisque la présentation d'antigènes à l'immunité adaptative est essentielle. D'autre part, les voies de signalisation des TLRs forme un sous réseau intracellulaire en nœud papillon où les protéines adaptatrices constituent le point de passage obligé à la réponse. Si la Tlp de *B. melitensis* peut disrupter ce sous-réseau en s'attaquant à son point faible au sein d'une cellule présentatrice, on peut penser qu'elle contribue largement au succès de cette bactérie dans cette cellule à priori peut favorabl à la survie.

de la bactérie. En agissant en aval de sa détection par les TLRs, *B. melitensis* 16M affecterait la capacité des cellules infectées à induire la sécrétion de médiateurs destinés à mobiliser les acteurs de l'immunité innée. D'autre part, certaines APCs, les macrophages et les cellules dendritiques, sont des hôtes privilégiés de *Brucella* (Billard *et al.*, 2005). Au sein de celle-ci, la Tlp pourrait empêcher ou tout au moins perturber leur maturation et ainsi contribuer à éviter la mise en place d'une réponse adaptative.

Le modèle est présenté à la figure 1.

H. La Tlp permet à *B. melitensis* 16M de s'attaquer à deux points faibles du système immunitaire.

En infectant les cellules phagocytaires professionnelles de son hôte, *Brucella* semble à priori aller au devant de difficultés importantes. En effet, ces cellules sont spécialisées dans l'internalisation et la dégradation de pathogènes, après induction des mécanismes bactéricides. D'autre part, elles expriment un très large groupe de PRRs, dont les TLRs, qui contribuent à induire une réponse inflammatoire. La sécrétion de cytokines et de chemokines assurant la mobilisation et l'activation des effecteurs de l'immunité innée. Enfin, les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) professionnelles, cela signifie qu'elles expriment les signaux nécessaires à la mise en place d'une réponse adaptative. A priori, il est difficile d'imaginer qu'il soit possible à *Brucella* de faire face à de telles contraintes.

Malgré ces considérations, *Brucella* utilise efficacement ces cellules hôtes. Et on propose que la protéine Tlp pourrait largement contribuer à ce succès. Cette idée est renforcée au vu de la structure du réseau immunitaire proposée par Kitano (Kitano & Oda, 2005) (Fig.63).

Le réseau immunitaire présente une structure en nœud papillon (*bow tie structure*), centrée sur une étape essentielle de la réponse immune, la présentation d'antigènes et de signaux costimulateurs par les APCs aux lymphocytes T de l'immunité adaptative. Cette étape est un passage obligé de la mise en place d'une réponse spécifique. Par ailleurs, les voies de signalisation initiées par les TLRs, notamment au sein de ces cellules, forment également un sous-réseau en nœud papillon, centré sur les protéines adaptatrices à domaine TIR.

Au vu de cette structure du réseau formé par le système immunitaire, notre modèle d'action à priori de la Tlp de *B. melitensis* 16M propose que cet effecteur s'attaque au talon d'Achille de celui-ci. En interférant avec les protéines adaptatrices, la Tlp contribuerait ainsi à réduire efficacement la capacité de recrutement des cellules de l'immunité innée par la cellule infectée. En outre, si la Tlp peut assurer cette fonction au sein des cellules présentatrices d'antigènes, elle contribue à réduire la communication entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. *Brucella* s'attaquerait, grâce à la Tlp à un double de fragilité du système, à savoir le point de convergence des voies initiées par les TLR et ce, au sein des APCs.

Malgré que *B. melitensis* 16M puisse probablement enrayer le bon déroulement de la réponse en s'attaquant à ce qui apparaît comme deux points faibles, à savoir les protéines à domaines TIR et les cellules présentatrices d'antigènes, cela ne suffit évidemment pas à inhiber toute réponse immune. Et, la redondance des PRRs est un élément qui permet de le comprendre.

*MATERIEL
& METHODES*

Matériel et méthodes

A. Souches et plasmides

1. Souches bactériennes

souches	Génotypes	Explications complémentaires
<i>E. coli</i> DH10B	F <i>mcrA</i> , (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>dlacZ</i> M15, <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>rspL</i> , <i>nupG</i> (<i>Sm^R</i>)	Souche utilisée pour l'amplification de plasmides. GibcoBRL (Invitrogen)
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>recA thi pro hsdR⁺ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7</i> lysogenized with λ pir phage.	Souche utilisée pour le transfert par conjugaison de plasmides pourvus d'une origine de transfert, grâce au plasmide RP4 intégré dans son génome. (Miller and Mekalanos, 1988)
<i>E. coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA-D(sr1-recA) mcrB mrr hsd20(rB-,mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL1-leu ml1</i>	Souche résistante à la toxine <i>ccdB</i> grâce à un allèle <i>gyrA462</i> . Elle est utilisée pour l'amplification de vecteurs gateway TM . (Invitrogen)
<i>B. melitensis</i> 16M biovar1		Souche de <i>Brucella</i> utilisée au cours de ce travail ; phénotype lisse, mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal ^R) sélectionné au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur.

2. Souche de levure

Souche	Génotype	Explications complémentaires
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAV103	(<i>Mata</i>) : <i>LEU2-3, 112 TRP-901 HIS3A200 ade2-1gal4A gal80A SPAL10 ::URA3 GAL1 ::lacZGAL1 ::HIS3-@LYS2 can1R cyh2R</i>	Souche utilisée, au cours de ce travail, pour le crible double-hybride. (Walhout and Vidal, 2001)

3. Plasmides

Plasmides	Caractéristiques importantes
pDONR201	vecteur donneur conçu pour le clonage en système Gateway TM de fragments d'ADN d'intérêt (Invitrogen). Il porte les sites de recombinaison <i>attP1</i> et <i>attP2</i> flanquant la cassette Gateway TM contenant le gène <i>ccdB</i> (toxique pour certaines souches d' <i>E. coli</i>) et <i>cat</i> (résistance au chloramphénicol). Il porte également le gène <i>kan^R</i> de résistance à la kanamycine et une origine de répllication (pUC ori) chez <i>E. coli</i> . Il est utilisé lors des réactions BP permettant l'échange de la cassette contre un fragment d'ADN d'intérêt flanqué des sites <i>attB1</i> et <i>attB2</i> . On obtient alors un vecteur d'entrée.
pBBR-MCSI- <i>cat</i>	Plasmide répllicatif <i>medium copy</i> chez <i>Brucella</i> spp (Origine de répllication REP, 10 à 15 copies par cellules), possédant un gène <i>cat</i> de résistance au chloramphénicol (Kovach et al., 1995).
pBBR-MCSI-3HA- <i>cat</i>	Mêmes remarques que pour le pBBR-MCSI- <i>cat</i> . Il porte cependant la cassette Gateway TM flanquée des sites <i>attR1</i> et <i>attR2</i> , à proximité du promoteur pLac, et la séquence codant le tag 3HA directement en aval du site <i>attR2</i> . Une réaction LR permet l'échange de la cassette avec une ORF d'intérêt portée par un vecteur d'entrée. On obtient ainsi une fusion transcriptionnelle entre le pLac, la séquence codante insérée et la séquence codant le tag (fusion C-terminale) (Hallez, R., thèse en cours).
pBBR-MCSI-GST- <i>cat</i>	Mêmes remarques que pour le pBBR-MCSI-3HA- <i>cat</i> , à ceci près qu'il porte la séquence codant le tag GST et non 3HA (Hallez, R., thèse en cours).
pBBR-MCSI-13Myc- <i>cat</i>	Mêmes remarques que pour le pBBR-MCSI-3HA- <i>cat</i> , mis à part qu'il porte la séquence codant le tag 13Myc et non 3HA (Hallez, R., thèse en cours).
pMR10- <i>cat</i>	Plasmide répllicatif chez <i>Brucella</i> spp. à faible nombre de copies (origine RK2oriV), possédant un gène <i>kan^R</i> de résistance à la kanamycine et un gène <i>cat</i> .
pMR10-eGFP- <i>cat</i>	Mêmes remarques que pour le pMR10- <i>cat</i> . Il porte également une cassette Gateway TM entourée des sites <i>attR1</i> et <i>attR2</i> , à proximité du promoteur <i>plac</i> , et la séquence codant le tag eGFP. Il permet la fusion en phase à celle-ci, d'une ORF d'intérêt après réaction LR (fusion C-terminale) (Hallez, R., thèse en cours).
pSKoriT	Plasmide dérivé de pBluescript SK (Stratagene) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène <i>bla</i> (résistance à l'ampicilline) et une origine de répllication ColE1, non fonctionnelle chez <i>Brucella</i> ; c'est donc un plasmide suicide chez celle-ci (Tibor, A. thèse 1999).
pSKoriT-GST- <i>cat</i>	Même remarques que pour le pSKoriT. Cependant, le gène <i>bla</i> est disrupté par le gène <i>cat</i> (Danèse, I., thèse 2002). Il porte également une cassette Gateway TM entourée des sites <i>attR1</i> et

	attR2, ainsi que la séquence codant le tag GST, pour permettre la fusion en phase à celle-ci, d'une ORF d'intérêt après réaction LR (fusion C-terminale).
pSKoriT- <i>eGFP-bla-kan^R</i>	Mêmes remarques que pour le pSKoriT. Il porte également le gène <i>kan^R</i> de résistance à la kanamycine, une cassette Gateway™ et la séquence codant le tag eGFP. Il permet ainsi la fusion en phase d'une ORF d'intérêt à cette séquence, après réaction LR (fusion C-terminale) (Hallez, R., thèse en cours).
pJQ200oriT- <i>gent^R</i>	Plasmide mobilisable et suicide chez <i>Brucella</i> spp. (origine p15a, plasmide répliquatif seulement chez les entérobactéries). Le gène de résistance à la gentamycine (<i>gent^R</i>) permet la sélection de son intégration dans le génome. Le gène <i>sacB</i> , létal sur un milieu contenant du sucrose, permet de sélectionner la perte du vecteur (Quandt & Hynes, 1993).
pGEM-T Easy- <i>bla</i>	Vecteur de clonage portant le gène <i>bla</i> , possédant des extrémités T cohésives et permettant le test blanc/bleu (Promega).
pKSoriT	Mêmes remarques que pour le pSKoriT, il dérive toutefois du pBluescript KS. Ce plasmide a été utilisé lors de la construction du mutant <i>Tlp::aphA4</i> de <i>B. melitensis</i> 16M mentionnée dans ce mémoire.
pUC- <i>aphA4</i>	Vecteur dérivé du pUC4K (A. Oka et al., 1981; Vieira and Messing, 1982), dans lequel a été clonée la cassette <i>aphA4</i> encodant la résistance à la kanamycine (Dozot, M., thèse en cours). Il a également été utilisé lors de la construction du mutant <i>Tlp::aphA4</i> de <i>B. melitensis</i> 16M.
pDest-472 (CMV, C- <i>eGFP, bla</i>)	Plasmide de destination Gateway™ portant un promoteur d'expression eucaryote CMV(Cytomégalovirus), la cassette Gateway™ entourée des sites attR1 et attR2 et la séquence codant le tag eGFP. Il possède également le gène de résistance à l'ampicilline. La réaction LR permet d'y cloner une ORF d'intérêt, dès lors fusionnée (en C-terminal) au tag eGFP et sous le contrôle du promoteur CMV (Esposito D., communication personnelle).
pDest-474 (CMV, C- <i>myc, bla</i>)	Mêmes remarques que pour le pDest-472, à ceci près qu'il porte la séquence codant le tag <i>myc</i> .
pDest-490 (CMV, C- FLAG, <i>bla</i>)	Mêmes remarques que pour le pDest-472, à ceci près qu'il porte la séquence codant le tag <i>flag</i> .
pDest-CMV4 (CMV, N- FLAG, <i>bla</i>)	Mêmes remarques que pour le pDest-474, à ceci près qu'il porte la séquence codant le tag <i>Myc</i> et que la fusion sera N-terminale.
pVV212	Vecteur dérivé du pGBT9 dans lequel a été insérée une cassette de clonage Gateway™ (Van Mullem <i>et al.</i> , 2003)

B. Milieux, tampons et solutions

1. Milieux de culture

Tous les milieux de culture sont à autoclaver (121°C pendant 20 minutes) avant utilisation.

Milieux de culture bactériens :

Milieux riches pour <i>E. coli</i> : milieu Luria Bertani (LB) Pour un litre d'eau désionisée		Milieux riches pour <i>Brucella melitensis</i> 16M : milieu 2YT Pour un litre d'eau désionisée	
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	Mix pour LB liquide	20 g
NaCl	5 g	Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g
Yeast extract	5 g	Yeast extract	5 g
Agar (si forme solide)	15g	Agar (si forme solide)	1g

Milieux de culture de levures :

YPD liquide Pour un litre d'eau désionisée		Milieu minimum SD Pour un litre d'eau désionisée		Milieu synthétique ¹ Acides aminés et bases azotées 100x.	
Glucose	20 g	Yeast Nitrogen Base w/o amino acid	6,75 g	Adénine sulfate	2g/l
Bacto peptone 2%	50 g	Glucose	20g	Uracile	2g/l
Yeast extract 1%	25g	Agar (si forme solide)	20g	L-Tryptophane	2g/l
				L-Histidine-HCl	2g/l
				L-Leucine	3g/l
				L-Lysine-HCl	3g/l

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

Composés destinés à compléter les différents milieux :

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock(1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H ₂ O	50 mg/ml
Gentamycine	Genta	H ₂ O	50mg/ml
Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside	IPTG	Ethanol 70%	100 mM
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside	X-gal	Diméthylformamide	2 mg/ml
3-Amino-1,2,4-Triazole	3AT	H ₂ O	80 mg/ml
sucrose		H ₂ O	Sucre en morceau

Toujours filtrer stérilement avec un filtre 0,22 μm de porosité avant d'aliquoter et de diluer 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

2. Tampons

PBS 20x Pour un litre d'eau désionisée		PBS Triton-X 100 Pour un volume de 500ml		Tampon TAE 50x Pour un litre d'eau désionisée	
K ₂ HPO ₄ 2mM	4 g	PBS10x	50ml	Tris-HCl, pH 8,0	40mM
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	28,2 g	Triton-X100	0,5g	EDTA	50mM
KCl 2,7 mM	4 g	Eau distillée	450ml	Acide acétique glacial	57,1ml
NaCl 137 mM	160 g				
Amener à pH 7,4.					

Tampon S1 (conserver à 4°C)		Tampon S2		Tampon S3	
RNase A	100μg/ml	NaOH	200mM	Acétate de potassium pH5,5	3,0M
Tris-HCl pH 8,0	50mM	SDS	1%		
EDTA	10mM				

Tampon de dénaturation des protéines (western blot)		Running buffer 10x Pour 1l d'eau désionisée		Towbin buffer Pour 1l d'eau désionisée	
Glycérol 50%	10ml	Tris base 0,250M	30,35g	Tris base 0,250M	5,8g
-mercaptoéthanol 5%	5ml	Glycine	144g	Glycine	2,9g
SDS 10%	2g	SDS	10g	SDS	0,37g
TRIS 1,5M pH6,8	13ml			Méthanol technique	200ml
Bleu de bromophénol	0,005g				

Solution de révélation (western blot)		Solution de strippage d'une membrane de western blot Pour 500ml d'eau désionisée ²		Tampon de resuspension des protéines. Pour 25ml d'eau désionisée ³	
ECL buffer		SDS 20%	50ml	Thiourée 2M	3,8g
H ₂ O ₂		Tris 0,5M	62,5ml	Urée 7M	10,5g
		H ₂ O	500ml	CHAPS 4%	1g
				Tris 30mM	91mg

² Ajouter 350μl de β-mercaptoéthanol à 50ml de tampon avant utilisation.

³ Mettre à pH 8,5 ; aliquoter et conserver à -20°C.

Sol. d'acétate de lithium (LiAc) 10x (à autoclaver)		Sol. de polyéthylène glycol (PEG)50% (à filtrer avec un filtre 0,45μm)		Tampon TE	
LiAc	10,2g	PEG 4000	50g	Tris-HCl pH 8,0	10mM
H ₂ O	100ml	H ₂ O	100ml	EDTA	1mM

C. Techniques relatives à l'ADN

1. Polymerase chain reaction (PCR)

Principe

Cette technique est utilisée pour amplifier un fragment d'ADN d'intérêt dont on connaît au moins les séquences bordantes. Des amorces oligonucléotidiques (ou *primers*) complémentaires à celles-ci sont conçues. La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence de ces amorces, de dNTP's et d'une ADN polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Promega ou l'Expand High Fidelity de Roche). La température est ensuite diminuée pour permettre l'hybridation spécifique des amorces, l'une s'hybride au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". La séquence comprise entre celles-ci est alors amplifiée par l'ADN polymérase à une température optimale pour son fonctionnement. En répétant le cycle comprenant la dénaturation, l'hybridation et l'élongation, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible.

Mix PCR

Réactifs	Quantité
Tampon 5X correspondant à l'enzyme	10 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	4 µl
Primer 1 (20 µM)	1 µl
Primer 2 (20 µM)	1 µl
Taq polymérase ou High Fidelity ⁴	0,5 µl
Template (1-10ng)	1 µl
Eau distillée stérile	Porter à 50 µl

Programme

Dénaturation	5 minutes à 94°C
Amplification 25 cycles de 3 étapes	
dénaturation	30 secondes à 94°C
hybridation des primers	30 secondes à X°C ⁵
élongation	Y minute(s) ⁶ à 72°C
Elongation finale	10 minutes à 72°C

⁴ On utilise la *Taq* polymérase, qui introduit des mutations à un taux relativement élevé, dans les cas de PCR diagnostiques. La High Fidelity est utilisée dans les cas de clonage.

⁵ $X = T_m - 10^\circ\text{C}$ (entre 52 et 65°C). La température de melting des amorces, $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence en 5' (sites attB1, attB2, sites de restriction,...).

⁶ Y est la taille (en kpb) du fragment à amplifier.

Amorces utilisées

Nom de l'amorce	séquence
Am1	GGTACCCCTCTGATTGTTTTCAAAGCCAA
Am2	GGAATTCGGAAGATCTTCATATTAGAAGAGTACGAACTCAT
Av1	GAAGATCTTCGGAATCCCTTATCTGAGGCAGATGCAAATA
Av2	AAGCTTAGCATCAATTCAAGAGGCTGAC
Primer universel U19	GTTTTCCCAGTTACGACG
Gal4 Activating Domain	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACC
Gal4 Terminateur	GAAGTGAAGTTCGGGGTTTTTCAG

2. Électrophorèse en gel d'agarose

Principe et Méthode

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN dans un champ électrique (gel placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X, différence de potentiel de 80 à 100 V) en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose du gel est inversement proportionnel à la taille des fragments à séparer dissous dans le tampon TAE 1X). Celle-ci est estimée en faisant migrer parallèlement aux échantillons un marqueur de tailles, on a utilisé l'*HyperLadder* (Bioline). Un petit volume de la solution d'alourdisseur⁶ est ajouté avant de charger les échantillons. Le bromure d'éthidium (BrEth), agent intercalant, mélangé à l'agarose avant sa polymérisation permet de révéler les fragments d'ADN sous UVs. L'intensité de fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille et à la

quantité d'ADN. Cette dernière peut être estimée par comparaison de l'intensité de fluorescence de la bande correspondant au fragment d'intérêt avec celle des fragments du marqueur de tailles, dont les quantités sont connues.

⁶ L'alourdisseur est composé de glycérol 50%, d'EDTA 100mM, de SDS 1% et de méthyl orange.

3. Restriction plasmidique et ligation.

Principe

La restriction consiste en un clivage de l'ADN double-brin par des endonucléases reconnaissant de courtes séquences nucléotidiques spécifiques de 4 à 6 paires de bases, souvent palindromiques. (Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs.) La restriction diagnostique permet d'identifier des plasmides selon leur carte de sites de restrictions, et de quantifier l'ADN. On peut également être amené à restreindre des plasmides ou des fragments d'ADN en vue de constructions futures. Dans ce cas, une réaction de ligation permet de lier de manière covalente des fragments d'ADN obtenus. Elle a été utilisée pour cloner des inserts au sein de différents plasmides, après linéarisation de ceux-ci par restriction. Certaines enzymes de restriction génèrent des "bouts protrudants", dans ce cas, l'insert doit porter des bouts protrudants complémentaires. La réaction est catalysée par la ligase du phage T4, pendant 2 heures à température ambiante.

Mix de restriction

1 µl d'enzyme de Restriction⁷
 1 µl de tampon de restriction 10X (adapté à l'enzyme)
 X µl de plasmide en suspension dans de l'eau distillée (X= 1 à 5)
 Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau distillée
 Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C.

Mix de ligation

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

⁷ Elle doit constituer au maximum 1/10^{ème} du volume final. Il convient d'utiliser entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN. 1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl.

4. Minipréparation de plasmide

Principe

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides de bactéries. L'extraction d'ADN plasmidique peut être résumée en 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries qui permet la sortie de l'ADN plasmidique, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de celui-ci et enfin sa resuspension.

Méthode

Suivre le protocole du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel), il est employé pour purifier environ 20 µg d'ADN plasmidique.

5. Purification sur colonne

Méthode

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

6. Clonage Gateway™.

Principe

Le système Gateway™ est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*E. coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage λ et dans le génome bactérien. Le génome phagien est alors intégré entre les sites hybrides

générés, *attR* et *attL*. Cette réaction (réaction BP) est catalysée par deux enzymes, l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage et l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne. L'intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites *attR* et *attL*. La réaction d'excision (réaction LR) requiert les enzymes Int, IHF et Xis, une protéine d'origine phagique.

Ce système a été adapté pour permettre des clonages faciles par recombinaison en laboratoire (Fig. 1). La réaction BP permet le clonage directionnel d'un produit PCR flanqué des sites *attB*, (fusionnés aux amorces PCR) dans un vecteur donneur contenant les sites *attP* qui flanquent la cassette GatewayTM. Celle-ci est constituée du gène *ccdB* toxique pour certaines souches d'*E.coli* (la protéine *ccdB* interfère avec l'ADN gyrase d'*E. coli* et inhibe ainsi la croissance des souches "*ccdB* sensibles") et du gène *cat* de résistance au chloramphénicol. La recombinaison entre les sites *attB* et *attP* permet l'échange de cette cassette contre l'insert. Elle génère un vecteur d'entrée où ce dernier est entouré des sites *attL*. Elle est catalysée par le "mix BP clonase" contenant Int et IHF. La réaction LR permet la recombinaison entre un vecteur d'entrée et un vecteur de destination. Celui-ci dispose de la cassette GatewayTM, flanquée de sites *attR*. La recombinaison entre les sites *attL* et *attR* assure le transfert de l'insert du vecteur d'entrée vers le vecteur de destination, par échange de la cassette GatewayTM. Elle génère ainsi un vecteur d'expression portant l'insert entouré des sites *attB*. La réaction est catalysée par le mix "LR clonase", contenant Int, IHF et Xis. A partir du moment où le vecteur d'entrée est réalisé, on peut en une seule étape cloner l'insert d'intérêt vers des plasmides de destination très divers.

Méthode

Réaction BP	Réaction LR
150ng de plasmide donneur 150ng de produit PCR flanqué des sites <i>attB</i> 1 μ l BP clonase 2 μ l de tampon BP 3 μ l H ₂ O	150ng de plasmide d'entrée 150ng de plasmide de destination 1 μ l LR clonase 2 μ l de tampon LR 3 μ l H ₂ O

Le mix est placé à 25°C overnight.

D. Techniques relatives aux protéines.

1. Analyse de l'expression d'une protéine par western blot.

Le western blot est une technique permettant de détecter spécifiquement des protéines. Elle comprend trois grandes étapes. Premièrement, le mélange de protéines est séparé par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane. Enfin, la ou les protéines d'intérêt sont détectées spécifiquement par l'utilisation d'anticorps.

Préparation d'extraits protéiques totaux

- Ensemencer une culture de 50 ml de 2YT avec ou sans antibiotique approprié, à une DO_{600nm} de 0,05 avec une préculture des souches de *Brucella* d'intérêt.
- Incuber à 37°C sous agitation pendant une durée déterminée (1h, 6h, et/ou 24h).
- Après chacun de ces temps d'incubation, prendre la DO_{600nm} et calculer le volume de culture à prélever afin d'obtenir une DO_{600nm} de 10 après resuspension du culot bactérien dans 100 μ l de PBS à l'étape 6.
- Inactiver le volume de culture prélevé 1h à 80°C.
- Centrifuger les cultures afin de culotter les bactéries.

- Resuspendre dans 100µl de PBS 1X et vérifier que la DO_{600nm} est de 10 pour chaque souche. On s'assure donc qu'en chargeant le même volume d'échantillons protéiques préparés pour chaque souche, on charge la même quantité de protéines totales.
- Après coulage du gel de migration électrophorétique (ci-dessous), préparer les échantillons protéiques à charger en mettant la suspension bactérienne en présence du tampon de dénaturation.
- Mettre les échantillons 10 minutes dans l'eau bouillante, puis directement sur glace avant le chargement du gel.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Après avoir dénaturé les protéines, un volume identique de chaque échantillon est chargé dans les pistes. Du tampon de dénaturation est chargé dans les pistes qui n'accueillent aucun échantillon pour assurer l'homogénéité du front de migration. Un puits est réservé au marqueur de poids moléculaire (P.M.). Nous avons utilisé le Bio Rad Low Range qui contient des protéines dont les P.M. vont d'approximativement 18kDa à 110 kDa.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) permet de séparer des protéines sur le seul critère de leur poids moléculaire. La migration des protéines a lieu successivement dans un gel d'empilement (stacking gel) qui permet de concentrer les échantillons protéiques, puis dans un gel de séparation (running gel) qui permet de les séparer. La concentration de ces gels en agent réticulant est inversement proportionnelle à la taille des protéines à séparer.

La durée de migration (40 mA, 300V) est fonction du pourcentage du gel en acrylamide et du poids de la protéine d'intérêt ainsi que des différentes protéines du marqueur. On utilise un gel 12%, la migration dure entre 1h30 et 1h50. Le bleu de bromophénol du tampon de dénaturation permet de suivre la migration.

Running Gel		Stacking Gel	
Acrylamide 30%	3,2ml	Acrylamide 30%	650µl
Tris 1,5M pH8,8	2,0ml	Tris 0,5M pH6,8	1,25ml
H ₂ O	2,7ml	H ₂ O	3,1ml
APS 10%	80µl	APS 10%	150µl
TEMED	2,7µl	TEMED	5µl

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est assuré par électroblot semi-dry (humidification par le *Towbin buffer*). Une différence de potentiel (entre 10 et 14 V, 3mA par cm² de membrane de nitrocellulose) appliquée perpendiculairement au gel de polyacrylamide, entre celui-ci et une membrane de nitrocellulose permet le transfert des protéines chargées négativement sur la membrane, qui devient une réplique parfaite du gel. La vitesse de transfert des protéines est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

Immunodétection

Cette technique de révélation permet de détecter spécifiquement la protéine d'intérêt en utilisant un anticorps primaire dirigé contre un épitope de celle-ci ou un tag qui lui est fusionné.

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, les sites susceptibles de lier celui-ci de façon non spécifique sont saturés en incubant la membrane overnight à 4°C avec une solution de PBS 1X-Tween 0,05%-Lait en poudre 5%.

- La membrane est incubée une heure sous agitation en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 5%.
- Elle est lavée cinq fois trois minutes avec du PBS 1X-Tween 0,05%.

- Elle est incubée sous agitation en présence d'un anticorps secondaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 5%. Il reconnaît le fragment constant de l'anticorps primaire et permet de révéler la présence de la protéine, grâce à la peroxydase qui lui est conjuguée. Cette enzyme catalyse en effet l'oxydation du luminol, une réaction produisant de la lumière.
- Avant révélation, la membrane est de nouveau lavée cinq fois trois minutes avec du PBS 1X-Tween 0,05%.

Anticorps primaires utilisés	Références
Anti-HA	Eurogentec 1 : 1000
Anti-GST	SIGMA 1 : 1 000
Anti-Myc	Eurogentec 1 : 1 000
Anti-GFP	Eurogentec 1 : 1 000
Anticorps secondaire utilisé	
Goat anti-mouse HRP	DAKO, 1 : 10 000

Révélation

La révélation se déroule en chambre noire. La face de la membrane ayant fixé les protéines est recouverte par la solution de révélation. On expose la membrane à un film autoradiographique pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal. L'activité maximale de la peroxydase est atteinte 1 à 5 minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps. Le film est plongé dans un bain de révélateur destiné à faire apparaître les bandes, puis dans la solution de fixation avant d'être rincé à l'eau de ville et de sécher à l'air libre.

Stripper la membrane

La membrane du western blot peut être réutilisée afin de mettre en évidence spécifiquement d'autres protéines par l'utilisation d'autres anticorps primaires. Pour ce faire, la membrane est *strippée*, cela consiste à arracher les anticorps primaires utilisés précédemment. La membrane est incubée en présence de la solution de stripping, puis lavée par du PBS 1X- Tween 0,05%. Une étape de blocking overnight est réalisée avant d'incuber la membrane en présence d'un nouvel anticorps primaire.

2. Précipitation des protéines du surnageant d'une culture bactérienne.

L'analyse des protéines présentes dans le surnageant d'une culture bactérienne par western blot nécessite une étape de filtration de la culture et de précipitation des protéines.

Les bactéries de la culture sont culotées, avant que le surnageant ne soit filtré sur un filtre de 0,22µm de porosité. Le filtrat est mis en présence de TCA 10% et laissé overnight à 4°C (au BL2). L'échantillon est de nouveau centrifugé (13000 rpm, 30 minutes à 4°C) et on ajoute au culot du TCA 5%. Après centrifugation (13000 rpm, 30 minutes à 4°C), on ajoute 20ml d'acétone au culot. Une nouvelle centrifugation (13000 rpm, 30 minutes à 4°C) est réalisée, et on laisse le culot sécher à l'air libre. Il est ensuite resuspendu dans un volume minimal de tampon de resuspension. Les échantillons protéiques sont conservés à -20°C, ils sont mis en présence du tampon de dénaturation en vue du western blot.

E. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.

1. Transformation bactérienne : choc thermique

Principe

De manière générale, la transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (dans notre cas, un plasmide) dans une bactérie. Nous utilisons ici la transformation

chimique pour transformer les souches DH10B et S17-1 d'*E. coli*. Pour ce type de transformation, la paroi et la membrane bactériennes sont rendues perméables à l'ADN par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). La bactérie est alors dite compétente.

Méthode

Des bactéries CaCl_2 compétentes (100 μl) sont mises en présence du plasmide (5 μl). L'ADN plasmidique forme, avec le calcium, un complexe résistant aux désoxyribonucléases qui est supposé adhérer à la bactérie. Après 30 minutes d'incubation sur glace, un choc thermique (1 minute à 37°C) permet au complexe de rentrer dans la cellule. Un temps d'incubation (45 minutes à l'étuve à 37°C) en milieu riche (LB liquide) non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. On étale 100 μl sur un milieu sélectif approprié, on culotte le reste des bactéries avant de le resuspendre et d'étaler 100 μl . Les bactéries poussent overnight à 37°C.

2. Le test blanc/bleu : l' α -complémentation

Ce test permet de détecter visuellement les bactéries transformées par un plasmide recombinant portant un insert disruptant le gène *lacZ'*.

En effet, dans cette souche, *lacZ Δ M15*, dans son génome, code la partie carboxy-terminal de la β -galactosidase qui n'est donc pas fonctionnelle. Il peut néanmoins y avoir une α -complémentation suite à l'acquisition du plasmide portant un fragment du gène *lacZ*, *lacZ'*, codant la partie N-terminale de la β -galactosidase. Lorsqu'il y a complémentation, la bactérie possède deux fragments de la β -galactosidase qui reconstitue une protéine fonctionnelle. Celle-ci clive le X-gal, substrat chromogène qui donne alors un composé bleu qui s'accumule dans la bactérie. Les colonies blanches correspondent aux bactéries ayant acquis un plasmide qui contient un insert disruptant le gène *lacZ'* au niveau du MCS. La complémentation n'a pas lieu et la β -galactosidase n'est donc pas fonctionnelle. Quand le test est bleu, la β -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. Remarquons que les bactéries sans plasmide meurent automatiquement sur le milieu de sélection faute du gène de résistance adéquat. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture lève la répression de l'expression de *lacZ'* en inhibant LacI, protéine se fixant sur le promoteur de *lacZ'*.

3. Conjugaison

Principe

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pilus sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert oriT vers une bactérie receveuse. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code l'ensemble des protéines nécessaires à ce transfert.

Méthode

Un petit volume de culture d'*E. coli* S17-1 donneuses transformées avec le plasmide d'intérêt sont mises en présence de *Brucella* receveuse. Le mélange est centrifugé (1 minute à 7000 rpm), le culot resuspendu (1ml 2YT), avant qu'une goutte ne soit déposée sur 2YTagar et incubée 4h à 37°C ou overnight à température ambiante. La deuxième solution donne une meilleure efficacité mais la première possibilité est suffisante pour le transfert de plasmides répliatifs. Pour un plasmide répliatif, après incubation, la goutte est striée sur un milieu sélectif 2YT Nal Antibiotique approprié au plasmide. Pour un plasmide suicide, la goutte est resuspendue dans 300 μl de 2YT avant d'en étaler 100 μl (billes) sur 3 boîtes portant un milieu sélectif. Les boîtes sont incubées 3-4 jours à 37°C.

4. PCR sur lysat bactérien

Principe

Cette technique a été utilisée pour valider des modifications génomiques chez *B. melitensis* 16M (construction de mutants et intégration de vecteurs suicides). Elle consiste à libérer de l'ADN génomique dans le surnageant suite à la centrifugation à haute vitesse d'une colonie resuspendue dans un petit volume de PBS, et à réaliser une PCR sur ce surnageant. Elle repose sur la sensibilité de la PCR et présente l'avantage de la rapidité, par rapport à une extraction d'ADN génomique.

Méthode

On resuspend une petite partie d'une colonie bactérienne d'intérêt dans un volume de 50 µl de PBS. Après centrifugation (5 minute à 10 000 rpm), une PCR utilisant les amorces adéquates est réalisée sur 1 µl du surnageant obtenu.

F. Techniques relatives à l'utilisation de levures.

1. Test d'interaction protéique en double hybride : crible d'une banque de cDNA.

Principe

Notre crible double-hybride repose sur la transformation de la banque dans une souche de levures qui contient déjà le plasmide contenant notre gène d'intérêt. On a suivi le protocole TRAF0¹⁶.

Méthode

- Préculture de la souche de *S. cerevisiae* transformée par le plasmide codant l'appât dans 100ml du milieu sélectif approprié (SD-certains acides aminés) qui maintient ce plasmide au sein de la souche pendant la croissance. Incubation overnight à 30°C
- Ensemencer une culture dans 300 ml de YPAD : dilution de la préculture pour obtenir une DO_{650nm} de 0,3.
- Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{650nm} de 0,7
- Centrifugation 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante.
- Verser le surnageant et resuspendre dans un volume d'eau stérile correspondant à la ½ du volume de culture (150ml).
- Centrifugation 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante.
- Verser le surnageant et resuspendre dans un volume de LiAc (100mM) correspondant à 1/50^{ème} du volume de culture (6ml).
- Récupérer 2x100µl dans deux eppendorfs pour les contrôles négatif et positif.
- Incubation 15 minutes à 30°C
- Centrifugation 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante.
- Verser le surnageant et resuspendre (en vortexant) dans le mix de transformation préparé extemporanément :

Mix de transformation		
	PEG 50%	14,40 ml
	LiAc 1M	2,16 ml
	ADN carrier (ADN de sperme de saumon) 10mg/ml	600 µl
	Banque de plasmide	100 µl

¹⁶ Le protocole est disponible à l'adresse suivante :
(<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/2HS.html>)

H ₂ O stérile	2,9 ml
--------------------------	--------

L'ADN de sperme de saumon est laissé 10 minutes dans l'eau bouillante avant utilisation.

- Incubation 30 minutes à 30°C
- Choc thermique : 45 minutes dans un bain-marie à 42°C. Inversion toutes les 5 minutes. (idem pour les contrôles)
- Centrifugation 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante (idem pour les contrôles).
- Resuspension du culot dans 18 ml d'H₂O sébile (300µl pour les contrôles).
- Etaler 100µl sur milieu sélectionnant les doubles transformants dans lesquels une interaction appât- proie a permis de reconstituer le transactivateur Gal4.(dans notre cas SD-L-W-H +3AT). Etaler les 300µl des contrôles sur milieu sélectif (dans notre cas, SD-L-W).
- Tester l'efficacité de transformation par la banque.

Réalisation des contrôles de transformation	CTL+	CTL-
PEG 50%	240µl	240µl
LiAc 1M	36µl	36µl
ADN carrier (ADN de sperme de saumon) 10mg/ml	5µl	5µl
Banque de plasmide	1µl pVV213 sans insert	-
H ₂ O stérile	69µl	70µl

Référence de la banque de plasmides de cDNA utilisée :

638821, BD Biosciences Clontech Human Leukocyte MATCHMAKER cDNA Library
 Unit BD Biosciences Clontech
 Name Human Leukocyte MATCHMAKER cDNA Library
 Regulatory Status RUO
 Catalog Number 638821

2. Minipréparation de plasmide de levures

Principe

Cette technique permet d'extraire l'ADN plasmidique de levure.

Méthode

- Préculture de 10ml dans un milieu sélectif overnight à 30°C.
- Transférer 4 ml de préculture en eppendorf et centrifuger quelques secondes à 14000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 200µl de tampon de lyse.
- Ajouter 200µl de billes de verre d'un diamètre de 425 à 600µm.
- Ajouter 200µl de phénol/chloroforme/ acide iso-amylque (pH7,8).
- Vortexer 5 fois 1 minute en laissant reposer sur glace entre chaque étape.
- Mettre sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase supérieure aqueuse.
- Précipiter l'ADN dans 2 volumes d'éthanol froid 70%.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 4°C.
- Retirer l'éthanol et sécher à la pompe à vide.
- Resuspendre dans 40 µl d'eau désionisée.

G. Techniques relatives à l'utilisation de cellules eucaryotes : transfection de cellules mammaliennes.

Principe

La transfection consiste à faire entrer de l'ADN exogène, dans notre cas, un plasmide, dans une cellule eucaryote, et à lui faire exprimer un gène porté par celui-ci. Pour protéger le plasmide de la dégradation, facilité son entrée dans la cellule et lui permettre d'atteindre le noyau, il est associé à un agent complexant l'ADN.

Méthode : préparation des cellules mammaliennes

Les cellules sont préparées à partir de flasques de cellules mammaliennes à sous-confluence. Elles sont décrochées par l'utilisation de trypsine et incubées 5 à 10 minutes à 37°C (5% CO₂). Elles sont récupérées grâce à 10 ml de RPMI complet (GIBCO® [Invitrogen]) dont le FCS inhibe la trypsine. La solution récoltée est centrifugée (10 minutes à 1000 rpm), le culot resuspendu dans 1 ml de RPMI complet et la densité de cellules est estimée par l'utilisation d'une chambre de comptage (cellule de Thomas). Une dilution est effectuée pour obtenir une densité de $8 \cdot 10^4$ cellules/ml ($2 \cdot 10^5$ cellules/ml pour les infections, cfr. point H). Si les cellules sont destinées à être observées en microscopie à fluorescence, des coverslips sont disposés au fond des puits d'une plaque, avant d'y répartir 500µl de la dilution de cellules. Dans le cas contraire, on n'utilise pas de coverslips. Les cellules sont incubées overnight à 37°C (5% CO₂).

Méthode : Transfection de cellules mammaliennes

Pour un pool de six puits, 7µg d'ADN sont mis en présence de 350µl d'OPTIMEM (GIBCO®) durant cinq minutes. On ajoute 10,5µl de superfect qui complexe l'ADN. On dilue ensuite les complexes transfectants en ajoutant 2,4ml de MEM. L'OPTIMEM et le MEM ne contiennent pas de sérum. On rince les cellules avec du PBS pour évacuer le sérum qui opsonise les agents de transfection, puis on dispose 400µl du mélange ADN-superfect dans chaque puits. L'internalisation dure trois heures, après quoi ce mélange est remplacé par 1ml de MEM contenant du FCS 10%, milieu riche qui permet aux cellules de récupérer.

H. Infection par *Brucella* spp

1. Infection de cellules hôtes

Principe

Cette technique permet de tester la virulence d'une souche de *Brucella* en condition d'infection ex-vivo, c'est-à-dire d'infection d'une monocouche de cellules hôtes. On utilise les macrophages bovins SV40.

Méthode

La préparation des cellules à infecter, à partir de flasques de macrophages bovins SV40 à sous-confluence a été décrite ci-dessus. En parallèle, onensemence 5 ml de 2YT (avec antibiotiques appropriés) de la souche infectante à tester. Le lendemain, on prend la DO_{600nm} de la préculture. Une DO de 1 équivaut à une culture de $3 \cdot 10^9$ bactéries par ml. On calcule le volume de préculture à ajouter à 5 ml de RPMI pour obtenir $6 \cdot 10^7$ bactéries par ml. On remplace le milieu des puits par 500 µl de RPMIensemencé. Etant donné que chaque puits contient $1 \cdot 10^5$ macrophages bovins SV40, la MOI est de 300 bactéries/cellules. Les bactéries sont mises en contact intime avec les cellules par une centrifugation des plaques à basse vitesse (10 minutes à 1200 rpm). On incuber 1 heure à 37°C (5% CO₂). Pendant ce temps, des dilutions (de 10 à 10⁷, dans du PBS pH 7,4) du RPMIensemencé à $6 \cdot 10^7$ bactéries/ml sont réalisées en plaque 96 puits, puis étalées sur boîtes 2YT. Celles-ci sont incubées 3 à 4 jours à 37°C avant que les CFUs ne soient comptées pour permettre de contrôler la MOI. Les cellules sont lavées au PBS avant que les bactéries extracellulaires soient éliminées, par mise en présence des cellules de RPMI additionné de gentamycine. Les cellules sont alors incubées le

temps désiré à 37°C (dans notre cas 1h ou 48h). Quand le temps imparti est écoulé, on lave les cellules au PBS.

- Si l'on souhaite récupérer les CFUs bactériens intracellulaires afin de les estimer, on traite les cellules au PBS Triton X-100 0,1% (10 minutes à température ambiante). Des dilutions du lysat (de 10^1 à 10^7) sont réalisées en plaque 96 puits, et certaines d'entre elles (souvent 10^5 , 10^6 et 10^7) sont étalées sur boîtes 2YT au râteau (ou course de gouttes). Après 3 à 4 jours d'incubation à 37°C, les CFUs bactériens sont comptés.
- Si l'on souhaite observer les cellules en microscopie à fluorescence, on fixe les cellules par la PFA 4%. On lave les cellules au PBS, et on transfère les coverslip's dans une plaque dont les puits sont remplis de PBS. Le marquage est expliqué au point I.

2. Infection de souris

Principe

Cette technique permet de tester la virulence d'une souche de *Brucella* in vivo en modèle murin. A différents temps post-infection, les CFUs sont récupérées dans la rate de l'animal avant d'être estimées par comptage de dilutions étalées sur 2YT (décrit dans ce travail), ou d'être analysée par FACS.

Méthode

Prendre la DO_{600nm} d'une préculture de la souche infectante à tester est mesurée pour calculer le volume de préculture à ajouter à 5 ml de RPMI pour obtenir $8 \cdot 10^4$ bactéries par ml. L'infection des souris est assurée par injection intrapéritonéale de 500 μ l de RPMI ensemencé. La dose infectante est donc de $4 \cdot 10^4$ CFUs bactériens. Après le temps d'infection déterminé (souvent 5 ou 21 jours), on récupère la rate, on la broye. On resuspend le broyat dans 2 ml de PBS Triton 0,1%, pour lyser les cellules eucaryotes et libérer les *Brucella*. On récupère la suspension, on réalise des dilutions (dans du PBS) sur plaque 96 puits qui sont ensuite étalées sur 2YT et incubées 3 à 4 jours à 37°C.

-Remarque- La dose infectante est contrôlée de la même manière que lors d'une infection de cellules hôtes.

I. Marquage immunocytochimique

Principe

Cette technique permet, entre autres, de révéler la présence ou l'absence d'une protéine et sa localisation cellulaire en utilisant un anticorps primaires liant spécifiquement celle-ci, puis un second anticorps couplé à une molécule fluorescente qui reconnaît le premier. Lorsque la cible de l'anticorps est intracellulaire, il faut perméabiliser les cellules.

Méthode

Dans une chambre noire saturée en eau, on retourne les coverslip's à marquer sur une goutte de 30 μ l de solution PBS + BSA 1% additionnée de l'anticorps primaire pendant 45 minutes. Les coverslip's sont ensuite lavés (PBS) dans la plaque 24 puits. De la même manière que précédemment, les coverslip's sont retournés sur une goutte de 30 μ l de solution PBS + BSA 1% additionnée de l'anticorps secondaire anti-anticorps couplé à l'Alexa fluor® 568 émettant dans des longueurs d'onde correspondant au rouge pendant 45 minutes. Les coverslip's sont de nouveau lavés au PBS dans la plaque 24 puits. Enfin, les coverslip's sont retournés sur lame en présence de moviol (milieu de montage), avant que ces dernières ne soient conservées à l'obscurité durant une période minimale de trois heures, puis observées en microscopie à fluorescence ou en microscopie confocale.

Bibliographie

Bibliographie

- Agniswamy, J., Lei, B., Musser, J. M. & Sun, P. D. Insight of host immune evasion mediated by two variants of group A Streptococcus Mac protein. *J Biol Chem* **279**, 52789-96 (2004).
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80 (2001).
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8 (2001).
- Allen, C. A., Adams, L. G. & Ficht, T. A. Transposon-derived Brucella abortus rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* **66**, 1008-16 (1998).
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L., Cookson, B. T., Logan, S. M. & Aderem, A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9247-52 (2005).
- Apostolopoulos, V. & McKenzie, I. F. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* **1**, 469-74 (2001).
- Balachandran, S., Roberts, P. C., Brown, L. E., Truong, H., Pattnaik, A. K., Archer, D. R. & Barber, G. N. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**, 129-41 (2000).
- Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56 (2006).
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-42 (2001).
- Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D. M. & Davies, D. R. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10976-80 (2005).
- Blander, J. M. & Medzhitov, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**, 1014-8 (2004).
- Boneca, I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **8**, 46-53 (2005).
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64 (2001).
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K. & O'Neill, L. A. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10162-7 (2000).
- Brown, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43 (2006).
- Brown, G. D. & Gordon, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-7 (2001).
- Caron, E., Peyrard, T., Kohler, S., Cabane, S., Liautard, J. P. & Dornand, J. Live Brucella spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun* **62**, 5267-74 (1994).
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56 (2003).

- Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J. P. Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1673-8 (2005).
- Choe, J., Kelker, M. S. & Wilson, I. A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-5 (2005).
- Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D. J., Li, G. C., Karin, M. & Raz, E. DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* **103**, 909-18 (2000).
- Cleary, P. P., Handley, J., Suvorov, A. N., Podbielski, A. & Ferrieri, P. Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes. *Infect Immun* **60**, 4239-44 (1992).
- Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K. & Neish, A. S. Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* **169**, 2846-50 (2002).
- Coombes, B. K., Valdez, Y. & Finlay, B. B. Evasive maneuvers by secreted bacterial proteins to avoid innate immune responses. *Curr Biol* **14**, R856-67 (2004).
- Cooper, N. R. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* **37**, 151-216 (1985).
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-7 (2005).
- Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J. M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**, 1151-61 (2005).
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-97 (2001).
- Diaz, A., Ferreira, A. & Sim, R. B. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J Immunol* **158**, 3779-86 (1997).
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31 (2004).
- Diez, E., Yaraghi, Z., MacKenzie, A. & Gros, P. The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with *Legionella pneumophila*. *J Immunol* **164**, 1470-7 (2000).
- Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. & Joiner, K. A. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1863-7 (1994).
- Ehlers, M. R. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* **2**, 289-94 (2000).
- Eisenschenk, F. C., Houle, J. J. & Hoffmann, E. M. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* **68**, 235-44 (1999).
- Ernst, R. K., Guina, T. & Miller, S. I. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* **3**, 1327-34 (2001).
- Finlay, B. B. & McFadden, G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**, 767-82 (2006).
- Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B. B. & Wright, S. D. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* **176**, 1665-71 (1992).

- Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y. & Ellisman, M. H. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503-7 (2002).
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**, 1107-17 (2003).
- Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-6 (1991).
- Gazzinelli, R. T., Ropert, C. & Campos, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* **201**, 9-25 (2004).
- Ghiran, I., Barbashov, S. F., Klickstein, L. B., Tas, S. W., Jensenius, J. C. & Nicholson-Weller, A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* **192**, 1797-808 (2000).
- Giambartolomei, G. H., Delpino, M. V., Cahanovich, M. E., Wallach, J. C., Baldi, P. C., Velikovskiy, C. A. & Fossati, C. A. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J Infect Dis* **186**, 252-9 (2002).
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584-7 (2003).
- Girardin, S. E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep* **2**, 736-42 (2001).
- Gough, P. J. & Gordon, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* **2**, 305-11 (2000).
- Greaves, D. R., Gough, P. J. & Gordon, S. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. *Curr Opin Lipidol* **9**, 425-32 (1998).
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P. & Dornand, J. In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* **68**, 342-51 (2000).
- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M. & Miller, S. I. Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. *Science* **276**, 250-3 (1997).
- Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M. & Wright, S. D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**, 269-77 (1994).
- Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M. & Raetz, C. R. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* **352**, 342-4 (1991).
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. & Bates, E. E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* **174**, 2942-50 (2005).
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-79 (1988).

- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. & Aderem, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-103 (2001).
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9 (2004).
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5 (2000).
- Herre, J., Marshall, A. S., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S. & Brown, G. D. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**, 4038-45 (2004).
- Hilleman, M. R. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**, 14560-6 (2004).
- Hochrein, H., Schlatter, B., O'Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M. & Wagner, H. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11416-21 (2004).
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U. & Beutler, B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-7 (2005).
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8 (1999).
- Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M. & Normark, S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **3**, 1033-40 (2002).
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-52 (1999).
- Hughes, D. A., Fraser, I. P. & Gordon, S. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol* **25**, 466-73 (1995).
- Inohara, Chamailard, McDonald, C. & Nunez, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* **74**, 355-83 (2005).
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. & Nunez, G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 5509-12 (2003).
- Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Murakami, S., Sano, H., Konishi, M., Akino, T. & Kuroki, Y. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**, 24315-20 (2002).
- Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13 (1989).
- Janeway, C. A., Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11-6 (1992).
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 (2002).
- Jebanathirajah, J. A., Peri, S. & Pandey, A. Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends Plant Sci* **7**, 388-91 (2002).

- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G. & Bauer, S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499 (2002).
- Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 979-87; quiz 988 (2006).
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. & Akira, S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-5 (2006).
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-22 (1999).
- Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **279**, 20044-8 (2004).
- Klickstein, L. B., Barbashov, S. F., Liu, T., Jack, R. M. & Nicholson-Weller, A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* **7**, 345-55 (1997).
- Knodler, L. A., Celli, J. & Finlay, B. B. Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 578-88 (2001).
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. & Flavell, R. A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-4 (2005).
- Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J. P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* **11**, 215-9 (2003).
- Kraiczy, P. & Wurzner, R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* **43**, 31-44 (2006).
- Krieger, M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* **8**, 275-80 (1997).
- Krieger, M. & Herz, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**, 601-37 (1994).
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M. & Colonna, M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107-19 (2004).
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S. & Colonna, M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433-7 (2004).
- Kufer, T. A., Fritz, J. H. & Philpott, D. J. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol* **13**, 381-8 (2005).
- Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J. C. & Gorvel, J. P. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* **8**, 401-13 (2006).
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-83 (1996).
- Lenz, L. L., Mohammadi, S., Geissler, A. & Portnoy, D. A. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12432-7 (2003).

- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-7 (2005).
- Liautard, J. P., Gross, A., Dornand, J. & Kohler, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* **12**, 197-206 (1996).
- Lien, E., Means, T. K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M. J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R. W., Ingalls, R. R. & Golenbock, D. T. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* **105**, 497-504 (2000).
- Luo, Z. Q. & Isberg, R. R. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 841-6 (2004).
- Martinon, F. & Tschopp, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**, 561-74 (2004).
- Martinon, F. & Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**, 447-54 (2005).
- McNearney, T. A., Odell, C., Holers, V. M., Spear, P. G. & Atkinson, J. P. Herpes simplex virus glycoproteins gC-1 and gC-2 bind to the third component of complement and provide protection against complement-mediated neutralization of viral infectivity. *J Exp Med* **166**, 1525-35 (1987).
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7 (1997).
- Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurzner, R., Hellwage, J., Meri, S. & Zipfel, P. F. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* **70**, 5185-92 (2002).
- Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* **3**, 119-28 (2003).
- Mold, C., Gresham, H. D. & Du Clos, T. W. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. *J Immunol* **166**, 1200-5 (2001).
- Naroeni, A. & Porte, F. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* **70**, 1640-4 (2002).
- Nepomuceno, R. R., Henschen-Edman, A. H., Burgess, W. H. & Tenner, A. J. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity* **6**, 119-29 (1997).
- Newman, R. M., Salunkhe, P., Godzik, A. & Reed, J. C. Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun* **74**, 594-601 (2006).
- Nicholson-Weller, A. & Klickstein, L. B. C1q-binding proteins and C1q receptors. *Curr Opin Immunol* **11**, 42-6 (1999).
- Nishiya, T. & DeFranco, A. L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 19008-17 (2004).
- Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R. & So, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol* **147**, 2240-7 (1991).
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & Ramuz, M. A homologue of the

- Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. *Mol Microbiol* **33**, 1210-20 (1999).
- O'Connell, R. M., Saha, S. K., Vaidya, S. A., Bruhn, K. W., Miranda, G. A., Zarnegar, B., Perry, A. K., Nguyen, B. O., Lane, T. F., Taniguchi, T., Miller, J. F. & Cheng, G. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* **200**, 437-45 (2004).
- Oda, K. & Kitano, H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0015 (2006).
- O'Neill, L. A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* **18**, 3-9 (2006).
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N. & Hippenstiel, S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**, 36426-32 (2004).
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. & Seed, B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* **58**, 95-101 (1989).
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B. & Dixon, J. E. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**, 1594-7 (2000).
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. & Aderem, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71 (2000).
- Pearce, E. J., Hall, B. F. & Sher, A. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *J Immunol* **144**, 2751-6 (1990).
- Pearson, A., Lux, A. & Krieger, M. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4056-60 (1995).
- Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T. & Gordon, S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun* **68**, 1953-63 (2000).
- Philpott, D. J. & Girardin, S. E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* **41**, 1099-108 (2004).
- Pieters, J. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol* **13**, 37-44 (2001).
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-8 (1998).
- Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041-7 (1999).
- Portnoy, D. A. Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol* **17**, 25-8 (2005).
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* **276**, 28309-13 (2001).

- Rahman, A., Burma, O., Felek, S. & Yekeler, H. Atrial septal defect presenting with Brucella endocarditis. *Scand J Infect Dis* **33**, 776-7 (2001).
- Ramadori, G. & Christ, B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* **19**, 141-55 (1999).
- Rittig, M. G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gemsa, D., Foulongne, V., Rouot, B. & Dornand, J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol* **74**, 1045-55 (2003).
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-93 (1998).
- Rodriguez-Zapata, M., Salmeron, I., Manzano, L., Salmeron, O. J., Prieto, A. & Alvarez-Mon, M. Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis. *Eur J Clin Invest* **26**, 136-40 (1996).
- Rosenberger, C. M. & Finlay, B. B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 385-96 (2003).
- Ross, G. D., Cain, J. A. & Lachmann, P. J. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* **134**, 3307-15 (1985).
- Ross, G. D., Reed, W., Dalzell, J. G., Becker, S. E. & Hogg, N. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *J Leukoc Biol* **51**, 109-17 (1992).
- Sacks, D. & Sher, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* **3**, 1041-7 (2002).
- Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S. & O'Brien, A. D. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* **69**, 5619-25 (2001).
- Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A. P., Koch, M. H., Rietschel, E. T. & Seydel, U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* **267**, 2008-13 (2000).
- Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-31 (1990).
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**, 17406-9 (1999).
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. & Kimoto, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777-82 (1999).
- Simone, M., McCullen, C. A., Stahl, L. E. & Binns, A. N. The carboxy-terminus of VirE2 from Agrobacterium tumefaciens is required for its transport to host cells by the virB-encoded type IV transport system. *Mol Microbiol* **41**, 1283-93 (2001).
- Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C. J., Aepfelbacher, M. & Heesemann, J. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **196**, 1017-24 (2002).

- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E. & Dower, S. K. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* **275**, 4670-8 (2000).
- Smith, G. C. & Jackson, S. P. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13**, 916-34 (1999).
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. & Aderem, A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-53 (2003).
- Spriggs, M. K., Hruby, D. E., Maliszewski, C. R., Pickup, D. J., Sims, J. E., Buller, R. M. & VanSlyke, J. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* **71**, 145-52 (1992).
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**, 1007-18 (2005).
- Stahl, P. D. & Ezekowitz, R. A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**, 50-5 (1998).
- Stoiber, H., Pinter, C., Siccardi, A. G., Clivio, A. & Dierich, M. P. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55). *J Exp Med* **183**, 307-10 (1996).
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. & Beutler, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3516-21 (2004).
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76 (2003).
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-51 (1999).
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T. & Akira, S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* **12**, 113-7 (2000).
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. & Wong, S. Y. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**, 3876-82 (2002).
- Ting, J. P. & Davis, B. K. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* **23**, 387-414 (2005).
- Tomlinson, S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* **5**, 83-9 (1993).
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C. & Boneca, I. G. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**, 1000-6 (2004).
- Tschopp, J., Martinon, F. & Burns, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 95-104 (2003).
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**, 825-52 (2002).

- Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A. & Simmons, R. M. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **106**, 2543-50 (2005).
- van der Laan, L. J., Dopp, E. A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C. D., Gordon, S., Tryggvason, K. & Kraal, G. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol* **162**, 939-47 (1999).
- van Velzen, A. G., Suzuki, H., Kodama, T. & van Berkel, T. J. The role of scavenger receptor class A in the adhesion of cells is dependent on cell type and cellular activation state. *Exp Cell Res* **250**, 264-71 (1999).
- Vavricka, S. R., Musch, M. W., Chang, J. E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T. S., Merlin, D., Schneewind, O. & Chang, E. B. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* **127**, 1401-9 (2004).
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J. & Ferrero, R. L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**, 1166-74 (2004).
- Willment, J. A., Marshall, A. S., Reid, D. M., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. & Brown, G. D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* **35**, 1539-47 (2005).
- Wong, P.M.C, Chung, S-W. A functional connection between RanGTP, NF- κ B and septic shock. *J. Biomed. Sci.* **10(5)**, 468-474 (2003)
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-3 (1990).
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L. & Tong, L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-5 (2000).
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. & Sher, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**, 1626-9 (2005).
- Yates, R. M. & Russell, D. G. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* **23**, 409-17 (2005).
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7 (2004).
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. & Golenbock, D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**, 1-5 (1999).
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. & Ghosh, S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-6 (2004).
- Zipfel, P. F. & Skerka, C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* **15**, 121-6 (1994).