

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Localisation subcellulaire de protéines fusionnées au fluorochrome mCherry chez *Brucella abortus* et *Escherichia coli*

Deghelt, Michaël

Award date:
2009

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

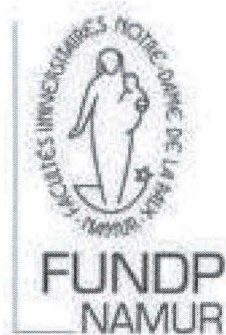
General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**Localisation subcellulaire de protéines fusionnées au fluorochrome mCherry
chez *Brucella abortus* et *Escherichia coli***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Michaël Deghelt

Janvier 2009

Localisation subcellulaire de protéines fusionnées au fluorochrome mCherry chez *Brucella abortus* et *Escherichia coli*

Errata

Veillez trouver ci-dessous la liste des erreurs relevées dans ce mémoire

- Au verso de la page 34, veuillez lire, à la place des légendes des figures 36 et 37, ce qui suit :

Figure 36 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique FumC-YFP produite à partir d'un plasmide pMR30*nat-fumC-yfp* à partir d'une souche d'*E. coli* S17-1 pKS-oriT-KanR-*pdhS-mCherry*. Micrographie en épifluorescence. À gauche, canal correspondant au TxRed. À droite, canal correspondant à l'YFP. La barre d'échelle représente 2µm.

Figure 37 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique FumA-YFP produite à partir d'un plasmide pMR30*nat-fumA-yfp* à partir d'une souche d'*E. coli* S17-1 pKS-oriT-KanR-*pdhS-mCherry*. Micrographie en épifluorescence. À gauche, canal correspondant au TxRed. À droite, canal correspondant à l'YFP. La barre d'échelle représente 2µm.

- Au verso de la page 35, veuillez lire, à la place des légendes des figures 38 et 39, ce qui suit :

Figure 38 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique FumC-YFP produite à partir du pMR30*nat-fumC-yfp* dans une souche S17-1 *E. coli*. À gauche, micrographie en DIC. À droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

Figure 39 : Visualisation de l'effet de la surexpression du gène *pdhS* produite à partir d'un plasmide pBBR dans une souche S17-1 *E. coli*. Micrographies en DIC. À gauche, pBBR vide. À droite, pBBR-*pdhS*. La barre d'échelle représente 2µm.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DE SCIENCE
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>

Localisations subcellulaires de protéines fusionnées au fluorochrome mCherry chez *Brucella abortus* et *Escherichia coli*

DEGHELT Michaël

Résumé

L' α -protéobactérie modèle *Caulobacter crescentus* possède un cycle cellulaire complexe entraînant la génération de différents organes polaires. Un mini réseau de régulation dynamique formé de deux histidines kinases (PleC et DivJ) et d'un régulateur de réponse (DivK) est impliqué dans la génération de l'asymétrie. L' α -protéobactérie étudiée au sein de notre laboratoire est *Brucella abortus* se divisant également de manière asymétrique. Des homologues de tous les acteurs impliqués dans l'asymétrie chez *C. crescentus* sont également présents chez *B. abortus*. De plus, un autre homologue, absent chez *C. crescentus*, de DivJ et PleC et potentiellement impliqué dans ce réseau de régulation est présent chez *B. abortus*. Cette histidine kinase supplémentaire fut nommée PdhS (PleC/DivJ-Homologous Sensor). PdhS est proposée, au contraire de $_{Ba}$ PleC et $_{Ba}$ DivJ, d'intervenir comme interactant potentiel de DivK chez *B. abortus*. PdhS interagit en test double hybride chez la levure avec une fumarase nommée FumC. Egalement, une fusion FumC-YFP colocalise avec la fusion PdhS-CFP au vieux pôle de la grande cellule de *B. abortus*.

L'une des hypothèses testée au cours de ce mémoire est liée à une caractéristique prédite de FumC, qui est une fumarase de classe II, d'être résistante aux chocs oxydatifs. Nous émettons l'hypothèse qu'une concentration élevée de ROS au vieux pôle (sénescence) pourrait être responsable d'une localisation polaire de FumC, caractéristique gardée au cours de l'évolution. Puisque ces ROS sont principalement produits par la chaîne de transport d'électrons, nous avons localisé les protéines de cette chaîne de transport d'électrons chez *B. abortus*. Pour vérifier cette hypothèse, des plasmides réplcatifs et intégratifs, compatibles au système Gateway® et permettant la fusion du gène codant pour la protéine fluorescente mCherry en amont ou aval d'une ORF d'intérêt ont été construits. L'observation des fusions protéiques à partir de vecteurs de surexpression a suggéré que cette chaîne de transport d'électrons ne localisait pas préférentiellement au pôle de la bactérie *B. abortus*. Puisque FumC fait potentiellement partie du cycle de Krebs, nous avons également testé la localisation intracellulaire des autres enzymes impliquées dans ce cycle. Cependant, nous avons été incapables de détecter une localisation préférentielle au vieux pôle de *B. abortus*.

Enfin, nous avons observé de manière inattendue que la fusion protéique PdhS-mCherry était capable de former des foci polaires chez *E. coli*. Nous avons proposé que ces foci ne représentent pas des agrégats contenant des protéines possédant une mauvaise conformation tridimensionnelle puisque la fusion PdhS-mCherry est capable de recruter la fusion protéique FumC-YFP au niveau de ces foci.

Mémoire de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: X. De Bolle

Remerciements

Travailler dans un labo tel que l'URBM n'est pas seulement effectuer un travail scientifique, c'est également tout un art de vivre ! Avoir passé une poignée de mois en votre compagnie fut, pour moi, un réel bonheur et une expérience inoubliable. Merci tout simplement à vous tous !

JVDH, XDB, JLL, JYM et EM, merci à vous de m'avoir fait découvrir la génétique. Je tiens, bien entendu à remercier le professeur Xavier de Bolle. A vous voir butiner à vos nombreuses taches comme une abeille dans une ruche grouillante, j'ai compris l'utilité des baskets à coussins d'air ! Merci la Diff team ! Dédé, seule fille parmi les mâles, tu m'as apporté une note de fantaisie et de fraîcheur très agréable. Johann, roi du calembour et de la contrepèterie. Ta culture n'a d'égale que ton penchant pour les paris (tu as perdu une fois !). Merci pour l'attention que tu m'as apportée et la remise en question continuelle que tu m'as imposée. Charles, Charles, Charles, mais bien sur que oui tu l'auras ta boîte de chocolat ;) Je voudrais te remercier pour tous ce que tu as fait pour moi, un dévouement sans faille et une présence plus que rassurante qui m'a fait découvrir la science, la vraie, celle qui se fait le dos courber sur une paillasse... « capharnaümique » !

Merci la QS team, les voisins de mon 2^{ème} bureau. Marie G, ton esprit totalement barré me fit plier en deux plus d'une fois. Juju le géant, merci pour l'attention si profonde que tu distilles autour de toi ! Pensées aux filles du bout du monde : Marie VDH, Aurore, Mira ; merci tout simplement ! Sophie, merci pour les pauses « d'en-bas ». La tête qui acquiesce, les yeux qui se ferment, pas de doute c'est Did ! Gégé, vive les moules (d'Ostende !) et les batailles sur FB ;) La remarque à deux balles ou à deux briques, un casque, une meule : clin d'œil à Ric ! Salut au petit bleu : Jack mon vrai-faux voisin de paillasse ! Salut aux croulants : Rose-Ma la folle, Cricri le flegmatique et Momo la naïve. Mais non...je rigole merci de contribuer à faire tourner ce labo ! Pensées aux GéMO ! My friend Bernard and Marie-Alice and Rosse-Marie. The crazy girl Anne-Michèle. A l'indéfectible trio Isa-Auré-France.

Maman Cécile, tu as toujours été là pour moi, tu t'es inquiétée de tous mes petits bobos, merci milles fois ! Merci pour les discussions « Pièce cellulaire ». Mon bon vieux Matt, tu t'es ramené dans ma vie pile poil quand il fallait ! Je ne saurais oublier les artistes que tu m'as présenté, notre cinéma d'auteur ou arboricole, un bon millier de barbecue et puis surtout ces discussions, jusqu'à plus d'heure chez le Kosovar ou au claire de lune, étrange mélange de mélancolie, de camaraderie et de blagues salaces ! Merci mon bon Matt, merci.

Merci aux mémorantes, mon « harem », d'avoir supporté les 95 kilos de débilité et d'instabilités mentales profondes dont le mâle de service que je suis est constitué...

Merci aux potes ! Et plus particulièrement au Kem&Co ! Merci d'avoir toujours fait semblant de comprendre ce que je racontais quand j'évoquais une certaine...Bruxellas arbotus...Merci les gars de faire partie de ma vie.

A ma famille, merci de vous soucier de moi comme vous le faites et de toujours m'encourager à aller plus loin. Maman, merci ! Merci pour tout ce que tu as porté de malheurs et de difficultés sur tes épaules pour m'amener là où j'en suis. Merci de m'avoir toujours soutenu que ce soit aux sommets des crêtes comme aux plus profondes abysses. Papa, j'espère juste que t'as été fier de moi, que je ne t'ai pas trop déçu... Je te dois tant...

Merci à toi, minuscule bout de vie d'1 μm qui a faillit m'envahir par trois fois ! *Brucella*, j'espère que tu crèveras avant moi !

Très chères membres du jury, bonne lecture !

Liste des abréviations utilisées

Abréviations	Nom complet	Explications supplémentaires
A	Adénine	Acide aminé
CDS	Coding sequence	Séquence codante
DIC	Contraste	Mode d'observation en microscopie électronique
DO	Densité optique	Mesure, entre autre, le nombre de bactéries
CFP	Cyan fluorescent protein	Protéine fluorescente émettant dans le cyan
GFP	Green fluorescent protein	Protéine fluorescente émettant dans le vert
GW	Gateway®	Technique de clonage par recombinaison
H	Histidine	Acide aminé
HK	Histidine kinase	Acteur du système à deux composants
<i>kanR</i>	phosphotransférase	Gène de résistance à la kanamycine
Kb	Kilopaires de base	1000 paires de bases nucléotidiques
KDa	Kilo Daltons	Unité de poids moléculaire correspondant à la masse d'un atome d'hydrogène.
LB	Luria Bertani	Milieu de culture riche pour bactéries
MCS	Multiple cloning site	Site multiple de clonage
Nours	Nourséothricine	Antibiotique
ORF	Open Reading Frame	Phase ouverte de lecture d'un gène
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique d'amplification de fragments d'ADN
ROS	Reactive oxygen species	Espèces réactives à l'oxygène
rpm	Rotation par minutes	Unité de centrifugation
RR	Régulateur de réponse	Acteur du système à deux composants
<i>spp.</i>	species	Se réfère à l'espèce entière
T	Thymine	Acide aminé
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente émettant dans le jaune

Tables des matières

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION.....	2
ADAPTABILITE BACTERIENNE.....	2
• De l'origine de la vie.....	2
• Notions d'évolution et d'adaptation.....	2
• Focus sur les alpha-proteobactéries (Batut et al., 2004).....	2
REPONSES AUX SIGNAUX : LES MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES.....	4
• Senseurs du milieu.....	4
• Les histidines kinases (Masher et al., 2006).....	5
CAULOBACTER CRESCENTUS, LA REFERENCE.....	5
• Cellule pédonculée et nageuse : l'un reste, l'autre part.....	6
• PleC, DivJ, DivK : le mini-réseau dynamique. (Fig7 et Fig8).....	7
POLARITE.....	8
• Implication du peptidoglycan dans la polarité (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005).....	9
• PodJ et TipN : l'ancre et le phare.....	10
• Quand la symétrie fait place à l'asymétrie.....	11
B. ABORTUS, L'ENNEMI MECONNU.....	11
• PleC, DivJ, DivK chez B. abortus : la rupture.....	12
• PdhS, le nouveau venu.....	12
• Les relations intimes de PdhS.....	13
LES FUMARASES.....	14
• Régulation.....	14
• Les fumarases de B. abortus.....	15
OBJECTIFS DU MEMOIRE.....	16
RESULTATS ET DISCUSSIONS	17
CONSTRUCTION DE VECTEURS.....	17
• Stratégie de constructions des vecteurs pour l'obtention de fusions de mCherry au début d'une ORF (Fig16).	17
• Stratégies de constructions des vecteurs pour l'obtention de fusions de mCherry en aval d'une ORF (Fig16).	19
• Vérification des vecteurs	21
TESTER LES HYPOTHESES	29
• Localisation de protéines de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs	29
Diversité des pools.....	33
• Vérification de la diversité et de la stabilité des fusions	34
LOCALISATION DES VECTEURS CHEZ ESCHERICHIA COLI.....	35
DISCUSSIONS.....	36
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	39
MATERIELS ET METHODES.....	43
SOUCHES ET PLASMIDES	43
• Souches.....	43
• Plasmides	43
MILIEUX DE CULTURE.....	44
TAMPONS & SOLUTIONS.....	44
TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION D'ADN.....	45
• PCR (Polymerase chain reaction).....	45
• Electrophorèse sur gel d'agarose	46
• Fabrication du gel	47
• Restrictions et ligations	47
• Purification sur colonne.....	48

• <i>Extraction d'ADN plasmidique</i>	48
• <i>Séquençage</i>	49
• <i>Clonage Gateway®</i>	50
<i>TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DE BACTERIES</i>	52
• <i>Préparation de cellules Escherichia coli électro-compétentes (DH10B/S17-1)</i>	52
• <i>Conjugaison bactérienne</i>	53
<i>TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES</i>	54
• <i>Analyse de l'expression d'une protéine par Western blot</i>	54
<i>TECHNIQUES RELATIVES À LA MICROSCOPIE</i>	57
• <i>Appareillage</i>	57
• <i>Préparation d'échantillons pour la microscopie</i>	57
BIBLIOGRAPHIE	58

« Nos bagages cabossés étaient de nouveau empilés sur le trottoir ; nous avions encore bien du chemin à faire. Mais qu'importait, la route, c'est la vie. »

Jack Kerouac : *Sur la route*

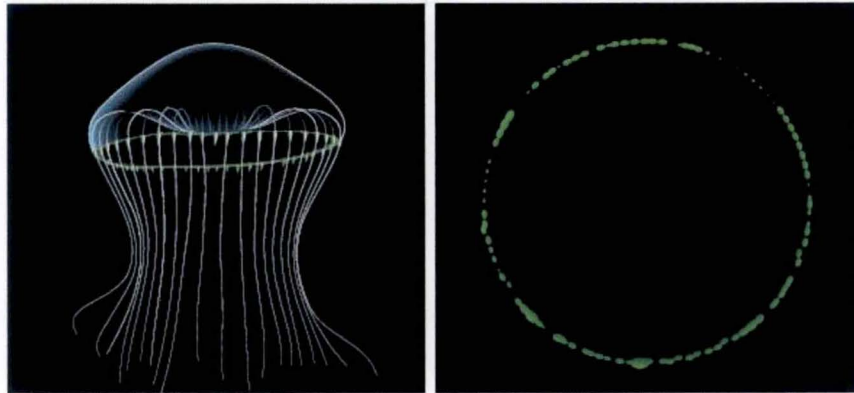


Figure 1 : Représentation de la méduse *Aequorea victoria*. A droite, vue de l'organe fluorescente se situant sur le bord du « parapluie » de la méduse.

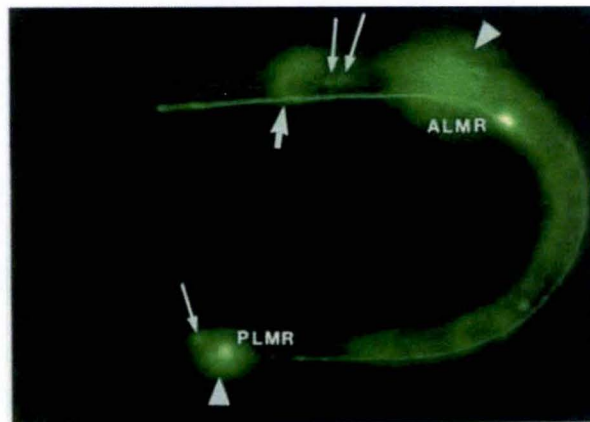


Figure 2 : Expression de la protéine fluorescente GFP chez une larve de *C. elegans* (Chalfie *et al.*, 1994). ALMR et PLMR correspondent aux deux récepteurs neuronaux marqués par la GFP. La flèche épaisse indique les cellules nerveuses branchées en anneaux. Les flèches fines indiquent les corps cellulaires de faible fluorescence. Les têtes de flèches indiquent les halos de fluorescence produits par les autres cellules situées hors-champ.

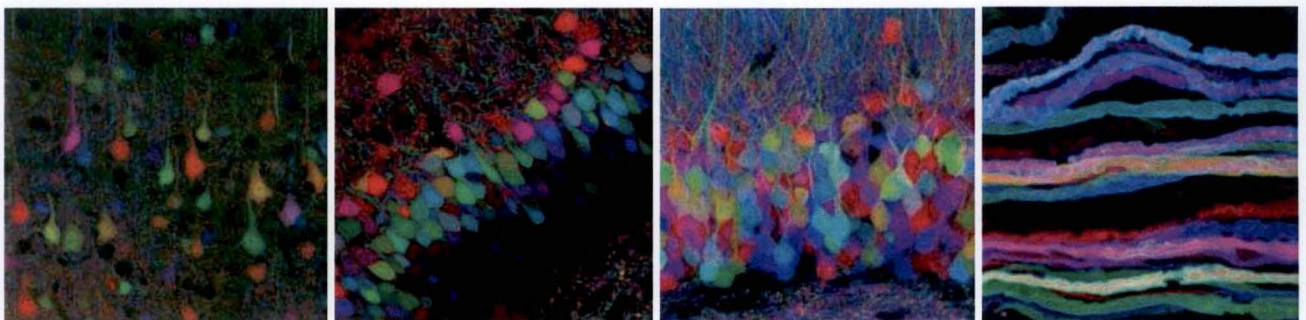


Figure 3 : Observation de cellules nerveuses de souris émettant chacune une couleur différente en fluorescence via la production en rapport différents de trois protéines fluorescentes (Livet *et al.*, 2007)

Avant-propos

Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien : Allumeurs du vivant

Le prix Nobel de chimie 2008 a été attribué, à l'instar de nombreux prix Nobel de médecine, à des biologistes moléculaires. La découverte et l'amélioration *in vitro* de protéines fluorescentes chez la méduse *Aequorea victoria* ayant obtenu la récompense suprême s'est produite il y a une cinquantaine d'années (**Fig1**). Depuis lors, la GFP et ses dérivés sont devenus des outils indispensables pour le traçage de protéines intracellulaires. En effet, ces protéines permettent notamment l'étude de l'expression de gènes, de localisation de protéines, d'interactions protéiques, de division cellulaire, de la réplication et l'organisation de chromosomes, les voies de transports intracellulaires et la biogenèse et l'héritage d'organelles. La propriété tant convoitée de fluorescence des GFP et autres variant réside dans le chromophore qu'elles portent. Ce chromophore est composé d'une hélice α très proche du centre de la protéine de forme cylindrique du aux tonneaux β . Suite à l'excitation de ce chromophore par des longueurs d'ondes se situant dans les ultra-violet, cette protéine va émettre de la fluorescence.

Dans les années 50, Osamu Shimomura s'intéresse à l'étrange particularité *Aequorea victoria*, une méduse américaine émettant une lumière bleue-verte. S'afférant à isoler l'agent responsable de la lumière, Shimomura, par des techniques rudimentaires, va réussir à isoler le composé lumineux non sans avoir haché 10 000 *Aequorea victoria*. L'aequorine, le composé lumineux, émet de la lumière lorsque celui-ci se trouve en présence de calcium. Cependant, le scientifique remarque la présence d'un autre composé lumineux, fluorescent celui-là, en concentration très faible participant également à la luminescence émise par la méduse nommé Green Fluorescent Protein (GFP). La découverte de cette protéine fut rendue possible grâce aux milliers de méduses sacrifiées. En effet, la GFP se trouvait en concentration si faible qu'elle n'aurait pas été décelée si Shimomura n'avait pas prélevé tant de spécimens. Dans les années 70, le chercheur Japonais comprend que la GFP utilise les longueurs d'ondes émises par l'aequorine pour son excitation.

En 1988, Martin Chalfie comprend l'avenir prometteur de la protéine GFP et décide de l'utiliser comme mouchard pour détecter la présence de protéines chez son organisme favori, *Caenorhabditis elegans*. Isolant le gène codant pour la GFP, il va l'introduire dans une *Escherichia coli*, devenant ainsi la toute première bactérie luminescente. Encouragé par cette réussite, il va cloner le gène *gfp* (codant pour la protéine GFP) derrière un promoteur activant des gènes codant pour des récepteurs neuronaux dans des cellules neuronales de *C. elegans* (**Fig2**). Victoire ! Publié dans Science, l'image montrant la fluorescence de la GFP chez le nématode sonnera le début d'une nouvelle intrigue pour les chercheurs : la localisation de protéines ou d'organelles chez des organismes vivants et ce, via l'utilisation de la fluorescence.

Prenant le train en marche, Roger Y. Tsien développera toute une série de nouvelles protéines fluorescentes émettant différentes couleurs, découvertes chez d'autres espèces vivantes. Manipulant les gènes codant pour les protéines fluorescentes à sa guise, Tsien va améliorer leurs caractéristiques. Chez la souris, les cellules nerveuses du cerveau furent modifiées de manière à exprimer différemment trois gènes encodant trois protéines fluorescentes émettant dans le jaune, le cyan et le rouge. Le résultat fut étonnant, chaque fibre nerveuse émettait dans une couleur différente permettant de suivre chacune d'elle indépendamment dans la toile tissée par ces fibres. L'expérience fut appelée « the brainbow » (**Fig3**).

Introduction

Introduction

Adaptabilité bactérienne

- **De l'origine de la vie**

L'éclosion de la vie sur terre a débuté il y a quelques milliards d'années sous une forme bactérienne et a proliféré jusque dans les moindres recoins de la planète. Les bactéries ont su, grâce à la modification de leurs génomes, sortir de l'élément liquide et peupler les zones les plus diversifiées. En effet, on peut retrouver de la vie bactérienne sous des pressions colossales, à des températures dépassant le point d'ébullition de l'eau et dans des conditions physiologiques où aucune autre espèce ne pourrait survivre (Bartlett, 1999 ; Mesbah and Wiegel, 2008 ; Stetter, 2006).

- **Notions d'évolution et d'adaptation**

Le fait d'investir un nouvel environnement implique à l'espèce colonisatrice de pouvoir s'adapter aux conditions de celui-ci. L'adaptation passe par des étapes d'acquisition de compétences indispensables à la survie des organismes dans les nouvelles conditions de vie. L'évolution, qui est une modification d'espèces vivantes au cours du temps, est la clé de cette adaptation. En effet, l'acquisition de certaines mutations au niveau du génome d'une espèce se transmettant et s'additionnant au cours du temps va entraîner des modifications génétiques permettant l'adaptation de l'espèce. En ce qui concerne les bactéries, l'effet cumulé de ces mutations va générer une augmentation du fitness bactérien lui permettant l'amélioration continue des fonctions de ses gènes. De nouveaux caractères peuvent même apparaître et vont être sélectionnés et conservés à condition qu'ils favorisent la survie et/ou la reproduction de l'espèce. L'apparition de ces nouvelles fonctions va entraîner un métissage au sein d'une même espèce lui permettant d'envahir de nouveaux territoires. Si ce métissage augmente de façon considérable, une scission entre les individus s'opère donnant lieu à l'établissement de plusieurs espèces distinctes.

- **Focus sur les alpha-proteobactéries** (Batut et al., 2004)

De toutes les sous-classes que comptent les bactéries, celle des α -protéobactéries est sans nul doute l'une des plus fascinantes car elle regroupe toute une série d'espèces aux modes de vie variés. Les α -protéobactéries se distinguent notamment via les interactions qu'elles ont su tisser avec de nombreuses espèces eucaryotes. En effet, que ce soit via des relations de symbiose ou de parasitisme, ce groupe a colonisé notamment des arthropodes (Rickettsiae), des mammifères (Bartonellae), des plantes aquatiques (*C. crescentus*) ainsi que des végétaux supérieurs (*Agrobacterium tumefaciens*) (Batut et al., 2004).

Le terme Protéobactéries vient du grec « Protée », dieu grec qui avait la capacité de changer de forme à volonté, traduisant ainsi l'extraordinaire diversité de ce groupe. Bien que les bactéries

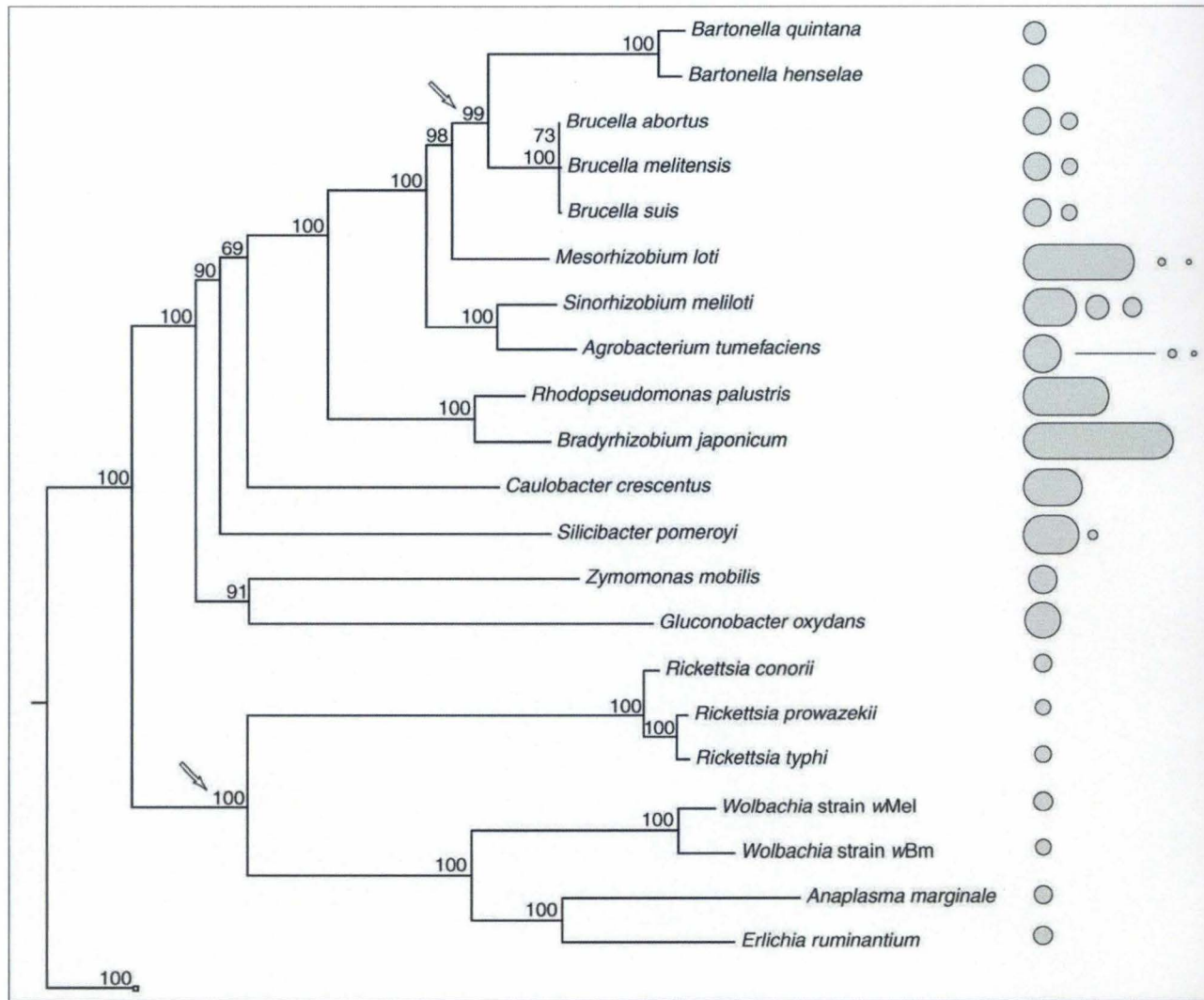


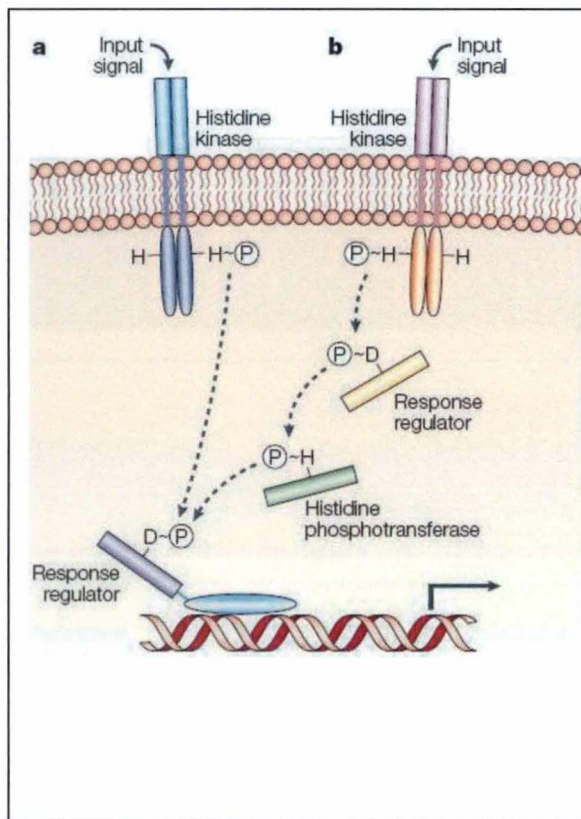
Figure 4 : Arbre phylogénétique présentant la lignée des α -protéobactéries ainsi que la distribution de leurs réplicons. Les espèces présentes sur cet arbre correspondent aux α -protéobactéries dont le génome a entièrement été séquencé à ce jour. Le graphique de droite représente la taille ainsi que l'organisation des réplicons pour chacune des espèces. Les flèches blanches représentent les nœuds de séparation où les réductions du génome ont été les plus importantes (Sällström et al., 2005).

faisant parties des α -protéobactéries soient liées entre elles de par l'homologie qu'elles partagent au niveau des séquences en acides aminés (aa) présentes dans leur génome, elles se distinguent les unes des autres par toutes sortes de critères cités ci-dessous. Les types de relation que les bactéries établissent avec leurs hôtes sont très variables d'une α -protéobactérie à une autre. Le terme « infection » peut être utilisé pour décrire les interactions établies entre les bactéries et leurs hôtes eucaryotes (Batut et al., 2004). Les α -protéobactéries ont sélectionnées des stratégies pour pénétrer, se maintenir et proliférer à l'intérieur de l'hôte eucaryote et entretenir avec eux différents types de relation. Un des types de liens établis est la relation symbiotique apportant à chacune des parties les moyens de réaliser des fonctions qu'elle n'aurait pu effectuer si elles avaient été seules. Une autre relation établie est le parasitisme. La colonisation d'un eucaryote par un parasite procaryote peut donner lieu à l'établissement d'infections chroniques. L'intérêt du microorganisme envahisseur n'est pas de tuer l'hôte mais de l'utiliser en vue de générer un environnement adéquat à sa prolifération (Batut et al., 2004).

Ces relations eucaryotes-procaryotes influencent indirectement la taille des différents génomes de ce groupe qui peut varier de 1.1 Mb jusqu'à 9.1 Mb (Fig4). En ce qui concerne les bactéries intracellulaires obligatoires par exemple, tous les mécanismes génétiques visant l'adaptabilité de ces bactéries dans des environnements qu'elles ne rencontrent plus deviennent inutiles et représentent même un fardeau à transporter, à répliquer et à entretenir. On observe également que toutes les α -protéobactéries, qui sont pourtant phylogénétiquement proches, se distinguent notamment par la structure de leur génome. En effet, certaines de ces espèces ne possèdent qu'un seul chromosome tandis que d'autres en possèdent plusieurs (Fig4). La présence, chez certaines bactéries de plus d'un chromosome a pu se produire suite à la fragmentation d'un unique chromosome en plusieurs réplicons, de la division d'un chromosome en deux plus petit, de la différenciation de deux chromosomes identiques accumulant chacun des mutations différentes ou encore de l'intégration d'éléments génétiques mobiles, tel que les plasmides, au niveau d'un chromosome (Moreno, 1998). Les différences observées au niveau de la répartition de la taille des génomes et de leur organisation est fortement dépendante de l'environnement dans lequel les espèces bactériennes évoluent montrant ainsi une énorme plasticité au niveau du génome des α -protéobactéries (Sällström and Andersson, 2005).

Les α -protéobactéries vivant en symbiose sont généralement décrites dans la littérature comme celles colonisant très régulièrement les espèces végétales. Ces espèces possèdent un génome important qui est le reflet du bagage génétique que celles-ci doivent emporter avec elles pour s'adapter aux différents milieux rencontrés ainsi qu'aux fluctuations de ceux-ci. En effet, ces α -protéobactéries se développent au niveau du sol, environnement extrêmement hétéroclite soumis à des conditions variables aussi bien temporellement que spatialement (Moreno, 1998).

Au contraire des êtres symbiotiques, les bactéries se développant au sein de cellules animales sont généralement décrites comme des parasites cherchant à mettre à profit les cellules eucaryotes pour permettre leur prolifération. Un procaryote envahissant une cellule eucaryote va être confronté aux mécanismes mis en place par la cellule pour l'empêcher de pénétrer. Les systèmes de défense des eucaryotes impliquent notamment des phagocytes utilisant des systèmes antimicrobiens variés (Batut et al., 2004). Les burst oxydatifs générés par ces phagocytes produisent des radicaux libres ainsi que des dérivés azotés possédant un effet bactéricide. Après phagocytose, les bactéries se retrouvent également enfermées dans une vacuole, le phagosome, qui va être acidifié par l'intermédiaire de pompes à protons générant un abaissement drastique du pH au niveau de ce compartiment. Ensuite ce phagosome peut fusionner avec un lysosome menant à la dégradation du pathogène. Pour pouvoir survivre à



Le système à deux composants permet la transduction d'un signal à travers des membranes biologiques par l'intermédiaire de transferts d'un groupement phosphate agissant comme relayeur de l'information ^(Jenal, 2000).

Ce système est constitué d'une protéine senseur histidine kinase (HK) possédant un domaine transmembranaire et d'un régulateur de réponse (RR) impliqué dans des modifications d'expression de gènes.

Le côté N-terminal de l'HK possède un domaine d'entrée du signal qui va être perçu via la liaison d'une molécule signal ou par une interaction physique avec un stimulus. Ce signal va générer des modifications conformationnelles au niveau de l'HK. Ces modifications vont alors engendrer son autophosphorylation au niveau d'une histidine conservée du domaine de transmission du signal. Ce domaine de transmission de l'HK va transférer le groupement phosphate de l'histidine de la kinase au niveau d'un résidu aspartate conservé du régulateur de réponse. Cette activation va donner lieu à une réponse cellulaire appropriée, effectuée par le domaine C-terminale du RR agissant au niveau de l'expression de gènes. Finalement, une étape de déphosphorylation du RR va être nécessaire de manière à garantir un retour du RR au niveau d'un état de pré-activation. L'activité d'un régulateur de réponse dépend principalement de son taux de phosphorylation.

Box 1 : Illustration du système à deux composants. En a, système à deux composants où le transfert du groupement phosphate se réalise d'une histidine kinase à un régulateur de réponse suite à un signal d'entrée. Un système d'intermédiaires multiples de transferts du phosphate existe également (voir b). Le groupement phosphate est transféré de l'histidine kinase vers un régulateur de réponse. Ensuite, le régulateur de réponse transfère le groupement phosphate à une histidine phosphotransférase qui le transfère ensuite au second régulateur de réponse qui est impliqué dans la régulation génique. H : Histidine, D : Aspartate, P : groupement phosphate ^(Skerker and Laub, 2004).

ces mécanismes, les bactéries ont développé des stratégies d'évitement (Batut et al., 2004 ; Celli, 2006). Ces stratégies visent notamment à sortir du phagosome ou à empêcher sa fusion avec le lysosome, à empêcher les attaques microbiennes ou à posséder des mécanismes de résistance face à ces attaques mais aussi à perturber la voie de leur propre internalisation au sein de la cellule eucaryote. Ces bactéries ont vu leur génome se réduire considérablement au fil de l'évolution. En plus de cette réduction du génome, on dénote la présence de pseudogènes chez certaines espèces tels que *Rickettsia prowazekii*. Les pseudogènes sont des séquences anciennement codantes mais qui, par l'accumulation de mutations délétères, ont perdu leur rôle de gène. Chez *Rickettsia prowazekii*, 24% du génome n'est pas exprimé sur un total atteignant seulement 1.1 Mb (Batut et al., 2004). Cette drastique réduction de taille s'explique par le fait que ces espèces intracellulaires vivent en vase clos à l'intérieur de leurs hôtes. Ces gènes ne subissent plus la pression de sélection et une tolérance à l'accumulation de mutations s'installe. Le gène va disparaître progressivement du génome au fur et à mesure de l'accumulation des mutations ou par une délétion totale ou partielle de ce gène. De plus, certains gènes encodant des protéines utiles pour la bactérie sont en voie de disparition car ces protéines sont déjà présentes et prêtes à l'emploi au sein même de l'hôte. Cette particularité est d'ailleurs observée au niveau du gène *metK* chez les Rickettsiales encodant la S-adénosyl-méthionine (SAM) synthétase (Sällström and Andersson, 2005). En effet, *Rickettsia* a mis au point un mécanisme d'importation de cette protéine qui se trouve au niveau du cytoplasme de son hôte et ne nécessite donc plus la présence de ce gène au niveau de son propre génome (Sällström and Andersson, 2005).

Le cas extrême d'une relation intracellulaire obligatoire, à partir d'une α -protéobactérie, est le cas des mitochondries, fournisseurs de la majorité de l'ATP aux cellules eucaryotes supérieures. En effet, des analyses phylogénétiques basées sur l'ARN ribosomique indiquent que les mitochondries dérivent probablement des α -protéobactéries et plus particulièrement du genre *Rickettsia* (Andersson et al., 1998). En effet, plus de 150 gènes mitochondriaux encodés dans le noyau eucaryote possèdent des homologues au niveau de séquences de *Rickettsia prowazekii*. De plus, les mitochondries et *R. prowazekii* partagent des similitudes au niveau des gènes impliqués dans la production d'ATP, dans le cycle de Krebs, dans les différents complexes de la chaîne de transport d'électrons et dans l'ATP synthase (Andersson et al., 2005). Ces observations suggèrent que les mitochondries et *Rickettsia* partagent un ancêtre commun devant être une α -protéobactérie. Après leur spéciation respective, la réduction de leur génome s'est produite de manière indépendante dans les deux lignées. Au niveau des mitochondries, un important transfert de gènes mitochondriaux au niveau du noyau de la cellule eucaryote hôte s'est déroulé conduisant à une diminution de la taille du génome mitochondrial ainsi qu'à une stabilisation de la domestication du procaryote par l'hôte eucaryote (Batut et al., 2004).

Réponses aux signaux : Les modifications transcriptionnelles

- **Senseurs du milieu**

L'évolution d'une espèce se déroule suivant les modifications de l'environnement dans lequel elle doit survivre et se développer. La survie d'une bactérie va dépendre de sa capacité

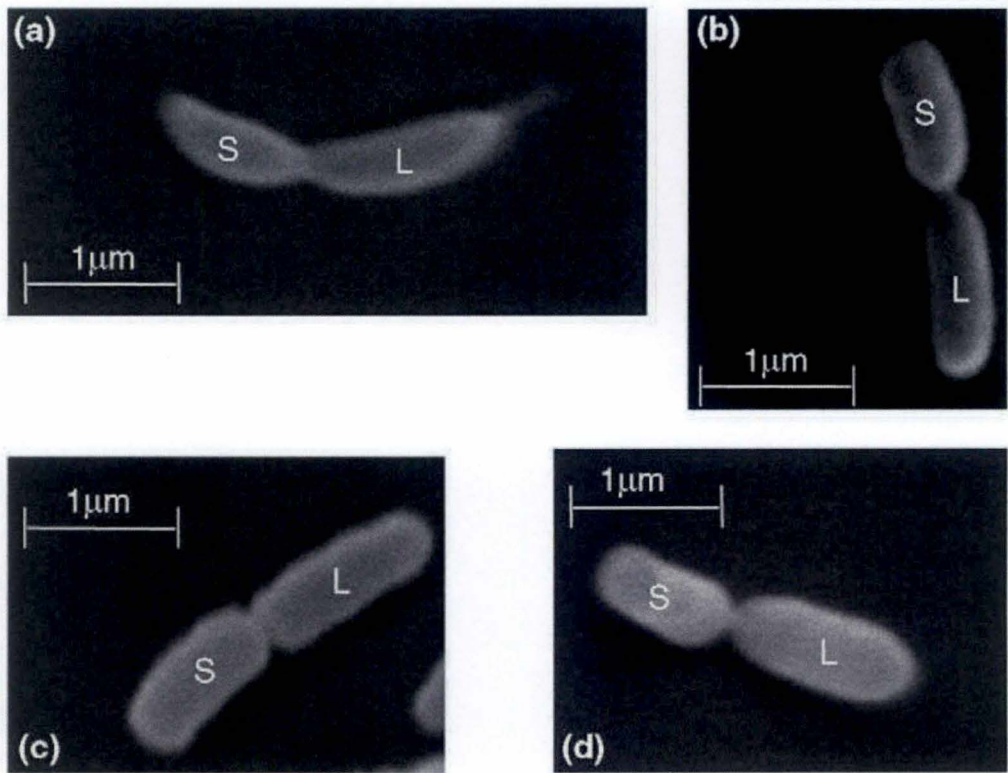


Figure 5 : Micrographies en microscopie électronique à balayage montrant l'asymétrie de quatre espèces d' α -protéobactéries. Pour chacune de ces espèces, une grande cellule (L : large) ainsi qu'une petite (S : small) sont visibles. A) *C. crescentus*, B) *B. abortus*, C) *Sinorhizobium meliloti*, D) *Agrobacterium tumefaciens* ^(Hallez et al., 2004). La barre d'échelle représente 1 μm .

température, la concentration en nutriments ou encore l'osmolarité^(Masher et al., 2006). Il est donc indispensable, pour les bactéries, de disposer d'un système fiable et précis indiquant les moindres changements de conditions se produisant au sein de la bactérie ou au niveau de sa niche écologique^(Mascher et al., 2006). Néanmoins, ce système doit garder une certaine plasticité lui permettant de s'adapter à l'apparition de nouveaux signaux. Un mécanisme de transduction du signal utilisant des signaux à deux composants va permettre de générer une réponse cellulaire suite à la perception d'un stimulus indiquant une variation dans le milieu (**Box1**).

- **Les histidines kinases** ^(Masher et al., 2006)

On observe une importante diversité au niveau des histidines kinases (HK) reflétant la nécessité de sentir différents types de stimuli. Généralement, on distingue trois groupes d'HK. Le premier groupe est constitué d'HK possédant le domaine senseur du côté extracellulaire et comportant au minimum deux domaines transmembranaires permettant l'insertion en membrane tandis que le domaine kinase se trouve du côté cytoplasmique de la cellule. Ce premier groupe, qui est le plus imposant, est constitué de senseurs de solutés et de nutriments.

Le domaine senseur des HK faisant partie du deuxième groupe se trouve, quant à lui, au niveau de la région transmembranaire. Celles-ci possèdent de nombreux segments transmembranaires. Les stimuli perçus sont soit associés à la membrane ou soit se produisent directement dans la membrane, tels que les gradients électrochimiques ou ioniques.

Le dernier groupe est composé d'HK situées du côté cytoplasmique de la bactérie. Elles sont soit ancrées au niveau de la face interne de la membrane cellulaire ou bien libres au niveau du cytoplasme. Ce dernier type d'HK est spécialisé dans la perception de signaux internes à la bactérie impliqués dans le métabolisme, le développement ou le cycle cellulaire, mais aussi dans la perception des senseurs d'O₂ ou d'H₂.

Notons qu'un système de transduction du signal à deux composants peut également contrôler l'organisation interne de la bactérie ainsi que le déroulement des processus périodiques impliqués dans le cycle cellulaire^(Jenal, 2000). *Caulobacter crescentus* peut contrôler son organisation interne et coordonner les processus de développement et de réplication de l'ADN par l'intermédiaire d'un système de transduction influencé notamment par l'environnement interne de la bactérie.

***Caulobacter crescentus*, la référence**

Un critère que partagent certaines α -protéobactéries est basé sur leur division. En effet, *C. crescentus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* et *B. abortus* se divisent de manière asymétrique (**Fig5**)^(Lam et al., 2003 ; Hallez et al., 2004). Cela signifie qu'une cellule mère va générer deux cellules filles ayant hérité de la même base génomique mais présentant des morphologies différentes. Ce mode de division particulier qui est pourtant commun à de nombreuses α -protéobactéries est probablement dû à des mécanismes communs entre ces différentes bactéries assurant la position excentrée de l'appareil de division produisant deux cellules de tailles différentes^(Hallez et al., 2004). Le modèle type concernant l'étude de la division asymétrique des α -protéobactéries est *C. crescentus*. Bien que *C. crescentus* soit non-pathogène, l'identification des gènes impliqués dans le cycle cellulaire de *C. crescentus*

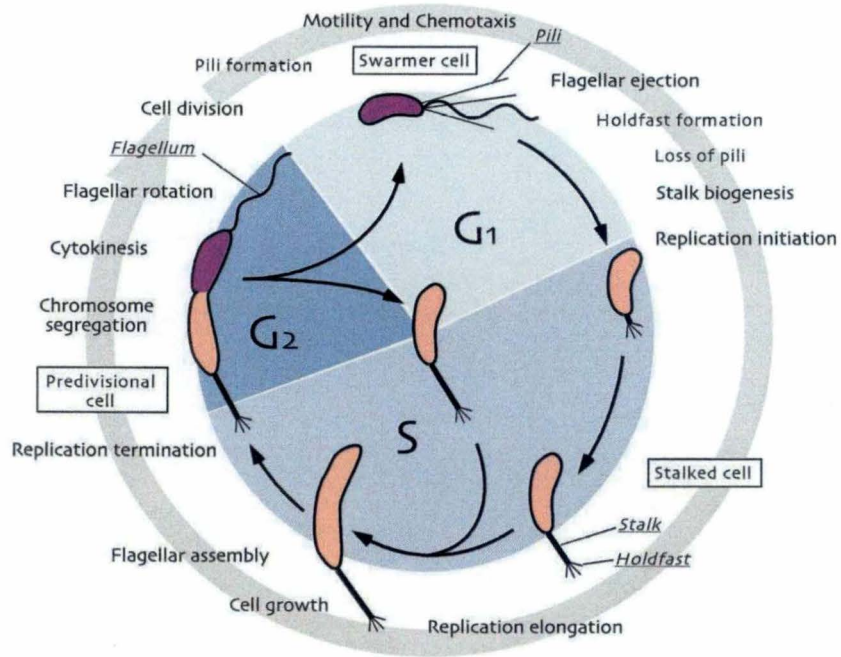


Figure 6 : Schéma du cycle de vie de *C. crescentus*. La cellule swarmer (nageuse), la cellule stalked (pédonculée) ainsi que la cellule prédivisionnelle sont présentées en encadré. Les différents appendices sont soulignés. La flèche circulaire indique la chronicité des événements. G1, S et G2 représentent les phases du cycle cellulaire (Jenal, 2000).

permet sans conteste l'identification de nouvelles cibles pour la découverte de traitements antibactériens (Skerker and Laub, 2004).

• Cellule pédonculée et nageuse : l'un reste, l'autre part

De part une division asymétrique, *C. crescentus* génère, après division, deux types de cellules morphologiquement et physiologiquement distinctes possédant des destins cellulaires différents (Fig6). Ces deux types de cellules possèdent une asymétrie morphologique en corrélation avec une asymétrie fonctionnelle. Une cellule pédonculée (sessile) et une cellule nageuse (mobile) sont formées suite à la séparation de la cellule prédivisionnelle. La cellule pédonculée va rester fixée sur le substrat initial tandis que la cellule nageuse, via son flagelle, va pouvoir se déplacer pour remonter un gradient en nutriments (Poindexter, 1981). La cellule nageuse, au contraire de la cellule pédonculée, est bloquée au niveau de son cycle cellulaire. Au moment où la cellule nageuse trouve un lieu propice où la concentration en nutriments est adéquate, elle entame un processus de différenciation la changeant en cellule pédonculée qui va se fixer sur ce nouveau substrat et où elle va reprendre un nouveau cycle cellulaire. Le flagelle unique de la cellule nageuse va être directement fonctionnel après la cytokinèse lui fournissant la motricité nécessaire à l'exploration de nouvelles niches écologiques. Cette mobilité est utile à la bactérie aquatique pour lui permettre de se mouvoir dans l'environnement liquide. Les pili, quant à eux, ne sont produits qu'après la division et octroient à la bactérie nageuse la possibilité d'une adhésion aux surfaces biotiques ou abiotiques. Ces pili vont également servir de senseurs du milieu à la bactérie. La cellule au stade nageuse ne peut initier la réplication de son génome et de ce fait, reste en phase G1. Ensuite, en réponse à certains stimuli, celle-ci entame un processus de différenciation en cellule pédonculée. Au cours de cette transformation, le flagelle polaire est éjecté et les pili connaissent une rétraction pour laisser place à un pédoncule formé à partir d'une extension des membranes et de la paroi cellulaire. Ce pédoncule va permettre l'adhésion de la bactérie au substrat. Après cette fixation, *C. crescentus* va entrer en phase S du cycle cellulaire où une étape de réplication de son génome ainsi qu'une étape de croissance vont avoir lieu. Cette phase, curieusement, s'effectue d'une manière plus proche des eucaryotes que dans le cas d'*Escherichia coli* (Skerker and Laub, 2004). En effet, une seule et unique étape de réplication du génome se produit pour donner deux chromosomes sœurs, au contraire de ce qui se passe chez *Escherichia coli* dont les réplifications peuvent se faire plusieurs fois les unes à la suite des autres avant le phénomène de cytokinèse de tel sorte que la cellule hérite d'un chromosome complet qui est déjà en cours de réplication (Skerker and Laub, 2004). Etant donné que la nouvelle *Escherichia coli* reçoit en chromosome qui a déjà entamé son cycle de réplication, le temps de génération de cette bactérie sera plus court (20 minutes) que celui de *C. crescentus* (1 à 2 heures) qui, à chaque cycle de vie, doit reprendre une étape d'initiation de la réplication. A la fin de l'étape de croissance, une cellule prédivisionnelle est formée entraînant une différenciation des deux bactéries *C. crescentus*. Au cours de cette étape de différenciation, les deux chromosomes nouvellement dupliqués sont répartis de chaque côté de la cellule dans laquelle un phénomène de septation et ensuite de division va se produire. A la fin du processus de division, avant la mise en place de l'asymétrie, la cellule prédivisionnelle possède déjà un pédoncule polaire au niveau de la future grande cellule. En ce qui concerne la future petite cellule, un flagelle unique et des pili apparaissent au niveau du pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle. La mise en place de ces organelles lors de la division génère deux cellules possédant un génome semblable mais de morphologies et de physiologies complètement différentes (Jenal, 2000). La bactérie pédonculée

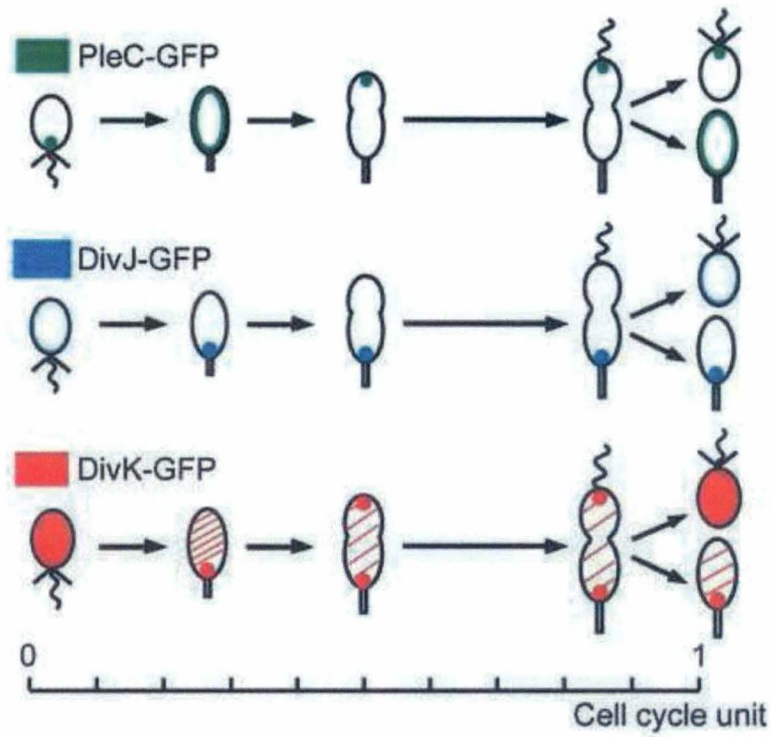


Figure 7 : Représentation de la distribution asymétrique de PleC, DivJ et DivK lors du cycle cellulaire chez *C. crescentus*. La fusion *pleC-gfp* est représentée en vert, la fusion *divJ-gfp* en bleu et la fusion *divK-gfp* en rouge. La barre d'échelle inférieure représente la position de la cellule par rapport au cycle cellulaire (Jacobs et al., 2001)

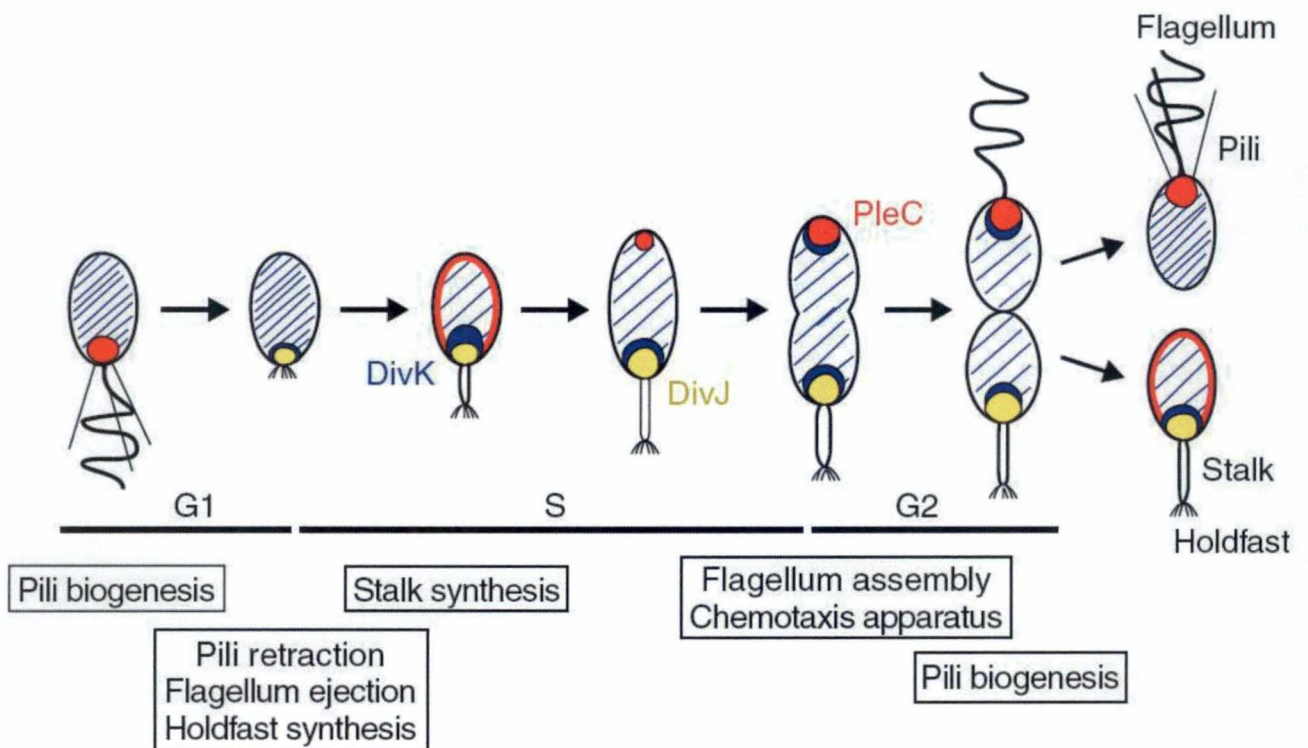


Figure 8 : Développement de *C. crescentus* lors des phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. Au bas du schéma sont indiqués les phénomènes d'apparition des différents appendices et des appareils de chimiotaxie. La répartition dynamique de DivK en bleu, DivJ en jaune et de PleC en rouge est également indiquée (Jenal and Stephens, 2002)

produite va directement entamer un nouveau cycle de division tandis que la cellule nageuse va d'abord devoir subir un nouveau cycle de transition vers la forme pédonculée avant, qu'elle aussi, ne puisse se reproduire.

La mise en place d'un cycle cellulaire aussi complexe que celui-ci nécessite une coordination parfaite des différents processus entrant de ce cycle. Via des analyses transcriptomiques, 553 gènes (19% des *ORFs* de *C. crescentus*) présentent un taux variable dans leur proportion d'ARNm en fonction du cycle cellulaire (Skerker and Laub, 2004). Egalement, 15% des protéines de la bactérie sont d'abondance variable au cours du cycle cellulaire (Jenal and Stephens, 2002). Ces données suggèrent que l'expression de toute une série de protéines présentes chez *C. crescentus* est fortement dépendante de l'avancement du cycle cellulaire.

- **PleC, DivJ, DivK : le mini-réseau dynamique. (Fig7 et Fig8)**

PleC (Pleiotropic effects) PleC est une histidine kinase non-essentielle composée de 842 acides aminés (aa) chez *C. crescentus*. Associée à la membrane plasmique, cette kinase est impliquée dans la régulation de la morphologie polaire (Wang et al., 1993). Une cellule possédant le gène *pleC* muté ne produit pas de pédoncule et présente plusieurs flagelles non-mobiles (Wheeler and Shapiro, 1999). De plus, une mutation au niveau du gène *pleC* induit la production de deux cellules morphologiquement identiques (Jacobs et al., 2001). PleC joue donc un rôle dans la division cellulaire, dans l'établissement de l'asymétrie ainsi que dans la mobilité bactérienne.

DivJ (Phénotype de division) : DivJ est une histidine kinase senseur non-essentielle chez *C. crescentus* et impliquée dans les premières étapes de division cellulaire au niveau de la cellule pédonculée (Ohta et al., 1992). L'expression du gène *divJ* augmente considérablement lors de la transition de phase G1-S du cycle cellulaire (Wheeler and Shapiro, 1999). Cette protéine est composée de 597 résidus comportant 5 domaines transmembranaires du côté N-terminal et un domaine catalytique en C-terminal.

Les résidus indispensables pour permettre la localisation de DivJ au niveau d'un pôle de la bactérie se situent entre les acides aminés 251 et 312 (Sciochetti et al., 2002).

DivJ est impliquée dans le contrôle de la formation du pédoncule de *C. crescentus* notamment en définissant sa localisation ainsi que sa longueur. Un mutant *divJ* possède des pédoncules plus longs localisés aux deux extrémités de la cellule, voir même au centre (Jacobs et al., 2000). De plus, une délétion du gène *divJ* génère l'apparition de cellules filamenteuses correspondant à trois fois la taille d'une bactérie sauvage (Wheeler and Shapiro, 1999).

DivK (Phénotype de division) : DivK est une protéine cytoplasmique essentielle chez *C. crescentus* ne possédant qu'un domaine régulateur de réponse (Burton et al., 1997). DivK va agir au niveau de la différenciation polaire ainsi que de la division cellulaire. DivK possède la particularité d'être le régulateur de réponse à la fois de PleC et de DivJ. En effet, une interaction physique avec ces deux histidines kinases et le régulateur de réponse a pu être mise en évidence grâce à la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Matroule et al., 2004). Un mutant $\Delta divJ$ montre une diminution de la concentration en DivK-P, suggérant que DivJ agit comme kinase sur DivK (Wheeler and Shapiro, 1999). D'un autre côté, un mutant *pleC* indique une diminution du taux de DivK-P, suggérant quant à lui que PleC serait impliqué dans la déphosphorylation de DivK (Wheeler and Shapiro, 1999). Des analyses utilisant des techniques d'immunoblot ont pu démontrer que DivK est présent en quantité équivalente tout au long du cycle cellulaire (Jacobs et al., 2001). En effet, des expériences de pulse-

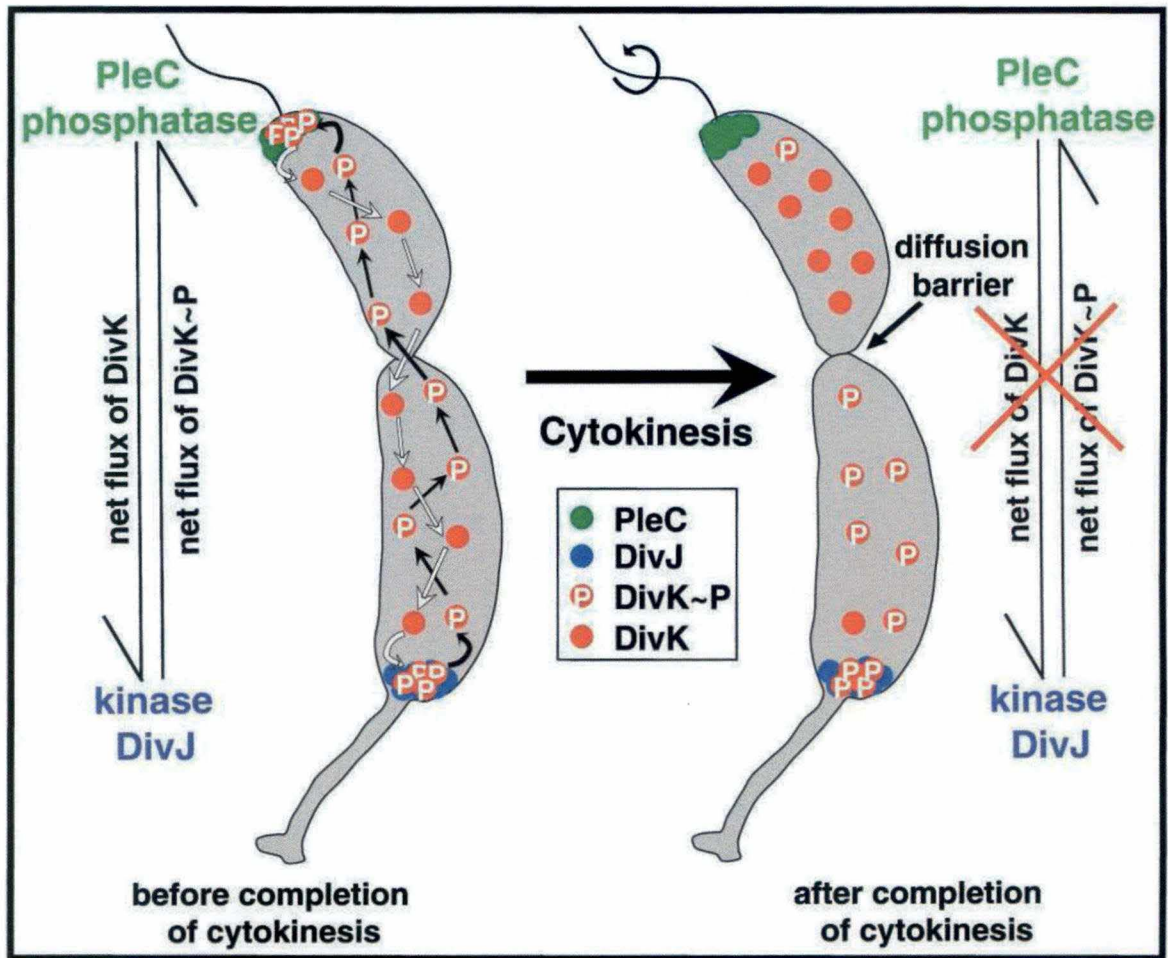


Figure 9 : Illustration du modèle de type « ping-pong » présentant la dynamique de PleC, DivJ et DivK au niveau de la cellule prédivisionnelle chez *C. crescentus* (Matroule et al., 2004).

chase ont pu mettre en évidence que *divK* n'était pas sujet à la dégradation lors d'un cycle cellulaire d'une durée normale de 2 heures (Jacobs et al., 2001).

La partie de « ping-pong »

Les deux histidines kinases PleC et DivJ et leur régulateur de réponse DivK forment un mini-réseau de régulation impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'asymétrie divisionnelle de *C. crescentus* (Fig9). Au niveau de la cellule prédivisionnelle, PleC et DivJ sont localisés aux pôles opposés de la cellule. PleC localise au niveau du pôle flagellé tandis que DivJ localise au niveau du pôle pédonculé (Wheeler and Shapiro, 1999). DivK, quant à lui, est responsable de l'établissement de l'asymétrie par la mise en place de mécanismes de développement différents entre les deux types de cellules. PleC et DivJ influencent l'état de phosphorylation de DivK conduisant à sa localisation dynamique à travers la cellule prédivisionnelle (Jacobs et al., 2001). La localisation différentielle de DivK phosphorylé (DivK-P) entre la cellule nageuse et la cellule pédonculée influence la différenciation entre ces deux cellules.

Dans la cellule prédivisionnelle, DivJ localise au pôle pédonculé et interagit avec DivK-P à ce même pôle. De plus, l'activité histidine kinase de DivJ va générer la phosphorylation de DivK. Cette phosphorylation de *divK* induit sa propre localisation au niveau du pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle possédant une affinité plus grande pour DivK-P (Lam et al., 2003). PleC, quant à elle, localise au niveau du pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle. L'histidine conservée de cette kinase est essentielle pour que PleC agisse comme phosphatase sur DivK-P engendrant sa délocalisation au niveau du pôle flagellé après la cytokinèse (Lam et al., 2003). L'action conjuguée de DivJ et PleC sur le régulateur de réponse DivK entraîne un échange de type « ping-pong » de DivK et DivK-P entre les deux pôles (Matroule et al., 2004). Les activités antagonistes de phosphorylation de DivJ et de déphosphorylation de PleC génèrent des échanges maintenant un état d'équilibre au niveau de la concentration de DivK-P au niveau du pôle flagellé inhibant le développement de ce pôle.

Par contre, après la cytokinèse, une barrière physique entre les deux cellules se forme menant à l'interruption des échanges de DivK entre PleC et DivJ. Cet arrêt de migration va constituer un signal indiquant aux deux cellules l'accomplissement de la cytokinèse pour pouvoir initier les programmes de développement comme la rotation flagellaire au niveau du pôle flagellé par exemple. DivK va donc rester concentré sous sa forme phosphorylée au niveau du pôle pédonculé de la cellule pédonculée. Au niveau de la cellule nageuse, le pool de DivK-P va être déphosphorylé par PleC au niveau du pôle flagellé générant sa dispersion dans l'intégralité du cytoplasme. Cette distribution cytoplasmique dans la cellule nageuse va lever l'inhibition qu'imposait DivK-P au niveau du pôle flagellé et va ainsi permettre d'induire la rotation du flagelle uniquement après la séparation des deux cellules.

Polarité

Chez de nombreuses espèces bactériennes, la localisation polaire de molécules représente une importance capitale pour l'application de fonctions et de régulations appropriées (Shapiro et al., 2002). De plus, la concentration de protéines dans le volume réduit d'un pôle peut être avantageux pour générer une amplification d'un signal à un endroit donné (Jacobs et al., 2001). En effet, la localisation d'une protéine possède un effet sur la réponse que celle-ci va générer.

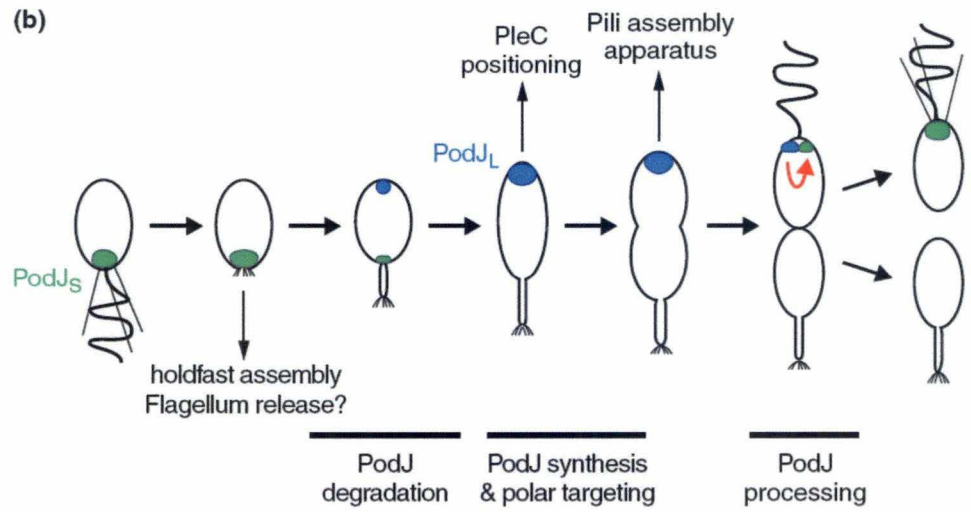


Figure 10 : Synthèse, protéolyse et positionnement de PodJ. La forme complète de PodJ (PodJ_L) est indiquée en bleu, la forme courte de PodJ (PodJ_S) est indiquée en vert. La flèche rouge indique la protéolyse de PodJ_S au niveau du pôle flagellé de la cellule nageuse (Jenal and Stephens, 2002).

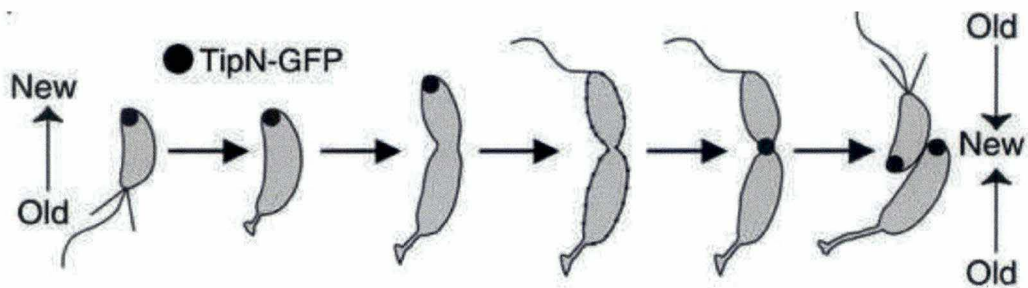


Figure 11 : Pattern de localisation de la fusion TipN-GFP chez *C. crescentus* (Lam et al., 2003).

Shigella flexeneri, *Bacillus subtilis* et *C. crescentus* notamment, possèdent des protéines localisées impliquées dans la mobilité cellulaire, dans le positionnement du chromosome et dans le contrôle du cycle cellulaire respectivement (Lybarger and Maddock, 2001).

La queue d'actine continuellement assemblée à un pôle de *Shigella flexeneri* lui permet de se mouvoir au sein d'une cellule infectée et même de passer de cellule en cellule (Steinhauer et al., 1999). IcsA, une protéine ancrée en membrane externe, localisée au vieux pôle de la bactérie est nécessaire et suffisante pour la polymérisation de la queue d'actine induisant le mouvement. IcsA ne possède pas de tropisme particulier pour le vieux pôle de la cellule et s'ancree donc dans la totalité de la membrane externe. Par contre, il n'y a qu'au vieux pôle que IcsA ne subit pas le clivage protéolytique et elle s'y concentre donc de manière plus importante que dans le reste de la cellule (Steinhauer et al., 1999). *Bacillus subtilis* quant à elle, a la possibilité de former une spore lors d'un appauvrissement de nutriments dans le milieu par exemple. Dans ce cas, une division asymétrique se déroule donnant lieu à une cellule mère et à une spore de taille inférieure. La mise en place de cette scission excentrée se fait via la décentralisation de l'anneau de septation formant la plate-forme initiant la cytokinèse (Shapiro et al., 2002).

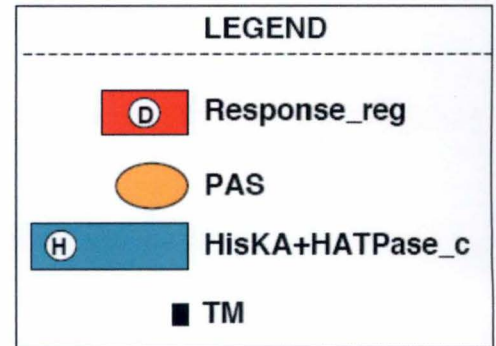
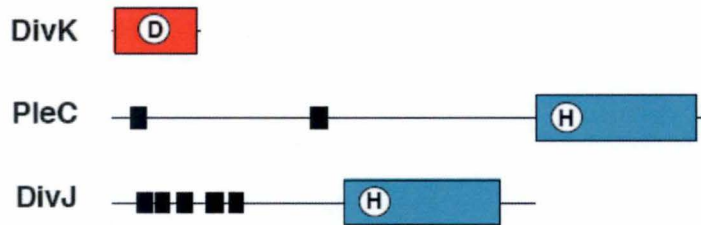
De plus, *Escherichia coli* possède également des protéines localisées aux pôles impliquées dans la chémotaxie (Shapiro et al., 2002). Les chémorécepteurs impliqués dans cette chémotaxie s'associent en complexes au niveau de la membrane. Ces récepteurs peuvent former des trimères de dimères de composition mixte. L'arrangement de ces récepteurs est dicté par la présence d'une histidine kinase CheA et de sa protéine couplée CheW. L'ensemble va former des « signalling teams » impliquées dans la détection de molécules particulières.

Mais qui garde les gardiens ? La localisation d'une protéine par une réponse ne fait que repousser le problème. En amont des protéines doit se trouver une structure qui aurait le potentiel d'être reconnu précisément. Le peptidoglycan pourrait représenter cette structure d'ancrage.

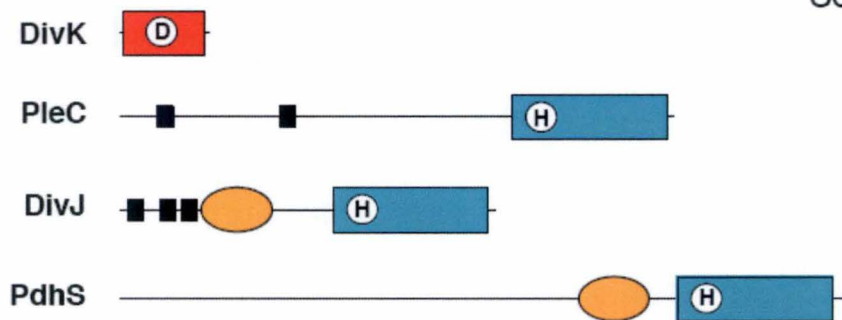
• Implication du peptidoglycan dans la polarité (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005)

Certaines bactéries possèdent une paroi recouvrant la membrane plasmique. Cette paroi protège la bactérie des variations environnementales externes, comme la différence d'osmolarité, qui font pression sur les procaryotes. De plus, cette paroi est impliquée dans le maintien de la forme cellulaire. Les bactéries ayant été débarrassées de leur paroi sont appelées sphéroblastes et possèdent une forme arrondie reflétant la perte d'une structure qui maintenait l'architecture externe de la cellule. Le peptidoglycan, macromolécule formant la paroi, doit pouvoir être synthétisé lors de l'élongation bactérienne mais aussi modifié sans que l'intégrité de la bactérie ne soit perturbée. *E. coli* et *B. subtilis* possèdent des gènes codant pour des protéines intervenant au niveau de ce peptidoglycan. Les PBP (Penicillin-binding protein) font parties de ces protéines. Elles catalysent la dernière étape de synthèse du peptidoglycan (Heijenoort, 2000). Ces PBP possèdent différentes activités enzymatiques impliquées dans la modification du peptidoglycan via l'insertion de précurseurs ou bien dans l'ajout et la jonction de nouveau peptidoglycan (Errington et al., 2003). Les modifications effectuées par les PBP doivent se dérouler au niveau de sites précis menant à une modélisation spécifique et indépendante de ces sites particuliers au niveau de la paroi cellulaire. L'incorporation de nouveau peptidoglycan provoque l'accroissement de la taille de la cellule (l'élongation) ou bien, dans la formation d'un nouveau septum suite à un phénomène de division. Chez *C. crescentus*, MreB, l'homologue bactérien de l'actine forme une structure

Caulobacter crescentus



Brucella abortus



Scale : 100 aa

Figure 12 : Visualisation des domaines de PleC, DivJ et DivK chez *C. crescentus* et *B. abortus* (Hallez et al., 2007). En rouge, le domaine régulateur de réponse partagé par C_c DivK et B_a DivK. En bleu, Les domaines kinases de C_c PleC, C_c DivJ, B_a PleC, B_a DivJ et B_a PdhS. En noir, les segments transmembranaires permettant l'ancrage en membrane des protéines. En orange, les domaines PAS de B_a DivJ et B_a PdhS.

hélicoïdale se déroulant tout le long de la bactérie (Divakaruni et al., 2007). Cette molécule interagit avec des PBP en les distribuant de manière hélicoïdale dans la cellule pour la synthèse de nouveau peptidoglycan. FtsZ est l'homologue bactérien de la tubuline impliqué dans la division cellulaire via la formation d'un anneau FtsZ recrutant d'autres protéines impliquées dans la division cellulaire (Aaron et al., 2007). Cependant, FtsZ est également impliqué dans le recrutement de certaines PBP générant le peptidoglycan au niveau du site de division (Errington et al., 2003). Les diverses modifications engendrées au niveau du peptidoglycan par les différentes PBP créent une hétérogénéité au niveau de la paroi cellulaire. Cette hétérogénéité pourra être la clé du ciblage de protéines préférentiellement au niveau d'un site plutôt que d'un autre dans la paroi bactérienne et notamment pour l'insertion des protéines générant l'asymétrie. De plus, lors de la formation d'un pôle après un phénomène de septation, celui-ci ne subit quasi plus aucune modification au niveau de sa paroi constituant un peptidoglycan inerte (Young, 2003). Dans le cas où des protéines régulatrices seraient associées à ce peptidoglycan inerte, celles-ci pourraient effectuer leurs fonctions au niveau d'un site où elles ne seraient pas délogées et où elles pourraient donc rester localisées.

• PodJ et TipN : l'ancre et le phare

Un début de réponse concernant la présence d'une protéine au pôle pourrait être envisagé par le cas de PodJ et TipN.

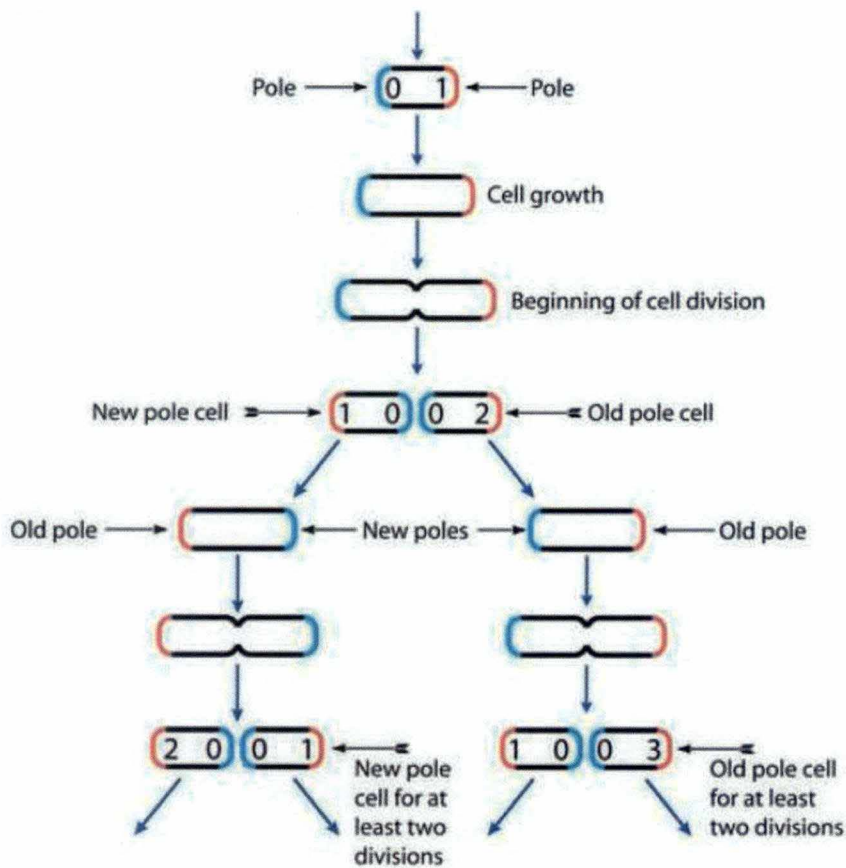
Chez *C. crescentus*, PodJ, une protéine impliquée dans le développement d'organelles polaires tel que le holdfast, possède un rôle d'ancrage pour l'histidine kinase PleC (viollier et al., 2002; Hinz et al., 2003; Lawler and Brun, 2006). Tout au long du cycle cellulaire, PodJ présente une dynamique tout à fait particulière impliquant deux formes de la protéine (**Fig10**). La forme courte de PodJ (PodJ_s : 94KDa) localise au pôle flagellé de la cellule nageuse. Lors de la transition de la cellule nageuse en cellule pédonculée, une dégradation de la forme courte de PodJ est observée. PodJ_L (Forme longue : 133KDa) est produite et va se localiser au niveau du pôle opposé au pédoncule de la cellule pédonculée, pôle où ensuite, il y aura apparition du flagelle au niveau de la cellule prédivisionnelle. Chez la cellule flagellée, PodJ_L va être dégradée et PodJ_s va le remplacer (Hinz et al., 2003). L'apparition de PodJ_s est en fait due à la protéolyse de la forme longue de la protéine. En effet, PerP (periplasmic protease of PodJ) est la protéase impliquée dans la conversion de la forme longue en forme courte (Chen et al., 2006). L'activation du gène *perP* va pouvoir se réaliser au moment opportun via un système de transduction du signal impliquant DivJ-PleC-DivK (Chen et al., 2006).

PodJ est nécessaire pour la localisation de PleC. En effet, PodJ et PleC localisent au même moment du cycle cellulaire au niveau du pôle flagellé de la cellule nageuse. De plus, des souches mutées pour *podJ* ou *pleC* présentent certaines similitudes phénotypiques au niveau de la conservation du flagelle en période de transition vers la cellule stalked notamment (Smith et al., 2002). De plus, dans un mutant *podJ*, PleC-YFP ne peut plus se localiser au niveau du pôle flagellé tandis que dans une souche mutée pour *pleC*, PodJ conserve encore sa localisation polaire (Hinz et al., 2003). Ces résultats suggèrent que PodJ est la protéine d'ancrage permettant la localisation de PleC au cours du cycle cellulaire chez *C. crescentus*.

Récemment, une autre protéine polaire de *C. crescentus* a été découverte permettant à la bactérie de créer un axe de polarité discriminant le nouveau pôle de l'ancien pôle (**Box2**) (Lam et al., 2006). TipN (tip of new pôle) est une protéine de 94 KDa possédant deux segments transmembranaires ainsi qu'une longue séquence d'acides aminés impliqués dans la formation de domaines coiled-coils (Huitema et al., 2006). Les domaines coiled-coils interviennent

Box 2 : Le vieillissement des pôles (Stewart et al., 2005)

Lors d'une division cellulaire, une synthèse de nouveau peptidoglycan va se réaliser au niveau de l'anneau de septation. Après cytokinèse, deux nouveaux pôles sont formés possédant un peptidoglycan neuf. Les deux cellules possèdent également chacune un vieux pôle (pôle âgé) résultant d'une division antérieure. Un pôle va devenir de plus en plus vieux au cours des générations. De plus, une bactérie héritant d'un pôle très ancien va présenter une diminution de son taux de croissance, une diminution de la production d'une progéniture ainsi qu'une augmentation du taux de décès. Alors que l'ADN et les lipides membranaires sont distribués d'égale manière entre les deux pôles, les constituants de la paroi cellulaire quant à eux subissent un lent turn over et restent conservés au niveau des pôles où ils ont été formés. Le non-remplacement du matériel se situant au vieux pôle entraîne, au fil des générations, une accumulation d'agrégats protéiques néfastes à la cellule. Cette accumulation au vieux pôle de la cellule va permettre la génération de nouvelles cellules exemptes de composé néfaste possédant une espérance de vie augmentée par rapport aux vieilles cellules.



Origine des pôles cellulaires après plusieurs divisions. Les chiffres indiquent le nombre d'évènements de division subit par le pôle ainsi marqué, les nouveaux pôles sont en bleu, les pôles plus anciens sont en rouge (Stewart et al., 2005).

dans les interactions entre protéines^(Yu, 2002). TipN localise au nouveau pôle de la cellule nageuse et va conserver cette localisation lors d'une grande partie du cycle cellulaire (**Fig11**). Au niveau de la cellule prédivisionnelle, cette protéine va délocaliser pour se distribuer en membrane dans l'intégralité de la cellule et va ensuite se concentrer au niveau du futur site de division. TipN aurait un tropisme élevé pour le nouveau peptidoglycan lui permettant de s'y fixer. Après la cytokinèse, TipN va se situer au niveau des deux nouveaux pôles formés et va ainsi induire la mise en place d'un axe polaire informant la cellule nouvellement créée sur son orientation ainsi que sur l'identité de ses deux pôles^(Lam et al., 2006). L'établissement de l'axe de polarité par TipN est donc responsable du bon positionnement de protéines et d'organelles au niveau de la cellule comme l'histidine kinase PleC ou encore le flagelle^(Huitema et al., 2006). Par ailleurs, TipN seul est requis pour le positionnement correct de l'anneau FtsZ permettant la cytokinèse^(Lam et al., 2006). De même, la présence ectopique de TipN à d'autres endroits que le nouveau pôle au niveau de la membrane y entraîne la génération de nouveaux axes de polarités et de flagelles^(Lam et al., 2006).

• Quand la symétrie fait place à l'asymétrie

L'asymétrie fonctionnelle est mise en place de manière à générer plusieurs types de descendants à partir d'un patrimoine génétique identique. Cette asymétrie apparaît grâce à la distribution asymétrique au sein d'une cellule de protéines impliquées dans différents mécanismes du développement. Cette distribution asymétrique de protéines ne peut se dérouler sans une régulation spatio-temporelle stricte de l'expression des gènes impliqués dans le développement cellulaire pour que le bon gène soit exprimé au bon moment. Au niveau des α -protéobactéries, des observations microscopiques ont montré que *C. crescentus*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* et *B. abortus* effectuent des divisions asymétriques^(Hallez et al., 2004).

B. abortus, l'ennemi méconnu

Le modèle bactérien utilisé au sein de notre laboratoire pour l'étude des différents mécanismes d'infection d'eucaryotes par des pathogènes procaryotes est l' α -protéobactérie *Brucella abortus*. A ce jour, huit espèces de *Brucellae spp.* ont pu être mises en évidence, les six premières infectant des mammifères terrestres à savoir *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ainsi que deux autres impliquées dans la colonisation de mammifères marins à savoir *B. cetaceae* et *B. pinnipediae*^(Bricker et al., 2000 ; Godfroid et al., 2005). Ces espèces sont surtout différenciées par rapport à leur tropisme respectif pour leur hôte d'infection^(Broughton and Jahans, 1997). Ces pathogènes intracellulaires facultatifs, coccobacilles à Gram négatif aérobiques, mesurant 1.2 μ m de long et 0.8 μ m de large, sont les agents responsables de la brucellose. Cette maladie engendre notamment l'avortement chez les animaux et une infection nommée fièvre de Malte chez les humains. La brucellose représente une zoonose à répartition mondiale entraînant de nombreuses pertes au niveau économique et une morbidité dans les régions endémiques. De plus, ces bactéries sont catégorisées comme pathogènes de classe III et elles ont été déclarées comme agents bioterroristes potentiels^(Boschiroli et al., 2001).

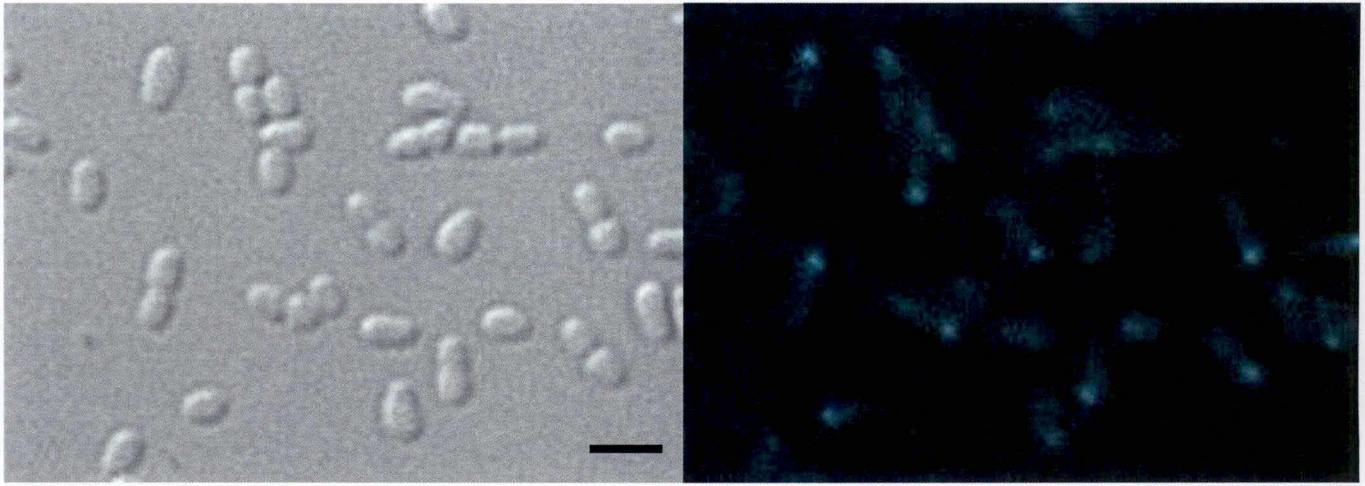


Figure 13 : Observation de la localisation de PdhS-YFP intégré dans le génome d'une souche *B. abortus* 544. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 µm.

Box 3 : Les domaines PAS (Taylor and Zhulin, 1999)

Les domaines PAS sont des modules signals d'une centaine d'acides aminés sensibles à des modifications au niveau de caractéristiques telles que la lumière, la présence de ligands, le potentiel redox, l'O₂, le niveau d'énergie de la cellule mais aussi des facteurs environnementaux. La perception spécifique de chaque signal spécifiquement s'effectue par l'entremise de cofacteurs associés à ces domaines PAS. Ceux-ci sont combinés, dans des protéines possédant plusieurs domaines, à de nombreux modules régulateurs. Chez les procaryotes, la plupart des domaines PAS se situent au niveau de systèmes à deux composants impliqués dans des systèmes de régulation. Au contraire des eucaryotes comportant régulièrement une paire de PAS domaines, les procaryotes peuvent posséder un, deux ou de multiples domaines PAS. La présence de domaines multiples au sein d'une même protéine régulatrice lui permet d'être sensible à différents paramètres. Ces domaines PAS sont apparus très tôt au cours de l'évolution car on les retrouve chez de nombreuses espèces phylogénétiquement éloignées.

Chez *Escherichia coli*, la perception du potentiel redox et du gradient en oxygène du domaine PAS de Aer s'effectue via la présence d'un cofacteur FAD (Repik, 2000). Ce cofacteur peut subir des réactions d'oxydoréduction engendrant un transfert du signal au domaine C-terminale de Aer qui va ensuite, l'envoyer dans un mécanisme de transduction du signal. Le domaine PAS de Aer est en association avec un composant de la chaîne de transport d'électron indiquant l'état de fonctionnement de cette chaîne. En effet, l'état d'oxydation de FAD est le reflet de l'état d'oxydation de la chaîne entière. Et cet état d'oxydation du FAD va informer la cellule sur la disponibilité de donneurs d'électrons pour le fonctionnement de la chaîne.

• PleC, DivJ, DivK chez *B. abortus* : la rupture

B. abortus partage avec *C. crescentus* un certain nombre d'orthologues tels que PleC, DivJ et DivK (Fig12) (Hallez et al., 2004). Chez *B. abortus*, un homologue du gène de *divK* de *C. crescentus* (*c_cdivK*) a été mis en évidence (*B_adivK*). *B_adivK* partage 79% d'identité nucléotidique avec le gène codant pour ce régulateur de réponse essentiel de *Caulobacter*. Chez *B. abortus*, comme chez *C. crescentus*, le gène *divK* est essentiel ; en effet, dans une souche portant une copie extra-chromosomique de *divK*, la délétion de la version chromosomique de ce gène est possible (Johann Mignolet, thèse en cours). De plus, *B_adivK* introduit dans une souche mutée de *c_cdivK* chez *C. crescentus*, rend cette souche viable (Hallez et al., 2007). Ces données suggèrent que ces deux gènes possèdent la même fonction de régulateur de réponse chez leurs espèces respectives. Par ailleurs, DivK-YFP présente une localisation polaire dans 90% des bactéries observées.

Un test double hybride en levure permet de mettre en évidence les interactions physiques liant DivK à PleC et DivJ. Le gène *pleC* chez *B. abortus* aligné avec le gène *pleC* chez *C. crescentus* présentent un haut degré d'identité. De plus, la présence de *pleC* de *B. abortus* dans une souche de *Caulobacter* Δ_{c_cpleC} restore, en partie, le phénotype sauvage de *C. crescentus*. Ces données suggèrent que *B_aPleC* est l'homologue fonctionnel de *c_cPleC* chez *B. abortus*. Pour ce qui est, chez *B. abortus*, de l'interaction entre PleC et DivK, la localisation particulière de DivK-YFP n'est pas perturbée dans une souche Δ_{pleC} par rapport à une souche sauvage. De plus, PleC-YFP présente une localisation différente à celle observée chez *C. crescentus*. En effet, la fusion PleC-YFP est observée soit au niveau de l'endroit de septation, soit au niveau du pôle nouvellement formé suite à la division cellulaire chez *B. abortus*. PleC n'intervient pas dans la phosphorylation de DivK chez *B. abortus* car un délétant *pleC* ne génère probablement pas de délocalisation de DivK-YFP (Hallez et al., 2007).

B_aDivJ est également homologue de *c_cDivJ*. DivJ fusionné à l'YFP présente une localisation diffuse au niveau cytoplasme chez *B. abortus*. Pourtant, comme dans le cas d'un délétant *pleC*, un délétant *divJ* ne génère pas la délocalisation de DivK et ne semble donc pas participer à la phosphorylation de DivK chez *B. abortus* (Hallez et al., 2007). Une recherche d'homologues réalisée avec les séquences de *B_aplec* et de *B_adivJ* au niveau de l'entièreté du génome de *B. abortus* a permis de détecter une nouvelle histidine kinase nommée PdhS (*pleC/divJ* homolog sensor) (Hallez et al., 2004). PdhS est capable d'interagir avec DivK dans un test double hybride en levure (Hallez et al., 2007).

• PdhS, le nouveau venu (Hallez et al., 2007)

PdhS est une histidine kinase de taille relativement importante (1035 aa) présentant des caractéristiques différentes d'autres histidines kinases. La longueur de cette kinase est atypique mais d'autres critères cités ci-dessous accroissent encore sa différence par rapport aux autres kinases.

Premièrement, PdhS ne possède pas de segment transmembranaire prédit alors qu'une observation en microscopie à fluorescence montre une localisation polaire de PdhS-CFP (Fig13). En effet, la fusion PdhS-CFP se concentre à un pôle dans 90% des cellules observées. Un time-lapse montrant de manière spatio-temporelle la fusion PdhS-CFP a mis en évidence que cette protéine de fusion s'accumulait au niveau du vieux pôle de la grande cellule. Après la division cellulaire, PdhS n'apparaît au niveau du vieux pôle de la petite cellule qu'après 1 à 2 heures suggérant que la petite cellule ne peut acquérir un PdhS polaire qu'après une étape de différenciation pour la génération d'une grande cellule (Fig14). Dès

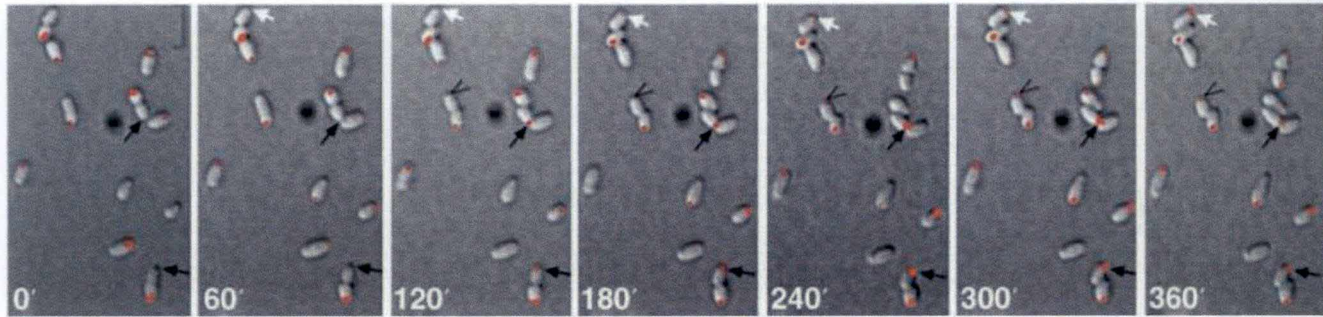


Figure 14 : Visualisation de la localisation dynamique de PdhS au vieux pôle de la grande cellule de *B. abortus* (Hallez et al., 2007). Micrographies en DIC superposées aux images en fluorescence prises en microscopie time-laps dans une souche XDB1104 exprimant *pdhS-yfp*. L'intervalle entre chaque image correspond à 60 minutes. Les flèches indiquent l'apparition du signal en fluorescence 60 à 120 min après la séparation visible des deux cellules.

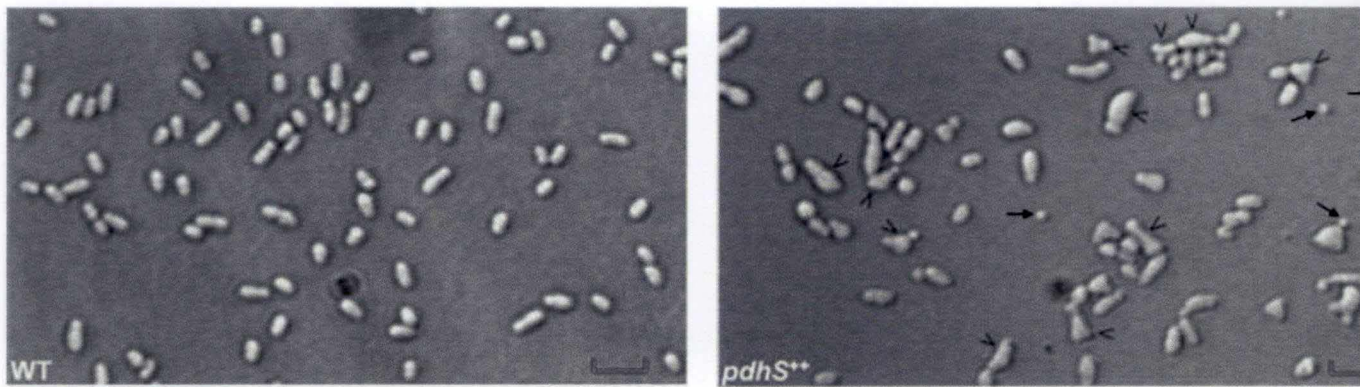


Figure 15 : Visualisation de la surexpression de *pdhS* (à droite) par rapport à la souche sauvage (à gauche). Micrographies en DIC. Les flèches noires indiquent les mini-cells, les têtes de flèches noires indiquent les aberrations morphologiques. La barre d'échelle représente 2 μm .

l'obtention de PdhS, cette cellule va alors entamer un cycle cellulaire pour la génération d'une nouvelle lignée cellulaire. La présence de PdhS pourrait être requise pour la maturation de la petite cellule en grande cellule.

Le fait que PdhS ne possède pas de segment transmembranaire prédit au contraire de PleC et DivJ (**Fig12**) suggère que cette protéine appartient aux histidines kinases solubles. De plus PdhS est retrouvé dans une fraction cytoplasmique, dépourvue de protéines membranaires (Haliez *et al.*, 2007).

Deuxièmement, un test double hybride en levure montre que cette histidine kinase peut interagir avec elle-même. Une étude plus poussée a démontré que seuls les 613 premiers acides aminés étaient nécessaires pour garder cette interaction. On peut donc en conclure que PdhS possède deux parties : une partie N-terminale de multidimérisation et une partie C-terminale possédant un domaine kinase classique. La partie N-terminale de PdhS présente une longue séquence d'acides aminés comportant un domaine PAS prédit (**Box3**) (Haliez *et al.*, 2004). Troisièmement, aucun délétant du gène de *pdhS* n'a pu être obtenu jusqu'à ce jour sans la présence d'une copie du gène *pdhS* présente sur un plasmide. Cette donnée suggère que *pdhS* est essentiel pour permettre la génération de colonies chez *B. abortus*. De plus, une surexpression du gène *pdhS* génère des aberrations morphologiques se traduisant par des bactéries en forme de Y mais également par une proportion bien plus importante de « mini-cells » par rapport à des souches sauvages (**Fig15**).

La localisation de Ba PdhS s'observe au niveau d'un ou deux pôles de *C. crescentus* lorsque Ba PdhS est fusionné à la CFP alors que cette bactérie ne possède pas d'orthologues prédits de PdhS.

De plus, en dehors de *B. abortus* et de *C. crescentus*, Ba PdhS localise également chez *Sinorhizobium meliloti*. La localisation de PdhS chez d'autres espèces dont certaines ne possèdent pas d'homologues de cette kinase indique la conservation d'une structure d'ancrage de PdhS chez ces α -protéobactéries se divisant asymétriquement. Cette structure conservée serait dès lors impliquée dans la maturation des pôles chez ces α -protéobactéries.

• Les relations intimes de PdhS

Interaction avec DivK

Il a été démontré que ni PleC ni DivJ ne participait au contrôle de la phosphorylation de DivK (Haliez *et al.*, 2004). Par contre, PdhS, quant à lui, pourrait représenter l'histidine kinase agissant sur ce régulateur de réponse (Haliez *et al.*, 2007). De fait, une colocalisation des fusions DivK-YFP et PdhS-CFP a été observée suggérant que PdhS pourrait influencer l'état de phosphorylation de DivK. Cette hypothèse est confortée par le fait que DivK interagit avec la partie histidine kinase de PdhS lors d'un test en double hybride chez la levure et que l'état de phosphorylation de DivK induit sa localisation subcellulaire particulière chez *B. abortus*.

Autres interactants de PdhS

PdhS ne possède pas de domaine prédit pour l'ancrage à la membrane plasmique, mais pourtant elle présente une localisation polaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de partenaires encore inconnus localisés au pôle et ancrés en membrane, permettant à la kinase de se fixer au niveau du vieux pôle de la grande cellule. Un test double hybride en

levure a donc été effectué pour mettre en évidence ces interactants (Johann Mignolet thèse en cours, Delphine Dotreppe mémoire 2006).

Trois interactants potentiels ont pu être mis en évidence. On y trouve deux protéines hypothétiques, nommées PicC et PipP, ne comportant aucune fonction connue ainsi qu'une protéine annotée comme une fumarase nommée FumC. Le gène *picC* ne présentant pas d'orthologues chez *C. crescentus*, est essentiel chez *B. abortus*. Une surexpression de celui-ci génère la formation d'aberrations morphologiques. PicC possède également des domaines coiled-coils. Le gène *pipP* n'est pas essentiel mais présente une localisation polaire peu marquée. Par contre, l'interaction entre une histidine kinase et une enzyme est quelque chose de tout à fait atypique et mérite une attention toute particulière.

Les fumarases

Les fumarases sont des enzymes impliquées dans l'interconversion du composé fumarate en composé malate qui interviennent au niveau du cycle de Krebs. Trois fumarases différentes ont pu être mises en évidence à ce jour chez *Escherichia coli*. Ces fumarases nommées FumA, FumB et FumC ont été divisées en deux groupes en fonction de leurs homologies ^(Park and Gunsalus, 1995). Ces deux groupes se distinguent également par la présence ou l'absence d'un cluster Fer. En effet, FumA et FumB sont classées comme fumarases de classe I car elles possèdent un centre Fer qui les rend dépendante au fer ^(Park and Gunsalus, 1995). Ce centre Fer 4Fe-4S peut être déstabilisé via l'oxydation d'un des atomes de fer par un radical superoxyde O_2^- ^(Imlay, 2003). L' O_2^- peut attaquer un centre Fer en se liant à un atome de Fer et induisant ainsi une suite de réactions menant à la déstabilisation du centre Fer en entier nécessaire pour l'activité enzymatique ^(Flint et al., 1993). La production de superoxydes s'effectue lors d'un transfert d'un électron provenant d'une molécule donneuse à une molécule d'oxygène ^(Imlay, 1995). L'expression de *fumA* en condition aérobie est plus importante par rapport à *fumB* et *fumC*, suggérant que l'activité fumarase de FumA est dominante en condition d'aérobie tandis que FumB est plus importante en condition anaérobie ^(Tseng, 1997). Le gène encodant *fumC*, quant à lui, ne présente aucune homologie ni avec *fumA*, ni avec *fumB*. Cette enzyme fait partie des fumarases de classe II ne nécessitant pas la présence d'atomes de Fer pour son activité. L'absence de centre Fer chez cette enzyme lui confère une résistance aux chocs oxydatifs et à une déplétion en fer du milieu à l'inverse de FumA et FumB ^(Liochev and Fridovich, 1992 ; Flint et al., 1992).

• Régulation

Chez *Escherichia coli*, l'expression de *fumC* s'effectue par son propre promoteur mais également par le promoteur du gène *fumA* se trouvant en amont ^(Park and Gunsalus, 1995). Cependant, lors de la présence de chocs oxydatifs, on observe une diminution de l'expression du gène *fumA* tandis que l'expression de *fumC* augmente d'un facteur 20. Cette régulation spécifique sur *fumC* est due au régulon SoxR (Superoxide Response) faisant partie du régulon *soxRS*. Ce régulon module d'une manière globale la réponse d'*Escherichia coli* à l' O_2^- et génère un système de défense contre les stress oxydatifs générés par ce radical via l'induction de la transcription d'une quinzaine de gènes ^(Liochev and Fridovich, 1992). Parmi eux se retrouvent les superoxydes dismutases contenant du manganèse (Mn), l'endonucléase IV et aussi la fumarase C. En effet, l'addition de paraquat générant la production de radicaux libres, entraîne la perte d'activité de FumA et de FumB mais, par contre, augmente

considérablement celle de FumC. Par ailleurs, l'induction de *fumC* par du paraquat ne peut se produire dans une souche mutée au niveau du régulon *soxRS* suggérant que la fumarase C est régulée par ce même régulon en réponse aux chocs oxydatifs (Liochev and Fridovich, 1992). L'une des hypothèses quant à la présence d'une fonction fumarase redondante serait que le système *soxRS* a mis en place un système de défense dans lequel des gènes encodant des protéines aux fonctions redondantes mais aux caractéristiques différentes peuvent être exprimés. Ces protéines aux fonctions redondantes vont permettre le remplacement de certaines enzymes sensibles aux radicaux oxydatifs par des enzymes insensibles à ces mêmes radicaux de manière à conserver la fonction remplie par ces enzymes. De fait, FumC pourrait agir comme relayeur de l'activité fumarase lorsque les bactéries se trouvent en présence de chocs oxydatifs abolissant l'activité de FumA et FumB (Liochev and Fridovich, 1992). Il a été démontré que l'activité totale des fumarases de classe I atteint un maximum de performance en présence d'1% d'O₂ alors que l'activité de FumC n'augmente drastiquement qu'à partir de 4% d'O₂ et atteint un maximum lorsque ce taux atteint 15% du milieu (Tseng, 2000).

• Les fumarases de *B. abortus*

Chez *B. abortus*, un gène encodant pour une fumarase de classe I a pu être mis en évidence et annotée comme *fumA* (*bafumA*). Aucun homologue du gène *fumB* n'est présent au niveau du génome de *B. abortus*. Un autre gène encodant une deuxième fumarase, de classe II (*bafumC*), est également présent. Une souche portant une délétion du gène *fumA* ou bien du gène *fumC* est viable. Par contre, une double délétion des gènes *fumA* et *fumC* ne génère pas le développement de colonies bactériennes (Johann Mignolet thèse en cours). Cette donnée de létalité synthétique suggère que FumA et FumC possèdent la même activité nécessaire à la survie de *B. abortus*.

L'observation de la distribution de ces deux fumarases fusionnées à des rapporteurs fluorescents est intéressante. Une fusion FumA-YFP au sein de la cellule de *B. abortus* montre une distribution diffuse dans l'ensemble du cytoplasme de la bactérie tandis que la fusion FumC-YFP localise au vieux pôle de cette cellule. Cette donnée suggère que PdhS est capable de recruter FumC au pôle.

Objectifs du mémoire

Objectifs du mémoire

Une interaction entre PdhS et une fumarase prédite (FumC) a été démontrée lors d'une étude antérieure ^(Hallez et al., 2007). Dans la littérature, aucun travail n'a encore mentionné l'interaction entre une histidine kinase et une enzyme du cycle de Krebs. En effet, les histidines kinases interagissent le plus couramment avec des régulateurs de réponse ^(Skerker and Laub, 2004). En plus de FumC, une autre fumarase (FumA) a également été découverte chez *Brucella abortus*. L'expression de différents gènes codant pour des enzymes accomplissant la même fonction entraîne un coût énergétique plus important pour la bactérie. Cette redondance de fonction a donc été conservée au cours de l'évolution, probablement en conférant un avantage évolutif à la bactérie. Une hypothèse pour expliquer de la redondance serait que les deux enzymes fumarases n'agissent pas sous les mêmes conditions. L'une des hypothèses testables quant à la redondance de l'activité fumarase est basée sur une localisation spatiale différente des deux types de fumarases chez *Brucella abortus*. En effet, FumA, par la présence d'un centre fer-soufre, est sensible à l'O₂⁻ contrairement à FumC. Les radicaux libres, de part leur importante réactivité et leur temps de vie très court (10⁻⁹ S), ne peuvent diffuser dans l'intégralité de la bactérie ^(Farr and Kogoma, 1991). Les radicaux libres agissent au lieu même de leur production et génèrent, en plus des dommages aux centres fer-soufre, des mutations aux niveaux du génome et endommagent également les acides gras polyinsaturés ^(Imlay, 2003). Etant donné que FumC localise au vieux pôle de la grande cellule chez *B. abortus*, sa présence pourrait s'expliquer par une concentration plus importante à ce pôle de ROS (reactive oxygen species). Dès lors, FumC pourrait prendre la relève de FumA à ce pôle pour pouvoir y assurer une activité fumarase. La chaîne de transport d'électrons, comptant cinq complexes et ancrées en membrane, est prédite comme le plus gros producteur de ROS des cellules bactériennes et eucaryotes ^(Imlay and Fridovich, 1990). La présence de ROS au vieux pôle de la grande cellule pourrait dès lors s'expliquer par une plus grande concentration en chaînes de transports d'électrons à ce pôle plutôt qu'ailleurs dans la cellule.

Ce mémoire a pour objectif de localiser les protéines formant la chaîne de transport d'électron de manière à observer sa distribution cellulaire. Une présence plus importante de cette chaîne au vieux pôle de la grande cellule suggérerait que ce site contient une plus grande concentration en ROS qu'ailleurs dans la cellule. La présence de ROS à cet endroit justifierait la présence à ce pôle d'une fumarase non déstabilisable par les chocs oxydatifs. De plus, une fumarase est une enzyme du cycle de Krebs induisant l'interconversion du succinate en fumarate. La présence d'une enzyme du cycle de Krebs au pôle serait-elle le reflet d'une localisation de l'ensemble des intervenants de ce cycle ? Dès lors, ce mémoire à également pour objectif de localiser les différentes enzymes du cycle de Krebs.

Pour permettre ces localisations, les différentes ORFs du cycle de Krebs et de la chaîne de transport d'électrons furent fusionnés à une protéine fluorescente dans des vecteurs de fusions construits par nos soins.

*Résultats et
Discussions*

Résultats et Discussions

Construction de vecteurs

La localisation de la chaîne de transport d'électrons ainsi que des différentes enzymes du cycle de Krebs nécessite la construction de vecteurs plasmidiques. Ces vecteurs d'ADN circulaires vont permettre la fusion traductionnelle entre les phases ouvertes de lecture (ORF) d'intérêt codant pour les différents gènes de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs et un gène codant pour une protéine fluorescente, dénommé mCherry (**Box4**). Nos *ORFs* d'intérêts sont stockées dans une banque plasmidique et furent rendues compatibles avec le système Gateway® (Dricot *et al.*, 2004) (Voir **matériels et méthodes**). Nous avons généré des vecteurs compatibles avec le système Gateway® de manière à réaliser des réactions LR avec les 44 plasmides pDONR201 encodant nos *ORFs* d'intérêts. Le vecteur plasmidique choisi comme support de ces constructions est un plasmide répliatif à faible nombre de copie, le pMR-Nours (voir **matériels et méthodes**). La surexpression de gènes fusionnés à un fluorochrome peut entraîner des artefacts de visualisation. En effet, une protéine se trouvant en concentration beaucoup plus importante qu'au niveau endogène peut former des agrégats polaires ou, au contraire, perdre sa localisation dans le cas où ses sites d'ancrage se trouvent être tous occupés. Des vecteurs intégratifs permettant l'intégration d'une fusion *ORF-mCherry* au locus chromosomique du gène d'intérêt chez *Brucella spp.* furent donc également construits à partir du plasmide pKS-oriT de manière à confirmer les localisations obtenues à l'aide de vecteurs répliatifs. De plus, la fusion avec un fluorochrome à l'une des extrémités d'une autre protéine peut entraîner un mauvais repliement de la chimère protéique et donc perturber la localisation de celle-ci. C'est pour cette raison que nous avons conçu 2 types de vecteurs permettant les fusions du gène *mcherry* à l'une et à l'autre extrémité de l'ORF d'intérêt.

La chaîne de transport d'électrons est composée de plusieurs complexes possédant des protéines présentant des segments périplasmiques. La protéine fluorescente GFP possède le désavantage de ne pas pouvoir se replier au niveau de l'espace périplasmique. Le choix de mCherry pour leur localisation s'est donc imposé puisque, contrairement à la GFP, celle-ci possède l'avantage de conserver une conformation structurellement active tant au niveau du périplasma qu'au niveau du cytoplasme. De plus, mCherry est un bon outil pour les tentatives de colocalisation de différentes protéines dans un même organisme. En effet, ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission se trouvent être plus importantes que celles de la GFP et de ses dérivées. En colocalisation, les deux fluorochromes donneront donc un signal spécifique à condition que leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas.

- **Stratégie de constructions des vecteurs pour l'obtention de fusions de mCherry au début d'une ORF (Fig16).**

Pour générer ces vecteurs, les 0.72 Kb de la séquence codante (CDS) *mCherry* furent amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à une GoTaq polymérase

BOX 4 : La protéine fluorescente mCherry (Tsien, 1998)

La protéine fluorescente utilisée pour permettre la visualisation des localisations est nommée mCherry. Cette protéine fluorescente monomérique rouge provient d'une nouvelle lignée de protéines fluorescentes dérivant de la « DsRed » qui fut découverte chez *Discosoma spp.* (Baird et al., 2000). Cette protéine a subi des cycles d'évolution dirigée *in vitro*, de manière à générer la mRFP1, un descendant monomérique possédant une vitesse de maturation plus élevée que la protéine fluorescente native de *Discosoma*. Une séquence en provenance du gène de la GFP a été ajoutée en début de l'ORF de la mRFP1 de sorte qu'elle puisse établir des fusions stables en carboxy-terminale comme en amino-terminale (Shaner et al., 2004). Ensuite, ce monomère fluorescent fut réintroduit dans un mécanisme d'évolution dirigée pour générer de nombreux descendants faisant tous partie de la nouvelle génération des protéines fluorescentes dont la mCherry. Cette protéine possède des spectres d'absorption et de réémission maximum de 587 nm et 610 nm respectivement. mCherry possède les pics d'absorption et de réémission les plus élevés des descendants de la mRFP1. Le spectre de réémission correspond à une couleur rouge tendant vers le violet. Les différentes mutations engrangées au cours de l'évolution dirigée ont conféré à la mCherry une forte résistance aux variations de pH, une bonne photostabilité ainsi qu'une vitesse élevée d'acquisition de sa conformation définitive.

La Green Fluorescent Protein (GFP) quant à elle constitue la chef de file de la première lignée de protéines fluorescentes. Découverte chez l'étoile de mer *Aequorea victoria*, la GFP est devenue un outil très utile pour la localisation subcellulaire de protéines (Tsien, 1998). Les autres protéines fluorescentes dérivant de la GFP sont également d'une grande utilité. Parmi elles, la Cyan Fluorescent Protein (CFP) possédant un pic d'émission correspondant au cyan (bleu) et la Yellow Fluorescent Protein (YFP) émettant dans une longueur d'onde correspondant au jaune. Néanmoins, celles-ci possèdent le désavantage de ne pas être fonctionnelles dans le périplasme.

(Promega®). L'amplification de ce gène fut réalisée à partir du plasmide pRSET-B *mCherry* possédant la séquence *mCherry*. Ce plasmide provient du laboratoire de Roger Tsien de l'université de San Diego. La fusion de *mCherry* au début d'une ORF fut rendue possible par l'ajout de bouts flottants comportant des sites de restriction aux primers utilisés pour l'amplification de *mCherry*. Un site *Bam*HI fut ajouté au niveau du bout flottant du primer 1 contenant le codon start du gène. Le primer 2 quant à lui, contient un site de restriction *Eco*RV au niveau du bout flottant du primer ainsi qu'une séquence correspondante aux derniers codons de *mCherry* ne portant pas le codon stop. L'absence du codon stop va permettre l'expression de *mCherry* en phase avec l'ORF se trouvant en aval de la CDS *mCherry*.

Les produits d'amplification vont être ligés dans un pGemT-easy linéarisé. Les produits de ligation furent transformés dans une souche d'*Escherichia coli* DH10B par électroporation (Voir **matériels et méthodes**). Les bactéries furent ensuite étalées sur des boîtes de Petri de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal et de l'IPTG pour la réalisation de tests bleu-blanc. Ce test bleu-blanc permet l'identification des clones ayant reçu le plasmide portant le produit d'amplification inséré au niveau du gène *lacZ'* encodant la β -galactosidase. Cette enzyme clive le composé X-gal en libérant du galactose et le composé X colorant les colonies en bleu. L'insertion d'un fragment au niveau de *lacZ'* va le disrupter. La β -galactosidase ne sera dès lors pas produite et les colonies apparaîtront blanches. Des mini-preparations furent réalisées à partir des colonies blanches dans le but d'extraire l'ADN plasmidique. Cet ADN fut digéré via les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RV. Les résultats obtenus après restriction montrèrent des fragments de 0.7 Kb correspondant à la séquence de *mCherry*. Neufs clones furent séquencés pour vérifier l'absence de mutations dans la séquence. Les résultats n'indiquèrent aucune mutation au niveau du gène encodant *mCherry* nous permettant ainsi de continuer la construction de nos vecteurs. Le plasmide obtenu fut appelé pMD001 (**Table 1**).

Ensuite, le gène *mCherry* fut extrait du pMD001 via l'action des enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RV. De plus, le plasmide pMD001 fut également restreint via l'enzyme de restriction *Sca*I agissant au niveau du gène *bla* encodant la résistance à l'Ampicilline. Ceci a pour but de casser la matrice du pGemT-easy et ainsi de favoriser l'événement de clonage de l'insert *mCherry* dans le pKS-oriT précédemment linéarisé par *Bam*HI et *Eco*RV au niveau du gène *lacZ'*. Les produits de ligation furent ensuite transformés dans des souches DH10B électrocompétentes. Les bactéries furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal et de l'IPTG pour effectuer un nouveau test bleu-blanc. L'ADN plasmidique des clones ayant formés des colonies sur milieu sélectif fut extrait et restreint avec l'enzyme de restriction *Nco*I. Les bandes obtenues, à savoir 3.5 Kb et 0.44 Kb, correspondent à la somme des tailles du pKS-oriT et de la séquence de *mCherry*. Le plasmide obtenu fut appelé pMD003.

Une cassette Gateway® (K7GWA) fut ensuite clonée au niveau du pMD003 pour permettre par après des réactions LR entre les sites *att*L1 et *att*L2 bordant l'ORF dans le plasmide donneur et des sites *att*R1 et *att*R2 entourant la séquence de la K7 GWA présente dans le plasmide de destination. Pour ce faire, la cassette Gateway® A fut extraite du pSKA ^(Van Mullem, 2004) via une digestion avec l'enzyme *Eco*RV. Une bande de 1.7 Kb, correspondant à la K7 GWA, fut obtenue. Par après, cette cassette fut purifiée via une technique d'extraction sur gel (voir **matériels et méthodes**). Ensuite, ce produit purifié fut ligé en aval de la séquence de *mCherry* au niveau du pMD003 précédemment coupé par l'enzyme de restriction *Eco*RV. Le produit de ligation fut transformé dans une souche d'*Escherichia coli* DB3.1 électrocompétente et résistante à la protéine encodée par le gène *ccdB*. Les bactéries transformées furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal

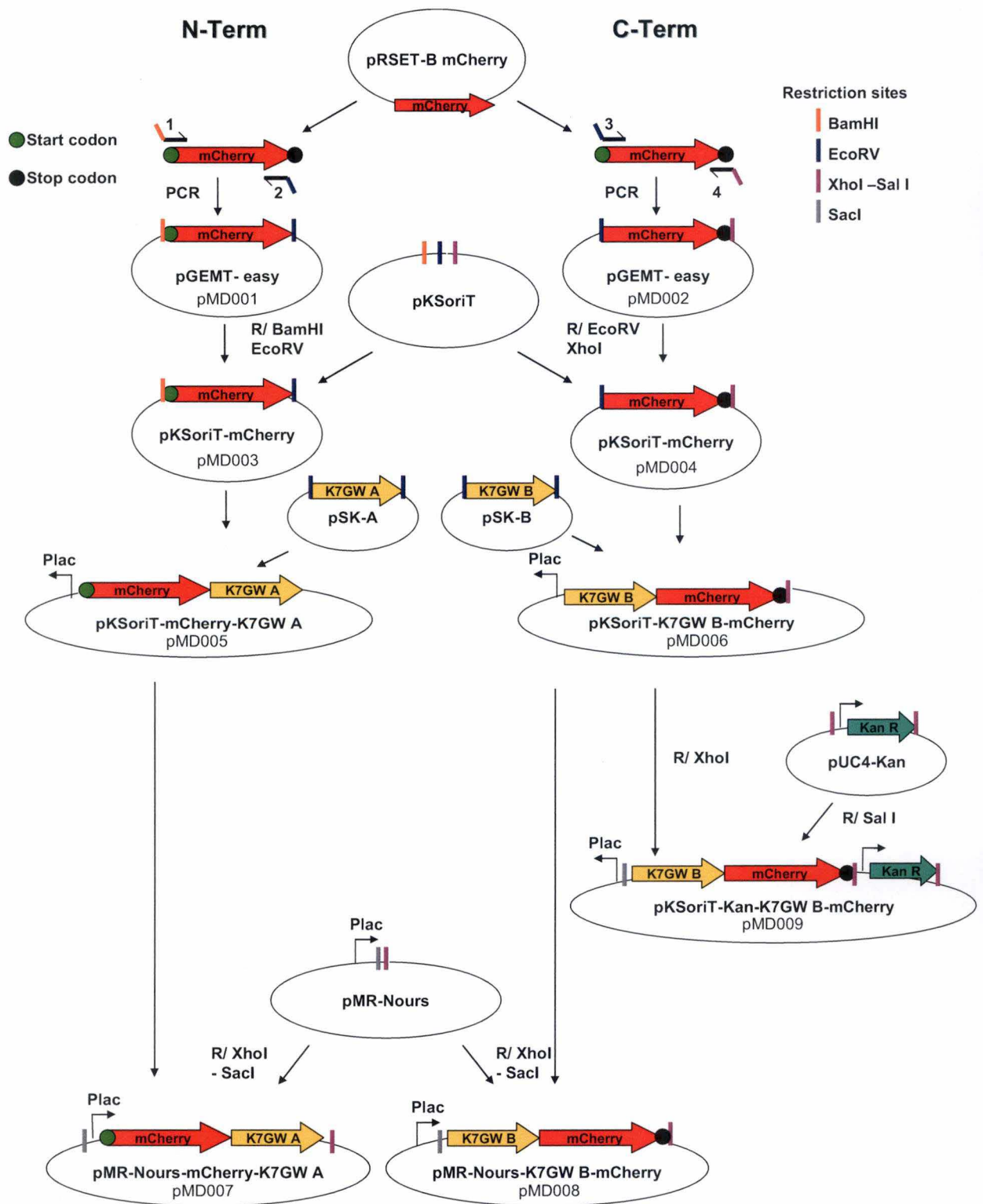


Figure 16 : Stratégies employées pour la construction de vecteurs réplicatifs et intégratifs pour la fusion de *mCherry* à l'extrémité 5' ou 3' d'une ORF.

et de l'IPTG pour réaliser un test bleu-blanc dans le but d'identifier les clones recombinants possédant les séquences *mCherry* et la *K7GWA*. L'ADN plasmidique fut extrait et digéré via l'enzyme *NcoI*. Les résultats montrèrent des fragments de 0.45 Kb, 1 Kb et 4 Kb représentant la taille totale du plasmide pMD005 contenant la séquence *mCherry* ainsi que la *K7 GWA* insérée dans le même sens que *mCherry*. Ce plasmide fut appelé pMD005.

Pour permettre l'expression de protéines en fusion avec *mCherry* dans un vecteur répliatif, la séquence *mCherry-GWA* fut extraite du pMD005 par les enzymes de restriction *SacI* et *XhoI*. Ce fragment fut ensuite purifié par la technique d'extraction sur gel et ligué dans un pMR-Nours préalablement digéré par *XhoI* et *SacI*. Ensuite, les produits de ligation furent transformés dans une souche DB3.1 électrocompétentes. Les bactéries transformées furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de la Nourséothricine, du X-gal et de l'IPTG pour le test bleu-blanc. L'ADN plasmidique fut extrait et restreint par l'enzyme *HindIII*. Les résultats de la restriction montrèrent des fragments de 0.57 Kb, 3.15 Kb et 8.8 Kb représentant la taille totale du pMD007 possédant la séquence *mCherry* ainsi que la *K7GWA*. Pour permettre son introduction chez *Brucella abortus*, ce plasmide fut transformé dans une souche d'*Escherichia coli* S17-1 électrocompétentes permettant la conjugaison avec *Brucella abortus*.

- **Stratégies de constructions des vecteurs pour l'obtention de fusions de *mCherry* en aval d'une ORF (Fig16).**

Les méthodes utilisées pour la génération de vecteurs permettant les fusions en 3' à une ORF furent comparables à celles présentées pour effectuer les séquences de fusions *ORF-mCherry*. Cependant, les sites de restriction ajoutés pour permettre ces fusions diffèrent. Les paragraphes suivant décrivent les étapes de construction de vecteurs pour les fusions du gène *mCherry* en 3' d'une ORF.

Pour générer ces vecteurs, les 0.72 Kb du gène *mCherry* furent amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à une GoTaq polymérase (Promega®). La fusion de *mCherry* en aval des *ORFs* d'intérêt fut rendue possible par l'ajout de bouts flottants comportant des sites de restrictions aux primers utilisés pour l'amplification du gène *mCherry*. Un site *EcoRV* fut ajouté au niveau du bout flottant du primer 3 contenant également le début de la séquence *mCherry* à l'exception du codon start. Le primer 4 quant à lui, contient un site de restriction *XhoI* au niveau du bout flottant du primer ainsi qu'une séquence correspondant aux derniers codons de *mCherry* incluant le codon stop. La perte du codon start va empêcher l'expression de la CDS *mCherry* seule.

Les produits d'amplification à bouts protrudants vont être ligués dans un pGemT-easy linéarisé. Les produits de ligation furent transformés dans une souche d'*Escherichia coli* DH10B par électroporation. Les bactéries furent étalées sur des boîtes de Petri de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal et de l'IPTG pour la réalisation de tests bleu-blanc comme dans la stratégie de construction de vecteurs pour l'obtention de fusions de *mCherry* en aval d'une ORF. Des mini-préparations furent réalisées dans le but d'extraire l'ADN plasmidique. Cet ADN fut digéré via les enzymes de restriction *EcoRV* et *XhoI*. Les résultats obtenus après restriction présentèrent des fragments de 0.7 Kb correspondant à la séquence de la CDS *mCherry*. Huit clones furent séquencés pour vérifier l'absence de mutations dans la séquence.

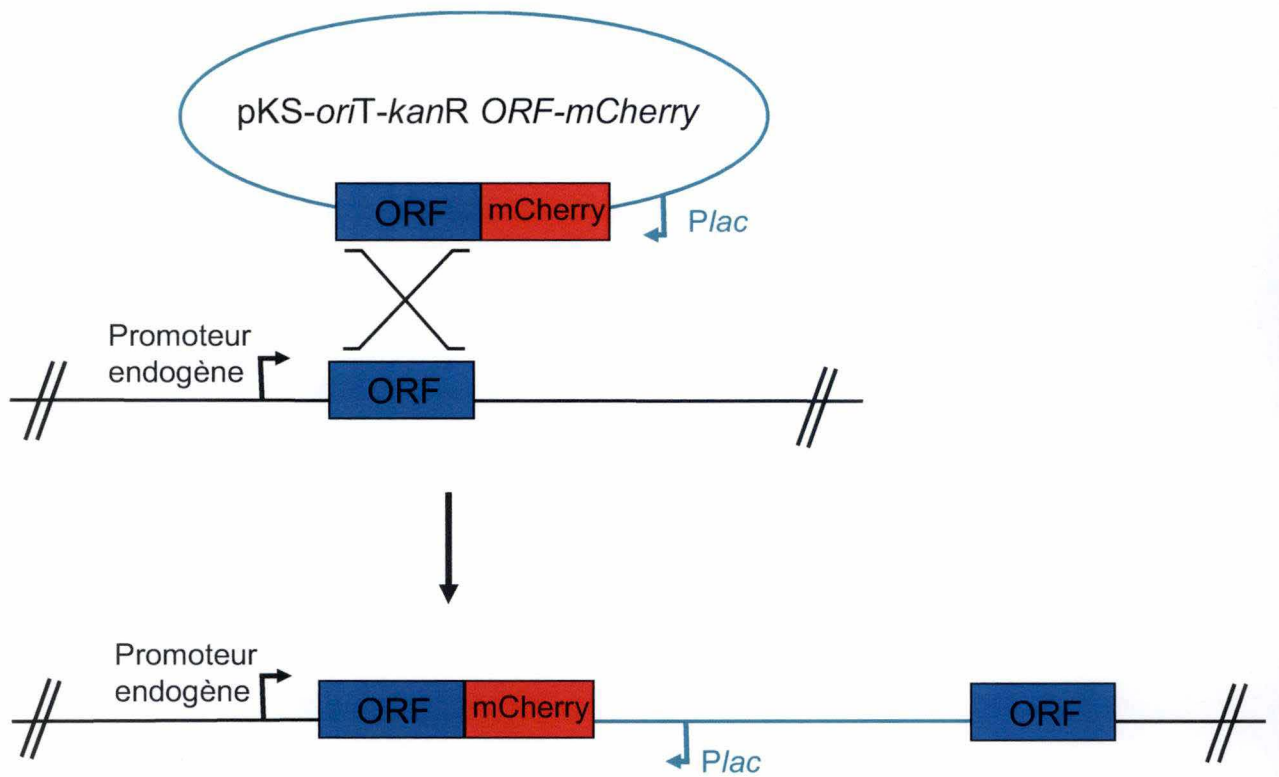


Figure 17: Schéma représentant l'intégration du *pKS-oriT-kanR-ORF-mCherry* au niveau du génome bactérien. La fusion génique *ORF-mCherry* va alors se placer sous le contrôle du promoteur endogène.

Les résultats n'indiquèrent aucune mutation au niveau du gène encodant *mCherry*. Le plasmide obtenu fut appelé pMD002.

Ensuite, la séquence *mCherry* fut extraite du pMD002 via l'action des enzymes de restriction *EcoRV* et *XhoI*. De plus, le pMD002 fut également restreint via l'enzyme de restriction *ScaI* agissant au niveau du gène *bla* encodant la résistance à l'Ampicilline comme pour la stratégie employée pour les fusions de la séquence *mCherry* fusionnée en amont d'une ORF. Par après, la séquence *mCherry* fut liguée dans le pKS-oriT précédemment linéarisé par *EcoRV* et *XhoI* au niveau du gène *lacZ'*. Les produits de ligation furent ensuite transformés dans des souches DH10B électrocompétentes. Les bactéries furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal et de l'IPTG pour effectuer un test bleu-blanc. L'ADN plasmidique fut extrait et restreint avec les enzymes de restriction *NcoI* et *EcoRI*. Les bandes obtenues, à savoir 3.5 Kb et 0.44 Kb, correspondent à la somme des tailles du pKS-oriT et de la séquence de *mCherry*. Le plasmide obtenu fut appelé pMD004.

Une cassette Gateway® (K7 *GWB*) fut ensuite clonée au niveau du pMD004 pour permettre par après la réalisation de réactions LR. Pour ce faire, la cassette Gateway® B fut extraite du pSKB^(Van Mullem, 2004) via une digestion avec l'enzyme *EcoRV*. Une bande de 1.7 Kb, correspondant à la K7 *GWB*, fut obtenue. Par après, la cassette fut purifiée via une technique d'extraction sur gel. Ensuite, ce produit purifié fut ligué en amont de la séquence *mCherry* au niveau du pMD004 précédemment coupé par l'enzyme de restriction *EcoRV*. Le produit de ligation fut transformé dans une souche d'*E. coli* DB3.1 électrocompétentes et résistante à la protéine encodée par le gène *ccdB*. Les bactéries transformées furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de l'Ampicilline, du X-gal et de l'IPTG pour réaliser un test bleu-blanc dans le but d'identifier les clones recombinants. L'ADN plasmidique des candidats après sélection fut extrait et digéré via l'enzyme *NcoI*. Les résultats montrèrent des fragments de 1.4 Kb et 4.2 Kb représentant la taille totale du plasmide pKS-oriT contenant la séquence *mCherry* ainsi que la K7 *GWB* insérée dans la même orientation que *mCherry*. Ce plasmides fut appelé pMD006.

Pour permettre l'intégration de la construction dans le génome bactérien sous le contrôle du promoteur endogène, le pMD006 fut conçu pour permettre le placement de la séquence de fusion (*GWB-mCherry*) dans le sens inverse par rapport au *Plac* (**Fig17**). Cette orientation inverse par rapport au *Plac* permet, après intégration chromosomique, de placer la fusion sous le contrôle du promoteur natif et ainsi de tenter de respecter le niveau d'expression endogène.

Pour permettre la production de protéines en fusion avec *mCherry* dans un vecteur répliatif, la séquence *GWB-mCherry* fut extraite du pMD006 par les enzymes de restriction *SacI* et *XhoI*. Ce fragment fut ensuite purifié par la technique d'extraction sur gel et cloné dans un pMR-Nours préalablement digéré par *XhoI* et *SacI*. Les produits de ligation furent transformés dans une souche DB3.1 électrocompétentes. Les bactéries transformées furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de la Nourséothricine, du X-gal et de l'IPTG pour le test bleu-blanc. L'ADN plasmidique fut extrait et restreint par l'enzyme *EcoRI*. Les résultats de la restriction montrèrent des fragments de 0.5 Kb, 2 Kb et 8.5 Kb représentant la taille totale du pMR-Nours possédant la séquence *mCherry* ainsi que la K7 *GWB*. Ce plasmide fut appelé pMD008. Pour permettre son introduction chez *Brucella abortus*, ce plasmide fut transformé dans une souche d'*Escherichia coli* S17-1 électrocompétentes permettant la conjugaison avec *Brucella abortus*.

Au niveau du pMD006 un gène *NPTI* encodant la résistance à la kanamycine (Kan^r) fut introduit pour permettre la sélection et l'intégration du plasmide.

En effet, les expérimentateurs se sont rendu compte que les dérivés de la pénicilline n'agissaient pas de manière efficace contre les *Brucella spp.* En effet, ces dérivés possèdent

un temps de demi-vie assez court et se font rapidement dégrader dans le milieu alors que le temps de génération des *Brucella spp.* est élevé. Le gène *NPTI* fut extrait du pUC4-Kan par l'enzyme de restriction *SalI*. La récupération de ce fragment se fit par la méthode d'extraction sur gel. Le gène *NPTI* fut ligué dans le pMD006 préalablement restreint par l'enzyme *XhoI*. Le produit de ligation fut transformé dans une souche DB3.1 électrocompétentes. Les bactéries transformées furent étalées sur des boîtes de LB Agar contenant de la Kanamycine. L'ADN plasmidique fut extrait et restreint grâce à l'enzyme de restriction *NcoI*. Les fragments obtenus présentèrent des tailles de 5.5 Kb correspondant au plasmide pMD006 et 1.5 Kb correspondant au gène *NPTI*. Le plasmide formé fut nommé pMD009. Celui-ci peut être impliqué dans une réaction LR où la *K7 GWB* sera remplacée par une ORF de *Brucella spp.* Ce plasmide fut alors introduit dans une souche d'*Escherichia coli* S17-1 permettant d'effectuer une conjugaison avec *Brucella spp.* Chez *Brucella abortus*, le vecteur plasmidique va pouvoir s'intégrer au niveau du génome de *Brucella spp.*

Nom du plasmide	Contenu du plasmide
pMD001	pGemT-easy- <i>mCherry</i> -N-term
pMD002	pGemT-easy- <i>mCherry</i> -C-term
pMD003	pKS-oriT- <i>mCherry</i> -N-term
pMD004	pKS-oriT- <i>mCherry</i> -C-term
pMD005	pKS-oriT- <i>mCherry</i> -GWA
pMD006	pKS-oriT-GWB- <i>mCherry</i>
pMD007	pMR-Nours- <i>mCherry</i> -GWA
pMD008	pMR-Nours-GWB- <i>mCherry</i>
pMD009	pKS-oriT-KanR GWB- <i>mCherry</i>

Table 1 : Tableau récapitulatif des différents vecteurs construits. A gauche, dénomination des plasmides. A droite, caractéristiques des plasmides.

• Vérification des vecteurs

Une série de test furent effectués sur les vecteurs construits de manière à vérifier la bonne construction de ceux-ci. En effet, ces plasmides doivent être compatibles avec le système Gateway® et doivent également permettre l'expression de l'ORF en fusion avec *mCherry*. De plus, la protéine *mCherry* ne doit pas interférer dans la distribution cellulaire de la protéine d'intérêt à laquelle elle est fusionnée et pouvoir rester stables dans les conditions de test. Pour effectuer ces contrôles, nous avons fusionnés trois *ORFs* à ces vecteurs, à savoir *pdhS*, *fumC* et *fumA*. Le choix de ces trois *ORFs* ne fut pas laissé au hasard. En effet, de nombreuses localisations ont été réalisées avec *FumA*, *FumC* et *PdhS* fusionnés à des sondes fluorescentes dérivant de la GFP (J. Mignolet non publié et Hallez *et al.*, 2007). En effet, les fusions *PdhS*-YFP, *PdhS*-CFP et *PdhS*-GFP présentent une localisation polaire au niveau du vieux pôle de la grande cellule chez *Brucella abortus* (J. Mignolet non publié et Hallez *et al.*, 2007). *FumC*-YFP quant à lui, colocalise avec la fusion protéique *PdhS*-YFP. Quant à la localisation de *FumA*, une distribution diffuse du signal fluorescent est observée dans la cellule. Pour s'assurer de la construction correcte de nos vecteurs, les fusions de *FumA*, *FumC* et *PdhS* avec la protéine *mCherry* devraient montrer le même pattern de localisation que lors des fusions avec les dérivés de la GFP.

Pour les observations au microscope, les souches de *Brucella abortus* possédant nos plasmides d'intérêt furent inoculés en préculture dans un milieu sélectif. La veille de l'observation, des cultures furent générées à partir des précultures réalisées le jour d'avant. Le jour même, l'observation de souches arrivées à une DO^{600} de 0.5 s'effectue sur *Agarose pad* afin de garder les cellules vivantes (voir **matériels et méthodes**). Les observations des bactéries se font en DIC (contraste interférentiel différentiel, *Normarski*). Deux rayons séparés spatialement par une très courte distance traversent les spécimens en deux points différents mais très proches. Si ces deux rayons lumineux traversent des matériaux cellulaires de densités différentes, par exemple une membrane phospholipidique pour l'un et le cytoplasme pour l'autre, ces rayons subiront un déphasage différents. Suivant la différence de phase entre ces rayons, un contraste positif ou négatif sera généré mettant ainsi en évidence les structures cellulaires via des nuances de gris.

Pour les observations en microscopie à épifluorescence, les longueurs d'ondes utilisées correspondent aux longueurs d'ondes du TxRed (Longueurs d'ondes maximales : 558 d'excitation et 583 d'émission). L'entièreté des images de fluorescence furent prises avec un temps d'excitation de 500 ms excepté les images en fluorescence chez *E. coli* où le temps d'exposition fut réduit à 10 ms.

Profils de localisation des fusions de contrôles à partir des vecteurs construits chez *Brucella abortus*

Constructions des différentes souches

Les séquences codantes de *pdhS*, *fumC* et *fumA* sont accessibles au sein de l'ORFéome de *Brucella melitensis* dans les plasmides pDONR201 compatibles avec le système Gateway® disponibles dans notre laboratoire (^{Dricot et al., 2004}).

Des réactions LR entre le pDONR201-*pdhS* et les pMD007, pMD008 et pMD009 furent réalisées dans le but de générer les plasmides suivant : pMR-Nours-*mCherry-pdhS*, pMR-Nours-*pdhS-mCherry* et pKS-oriT-*kanR-pdhS-mCherry*. Ces constructions furent ensuite électroporées dans des souches d'*E. coli* S17-1 possédant la capacité d'effectuer une conjugaison avec *B. abortus* 544. Cette conjugaison va permettre le transfert du vecteur chez *B. abortus*.

Egalement, des réactions LR entre le pDONR201-*fumC* et les trois plasmides de destination furent réalisées et menant à l'obtention de pMR-Nours-*mCherry-fumC*, pMR-Nours-*fumC-mCherry* et pKS-oriT-*kanR-fumC-mCherry*. Ces constructions furent également introduites via électroporation dans la souche *E. coli* S17-1.

Finalement, le pDONR201-*fumA* subit aussi des réactions LR avec les plasmides pMD007 et pMD008 formant les constructions suivantes : pMR-Nours-*mCherry-fumA* et pMR-Nours-*fumA-mCherry*. Ces constructions furent aussi introduites dans une souche S17-1 électrocompétentes.

Des colonies d'*E. coli* poussèrent sur chacune des boîtes de Petri contenant du milieu sélectif, suggérant que le échanges entre les *K7GW* et les *ORFs* d'intérêts furent réalisables. La réalisation de réaction LR fut donc confirmée via des restrictions enzymatiques, indiquant que nos vecteurs sont bel et bien compatibles avec le système Gateway®.



Visualisation de la fusion protéique PdhS-mCherry chez *Brucella abortus*

- Vecteurs répliatifs pMR-Nours-*pdhS-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-pdhS*

Les plasmides pMR-Nours-*pdhS-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-pdhS* furent introduits séparément dans la souche sauvage de *Brucella abortus* 544 par conjugaison (voir **matériel et méthodes**). Trois précultures liquides à partir de trois clones indépendants poussant sur boîte de Petri pour chacun de ces deux plasmides furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures furent générées à partir des ces précultures. Le jour de l'observation, des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* pour les cultures atteignant une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope.

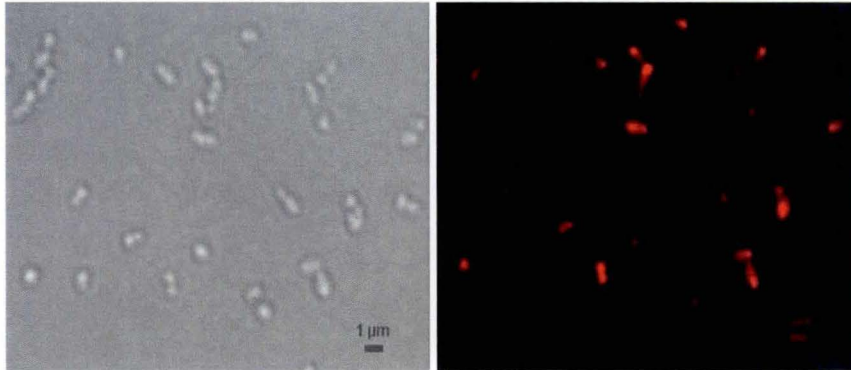


Figure 18 : Visualisation de la localisation de la fusion protéique PdhS-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-*pdhS-mCherry*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

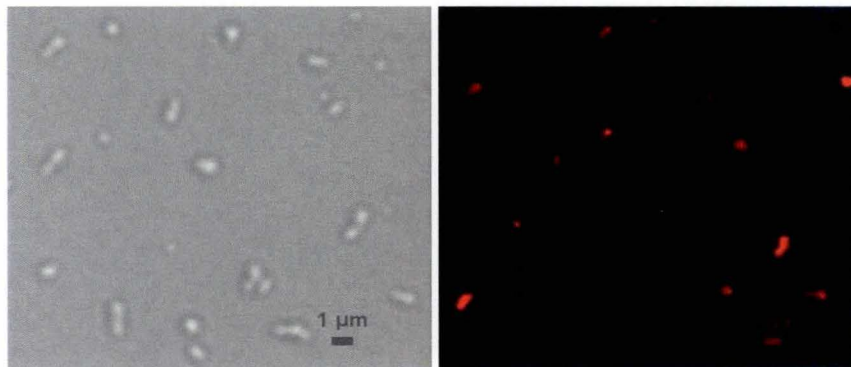


Figure 19 : Visualisation de la fusion protéique mCherry-PdhS dans une souche *Brucella abortus* pMR-*mCherry-pdhS*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

Des foci fluorescents sont observés au pôle pour les trois clones indépendants, suggérant que les fusions *pdhS-mCherry* et *mCherry-pdhS* présentent une localisation polaire chez *Brucella abortus* 544 pMR-Nours *pdhS-mCherry* et chez *Brucella abortus* 544 pMR-Nours-*mCherry-pdhS*.

- Vecteurs intégratifs pKS-*oriT-kanR-pdhS-mCherry*

Le plasmide pKS-*oriT-kanR-pdhS-mCherry* fut introduit dans une souche sauvage de *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Une intégration du plasmide, via une recombinaison

homologue, va se produire de manière à placer la fusion *pdhS-mCherry* sous le contrôle du promoteur endogène du gène *pdhS* (**Fig17**). Trois précultures liquides à partir de trois clones indépendants poussant sur boîte de Petri pour chacun de ces deux plasmides furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures furent générées à partir de ces précultures. Le jour de l'observation, des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* pour les cultures atteignant une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope (**Fig20**).

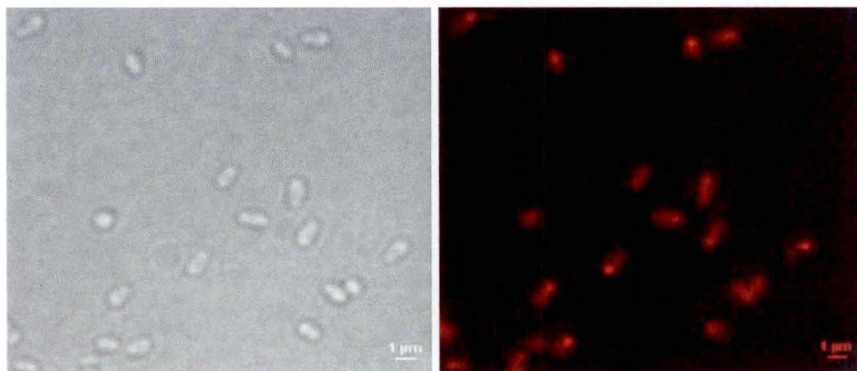


Figure 20 : Visualisation de la fusion protéique PdhS-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

Des foci lumineux polaires sont observés au pôle, suggérant que la fusion PdhS-mCherry est localisée au pôle dans une souche *Brucella abortus* 544 pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry.

Localisation de FumC fusionné à mCherry chez *Brucella abortus*

- Vecteurs réplicatifs pMR-Nours-*fumC-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-fumC*

Les plasmides pMR-Nours-*fumC-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-fumC* furent introduits séparément dans la souche de *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Trois précultures liquides à partir de trois clones indépendants poussant sur boîte de Petri pour chacun de ces deux plasmides furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures furent ensemencées à partir de ces précultures. Le jour de l'observation, des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* pour les cultures atteignant une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope (**Fig21** et **Fig22**).

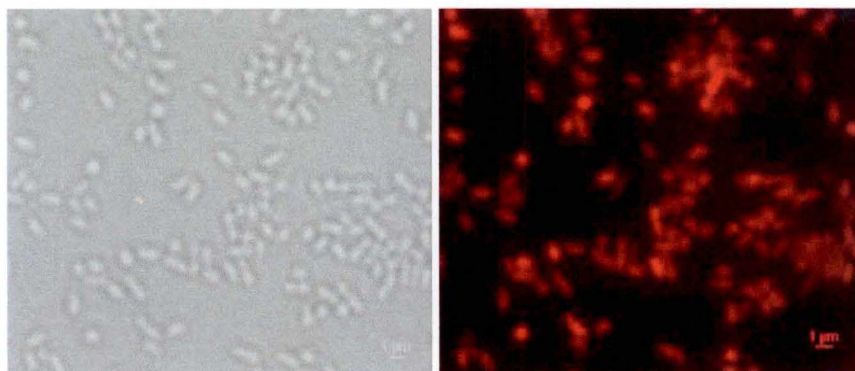


Figure 21 : Visualisation de la localisation de la fusion protéique FumC-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-*fumC-mCherry*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

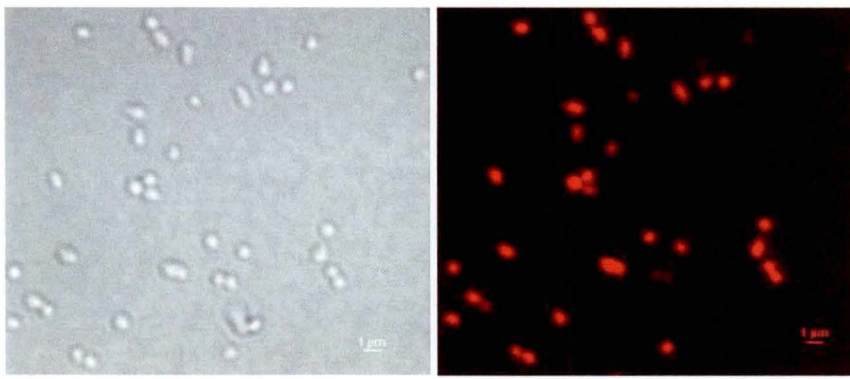


Figure 22 : Visualisation de la localisation de la fusion protéique mCherry-FumC dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-mCherry-fumC. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 μm .

Aucun focus fluorescent polaire n'est observé suggérant que les fusions mCherry-FumC et FumC-mCherry produits à partir des plasmides répliatifs pMR-Nours-mCherry-fumC et pMR-Nours-fumC-mCherry chez *Brucella abortus* 544 ne localisent pas au vieux pôle de la grande cellule. Ces données sont en contradiction avec les observations de localisation polaire de FumC-YFP chez *Brucella abortus* 544 et seront évoqués dans la partie **Discussion**.

- Vecteurs intégratifs pKS-oriT-kanR-fumC-mCherry

Le plasmide pKS-oriT-kanR-fumC-mCherry fut introduit dans une souche de *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Une intégration du plasmide, via une recombinaison homologue, va se produire de manière à placer la fusion FumC-mCherry sous le contrôle du promoteur endogène du gène *fumC* (**Fig17**). Trois précultures liquides à partir de trois clones indépendants poussant sur boîte de Petri pour chacun de ces deux plasmides furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures furentensemencées à partir de ces précultures. Le jour de l'observation, des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* pour les cultures atteignant une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope (**Fig23**).

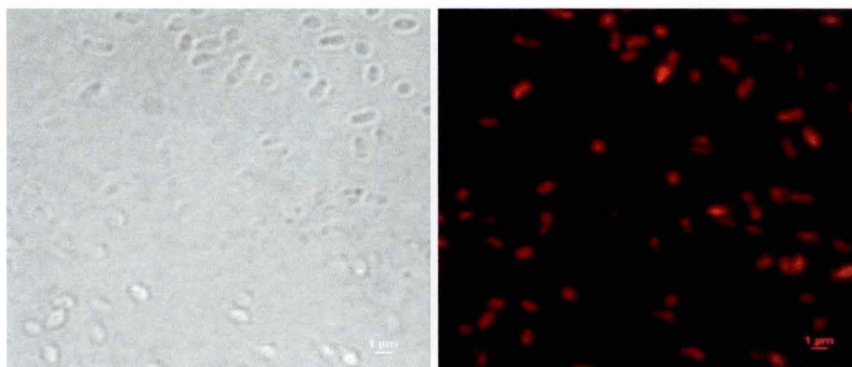


Figure 23 : Visualisation de la fusion protéique FumC-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pKS-oriT-kanR-fumC-mCherry. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 μm .

Des foci polaires fluorescents sont observés pour FumC-mCherry dans une souche *Brucella abortus* 544 contenant le plasmide pKS-oriT-kanR-fumC-mCherry. Ces données suggèrent que la fusion FumC-mCherry localise au pôle chez *Brucella abortus* 544 lorsque la fusion est exprimée à partir du locus chromosomique, mais ne localise pas lorsque cette fusion est portée par le plasmide répliatif pMR-Nours.

Localisation de FumA fusionné à mCherry chez *Brucella abortus*

- Vecteurs réplcatifs pMR-Nours-*fumA-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-fumA*

Les plasmides pMR-Nours-*fumA-mCherry* et pMR-Nours-*mCherry-fumA* furent introduits séparément dans une souche de *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Trois précultures liquides à partir de trois clones indépendants poussant sur boîte de Petri pour chacun de ces deux plasmides furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures furentensemencées à partir des ces précultures. Le jour de l'observation, des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* pour les cultures atteignant une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope (Fig24 et Fig25).

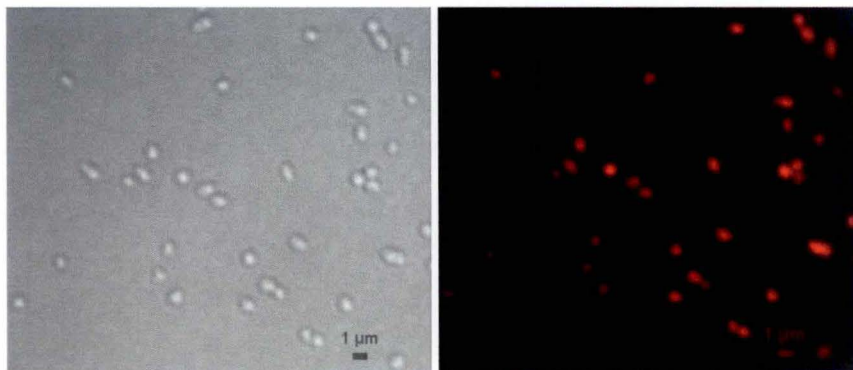


Figure 24 : Visualisation de la fusion protéique FumA-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours *fumA-mCherry*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

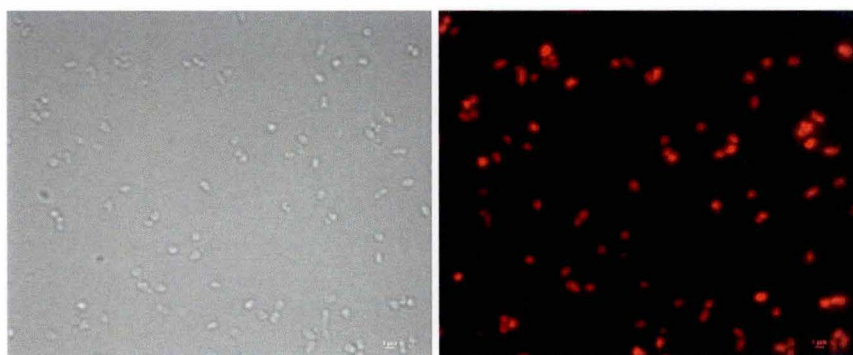


Figure 25 : Visualisation de la fusion protéique mCherry-FumA dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours *mCherry-fumA*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

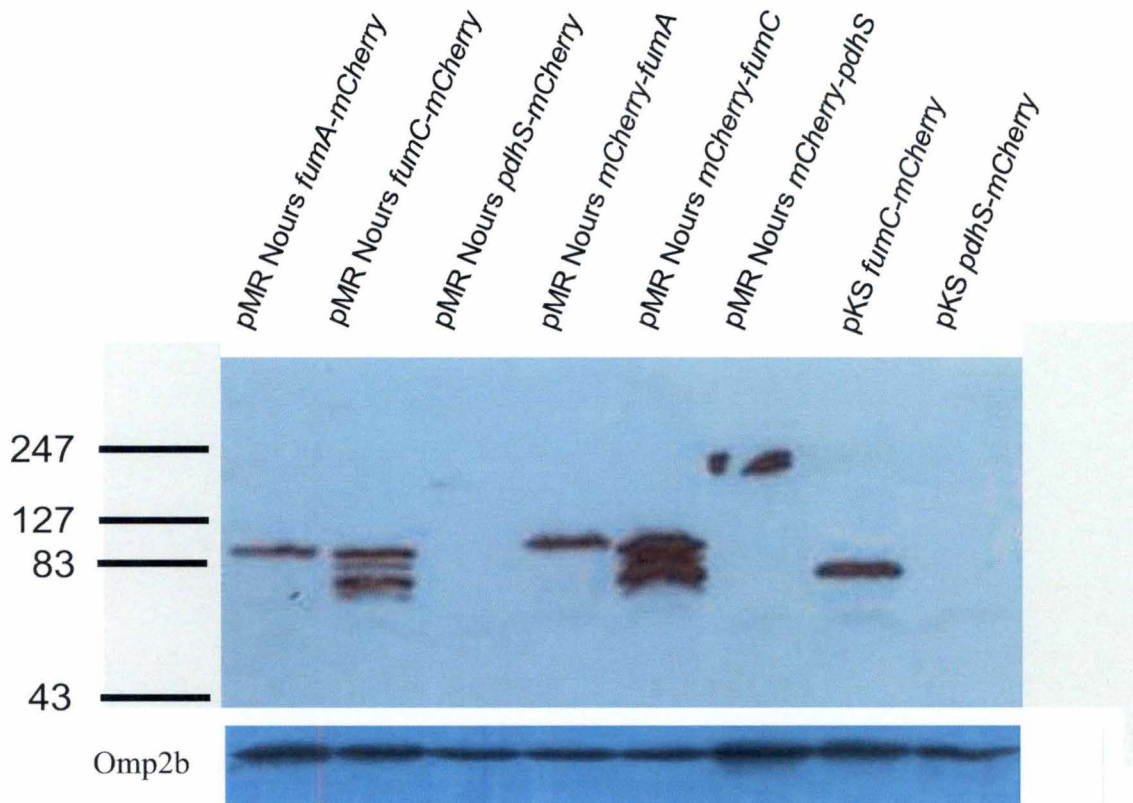
Aucun focus fluorescent polaire n'est observé, suggérant qu'aucune localisation polaire de FumA-mCherry ou mCherry-FumA n'est détectée après introduction des plasmides pMR-Nours-*mCherry-fumA* ou pMR-Nours-*fumA-mCherry* dans une souche *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*. Ces observations présentent la même distribution de FumA que pour la fusion FumA-YFP chez *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp* (Johann Mignolet, thèse en cours).

Stabilité des fusions protéiques

Les fusions FumC-mcherry et mCherry-FumC ne localisent pas de façon polaire lorsqu'elles sont produites à partir de vecteurs réplcatifs tandis qu'une fusion FumC-mCherry produite à partir d'un vecteur intégratif localise au niveau du vieux pôle de la grande cellule de *Brucella*

abortus. De plus, l'observation de foci polaires au niveau du vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* ne prouve pas que la protéine d'intérêt se trouve localisée à ce même pôle. En effet, la présence de signaux fluorescents polaires peut être le reflet de la localisation préférentiellement polaire de la protéine mCherry seule. Pour tenter de comprendre la localisation non-polaire de FumC en « répliatif », ainsi que pour vérifier la stabilité des fusions entre les protéines d'intérêts et mCherry, un western blot fut réalisé (voir **matériel et méthode**).

Les extraits protéiques utilisés pour le western blot furent réalisés à partir de cultures de *Brucella abortus* présentant une DO^{600} de 0.5. Huit cultures furent inoculées à partir des clones observés présentant un signal fluorescent. L'anticorps primaire utilisé pour l'étape de révélation est un anticorps de lapin anti-DsRed possédant la faculté de reconnaître les dérivés de la mFRP1 dont, notamment, mCherry^(Roger Tsien). Cet anticorps, dirigé contre mCherry va permettre l'observation de la fusion protéique à condition que les fusions protéiques soient stables. L'anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase. Après révélation, nous obtenons des résultats présentés sur le film autoradiographique suivant.



Résultats :

Fusions protéiques	PdhS-mCherry/ mCherry-PdhS	FumC-mCherry/ mCherry-FumC	FumA-mCherry/ mCherry-FumA
Poids moléculaires attendus	138,4 KDa	76,2 Kda	85,7 Kda

Par comparaison avec les marqueurs de poids moléculaires, les bandes correspondant aux fusions de FumA-mCherry et mCherry-FumA se retrouvent à la taille attendue.

Toutes les bandes correspondant aux fusions de mCherry à PdhS ne sont pas visibles. En effet, le puits où se trouve la fusion PdhS-mCherry générée à partir d'un pKS-oriT-kanR *pdhS-mCherry* n'est pas visible, celle provenant d'un pMR-Nours *pdhS-mCherry* présente un signal à peine visible. Par contre, la fusion mCherry-PdhS produite à partir du pMR-Nours *mCherry-pdhS* présente une bande bien visible. Le contrôle de charge Omp2b indique la présence de protéines dans chacun des puits. Cette hétérogénéité dans la présence des bandes représentant des fusions à PdhS pourrait s'expliquer par la difficulté de transfert de la protéine au niveau de la membrane de nitrocellulose. Cette difficulté de transfert est due à la taille importante de la protéine PdhS. Ce problème a déjà été rencontré dans des travaux antérieurs sur PdhS (Johann Mignolet, thèse en cours).

Les problèmes rencontrés lors des observations réalisées sur les fusions FumC-mCherry et mCherry-FumC trouvent un écho dans les résultats de ce western blot. En effet, la fusion FumC-mCherry présente une bande unique bien visible à la taille attendue lors d'une production à partir du plasmide intégratif pKS-oriT-kanR-*fumC-mCherry*. Par contre, les bandes représentant des fusions où figure FumC, exprimées en répliatif à partir d'un pMR-Nours, montrent plus d'une bande par puits. Ces résultats seront évoqués plus tard dans la partie **Discussion**.

Le contrôle de charge, quant à lui, montre que tous les puits furent chargés, et de façon similaire, permettant ainsi la comparaison des intensités de bandes entre chaque puits.

Le western blot confirme que nos vecteurs ont été correctement construits et permettent la production de fusions protéiques stables.

N° d'ORF	Pool	Annotations	Taille (Kb)
BMEI1155	2	NADH dehydrogenase subunit D	1,188
BMEI1899	1	cytochrome c oxidase, subunit III	0,627
BMEI1151	2	NADH dehydrogenase subunit H	1,041
BME1901	1	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	1,023
BMEI0473	1	Rieske iron-sulfur protein:Rieske [2Fe-2S] domain:twin-arginine translocation pathway signal:ubiquinol-cytochrome c	0,579
BMEI1157	1	NADH dehydrogenase I, B subunit	0,6
BMEI1156	1	NADH dehydrogenase I, C subunit	0,606
BMEI1149	1	NADH dehydrogenase subunit J	0,615
BMEI1150	1	NADH dehydrogenase subunit I	0,489
BMEI1158	1	NADH dehydrogenase subunit A	0,363
BMEI1898	1	cytochrome c oxidase subunit IV	0,444
BMEI1147	3	NADH dehydrogenase subunit L	1,983
BMEI1146	3	NADH dehydrogenase subunit M	1,506
BMEI1148	1	NADH dehydrogenase subunit K	0,306
BMEII0786	2	flavin-containing monooxygenase FMO:pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, class I:FAD-dependent pyridine	1,272
BMEII0259	1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kd subunit	0,984
BMEI1152	3	NADH dehydrogenase subunit G	2,082
BMEI1900	3	cytochrome o subunit I	1,977
BMEI1145	2	NADH dehydrogenase subunit N	1,434
BMEI1153	2	NADH dehydrogenase I, F subunit	1,305
BMEI0474	2	terminal	1,296
BMEII0786	2	flavin-containing monooxygenase FMO:pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, class I:FAD-dependent pyridine	1,272
BMEI0475	1	cytochrome c heme-binding site:ribosomal protein P2:cytochrome c1	0,885
BMEI1565	1	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	0,729
BMEI1154	1	NADH dehydrogenase subunit E	0,711
BMEII0760	3	cytochrome bd ubiquinol oxidase, subunit I	1,671
BMEII0759	2	cytochrome bd ubiquinol oxidase, subunit II	1,065
BMEI1564	3	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	1,623
BMEI1566	2	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III	0,861
BMEI0162	1	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	0,777
BMEI0161	3	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1,839
BMEI0160	1	hypothetical protein	0,393
BMEI0159	1	succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit	0,396
BMEI0836	4	Citrate synthase	1,29
BMEII0413	4	Citrate lyase	0,873
BMEI0266	4	Pyruvate carboxylase	3,4
BMEI0791	4	Isocitrate dehydrogenase	2,685
BMEI0140	4	α -cetoglutarate dehydrogenase	3,012
BMEI0141	4	α -cetoglutarate dehydrogenase	1,224
BMEI0138	4	Succinyl-CoA synthetase	1,194
BMEI1016	4	Fumarate hydratase classe I (FumA)	1,617
BMEII1051	4	Fumarate hydratase classe II (FumC)	1,389
BMEI0137	4	Malate dehydrogenase	0,96
BMEII1005	4	Malate dehydrogenase	1,035

Table 2 : Tableaux reprenant les ORFs du génome de *Brucella spp.* utilisés pour la génération des pools. La colonne BME indique le nom porté par chacune de ces ORFs dans l'ORFéome. La colonne Pool indique les regroupements de pDONR201 effectués. La colonne Annotations indique dans quel complexe se situent ces différentes ORFs. La dernière colonne indique la taille de chaque ORF en Kb.

Tester les hypothèses

Les séquences d'ADN encodant les protéines faisant partie de la chaîne de transport d'électrons ainsi que du cycle de Krebs sont présentes dans l'ORFéome de *Brucella melitensis* stockés dans des plasmides pDONR201 compatibles avec le système Gateway® (Dricot *et al.*, 2004). En raison du nombre important d'ORF à localiser, nous avons pris la décision de travailler en pools (Table 2).

Trois groupes d'ORFs furent créés pour les protéines de la chaîne de transport d'électrons suivant la taille de leurs séquences. En effet, un pool regroupant des séquences de tailles fort différentes générerait une compétition entre les différents clones. Des groupes homogènes en tailles furent donc générés dans le but d'éviter les compétitions.

Un pool unique fut construit pour regrouper les pDONR201 portant les gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs.

Une extraction plasmidique des 44 pDONR201 a été réalisée. Ensuite, une digestion des fragments obtenus avec l'enzyme de restriction *ScaI* a été effectuée dans le but de pouvoir estimer la concentration en ADN plasmidique dans chacune des extractions. Par après, les pools furent formés en tenant comptes des concentrations en ADN pour générer un pool possédant des plasmides pDONR201 en concentrations équivalentes.

Nous sommes conscients des risques encourus par l'utilisation de pool de pDONR201. Dû notamment à la compétition bactérienne pour la réplication, la diversité présente au niveau du pool de départ pourrait fortement se réduire. Voilà pourquoi, après chaque étape de transformation, nous avons veillé à avoir un nombre de clone suffisant pour représenter statistiquement la diversité. De plus, un test de diversité incluant des réactions de PCR et un western blot sera effectué afin de visualiser la diversité régnant au sein de nos pools observés au microscope.

- **Localisation de protéines de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs**

Trois pools de plasmides pDONR201 furent donc créés renfermant 17 pDONR201 pour le pool 1, 9 pDONR201 différents pour le pool 2 et 7 pDONR201 pour le pool 3. Les pDONR201 de ces pools contiennent les ORFs de la chaîne de transport d'électrons. Le premier pool regroupe les ORFs de moins de 1 Kb, le deuxième inclus les pools de 1 à 1.5 Kb, le dernier pool quant à lui renferme toutes les ORFs de taille plus grande que 1.5 Kb.

L'unique pool des pDONR201 du cycle de Krebs contient onze ORFs dont la taille varie de 0.873 Kb à 3.012 Kb.

Constructions des différentes souches

Des réactions LR entre les pools de pDONR201 possédant les ORFs de la chaîne de transport d'électrons (pDONR201-*e*⁻) et les pMD007 et pMD008 furent réalisées dans le but de former les plasmides suivant : pMR-Nours-*mCherry-e*⁻ et pMR-Nours-*e*⁻-*mCherry*. Egalement, des réactions LR entre les pools de pDONR201 possédant les ORFs du cycle de Krebs (pDONR201-*k*) et les pMD007 et pMD008 furent réalisées dans le but de former les plasmides suivant : pMR-Nours-*mCherry-k* et pMR-Nours-*k-mCherry*. Ces constructions

furent ensuite électroporées dans des souches d'*E. coli* S17-1 et sélectionnées sur milieu sélectif. Suite à une étape de conjugaison, ces plasmides furent introduits chez *B. abortus* 544 *pdhS-cfp*. La souche *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp* produit la fusion protéique PdhS-CFP représentant un marqueur du vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus*. Ce marqueur va permettre de localiser nos fusions protéiques par rapport au vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus*.

Les clones de *Brucella abortus* poussant sur boîte de Petri contenant du milieu sélectif furent inoculés en culture liquide. Dix cultures liquides furent poolées en une seule et observées.

Localisation des fusions entre les protéines de la chaîne de transport d'électrons et mCherry

- Vecteurs répliatifs pMR-Nours-*mCherry-e*⁻

Les plasmides pMR-Nours-*mCherry-e*⁻ furent introduits dans une souche de *B. abortus* 544 *pdhS-cfp*. Dix cultures liquides correspondant chacune à un clone furent inoculées la veille de l'observation. Le jour de l'observation, les dix cultures furent poolées en une seule et des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* lorsque les cultures atteignirent une DO⁶⁰⁰ de 0.5 pour l'observation au microscope.

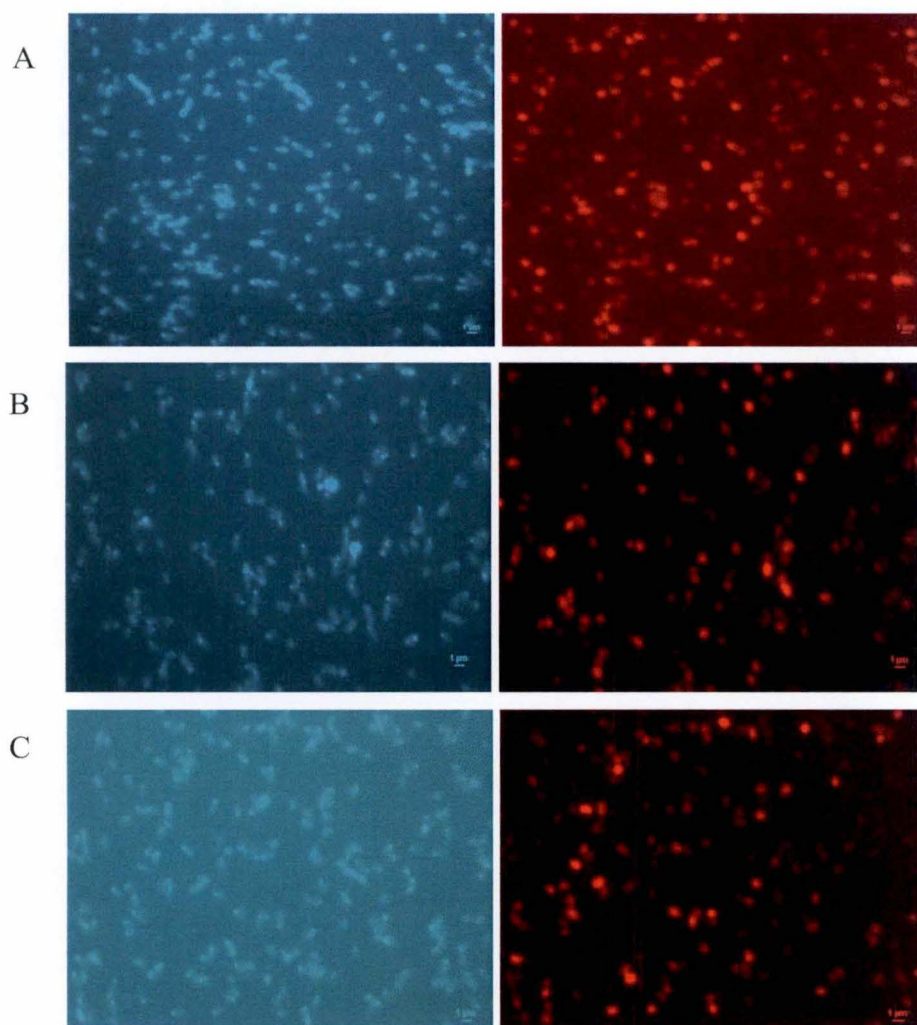


Figure 26 : Visualisation du pattern de localisation des fusions protéiques *mCherry-e*⁻ dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-*mCherry-e*⁻ *pdhS-cfp*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant à la CFP. A droite, canal correspondant au TxRed. La barre d'échelle représente 1 µm. A : Localisation du pool I de la chaîne de transport d'électrons. B : Localisation du pool II de la chaîne de transport d'électrons. C : Localisation du pool III de la chaîne de transport d'électrons.

Aucun foci polaire n'est observé, suggérant que les fusions mCherry- e^- ne localisent pas préférentiellement au pôle lorsque celle-ci sont produites à partir du pMR-Nours-mCherry- e^- chez *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*.

- pMR-Nours- e^- -mCherry

Les plasmides pMR-Nours- e^- -mCherry furent introduits dans une souche de *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*. Dix cultures liquides correspondant chacune à un clone furent inoculées la veille de l'observation. Le jour de l'observation, les dix cultures furent poolées en une seule et des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* lorsque les cultures atteignirent une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope.

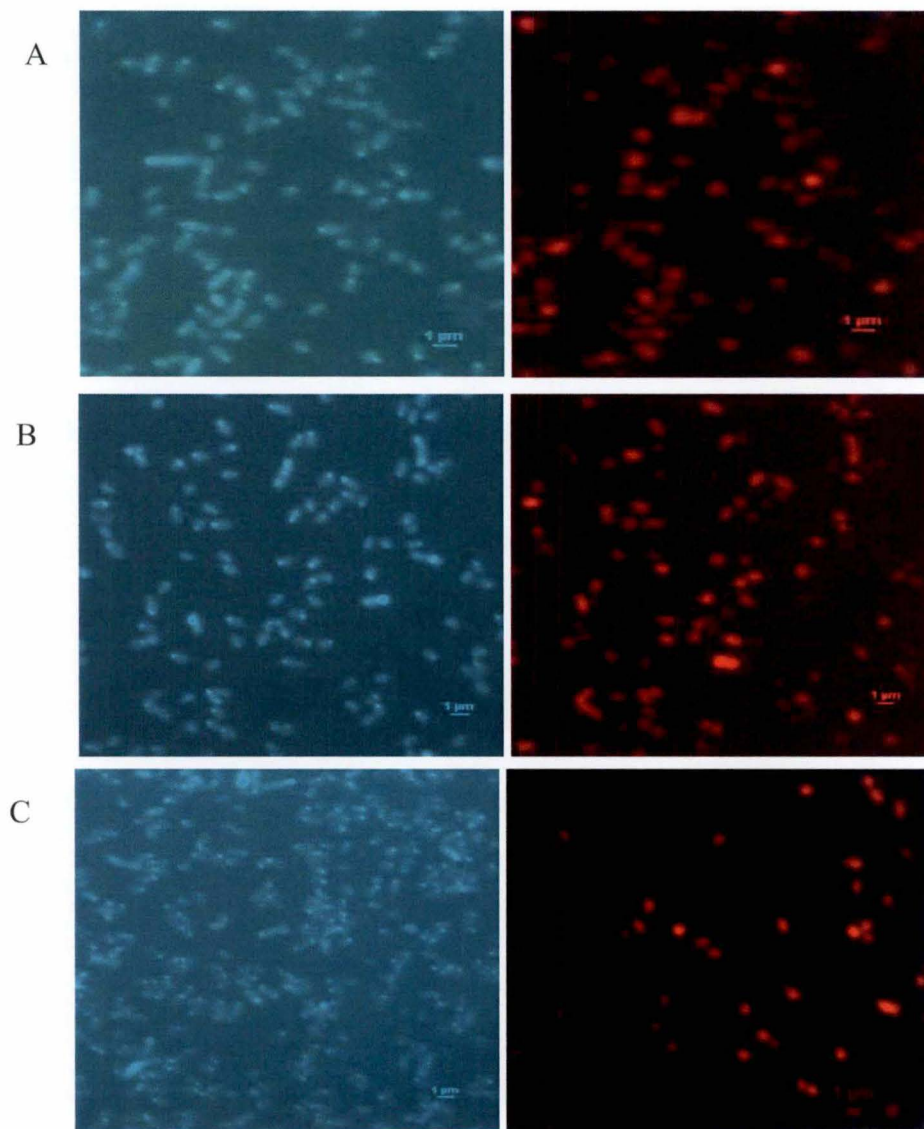


Figure 27 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique e^- -mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours- e^- -mCherry *pdhS-cfp*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant à la CFP. A droite, canal correspondant au TxRed. La barre d'échelle représente 1 μ m. A : Localisation du pool I de la chaîne de transport d'électrons. B : Localisation du pool II de la chaîne de transport d'électrons. C : Localisation du pool III de la chaîne de transport d'électrons.

De même que pour les fusions de mCherry du côté N-terminal des différentes protéines de la chaîne de transport d'électrons, aucun foci polaire n'est observé pour la fusion e^- -mCherry lorsque celle-ci est exprimée à partir du pMR-Nours- e^- -mCherry chez *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*.

L'absence de foci polaires correspondant aux fusions protéiques mCherry- e^- ou e^- -mCherry indiquent, que ce soit du côté N-terminal ou C-terminal, que les protéines formant la chaîne de transport d'électrons ne localisent pas de façon préférentielle au vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* lorsque leurs ORFs sont exprimés à partir d'un plasmide répliatif. En une introspection plus profonde, on observe pour certain clones une distribution annulaire des protéines de la chaîne de transport d'électrons ce qui signifie que les protéines fusionnées à la protéine mCherry sont bien ancrés en membrane.

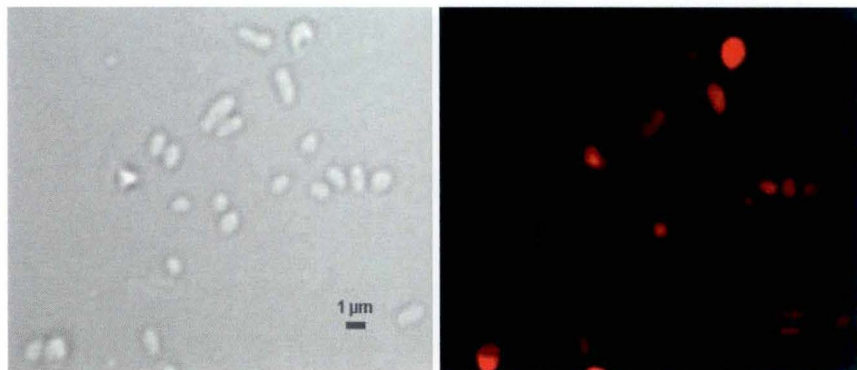


Figure 28 : Visualisation de la distribution membranaire de la fusion protéique e^- -mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours- e^- -mCherry. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 1 µm.

Localisation des fusions entre les protéines du cycle de Krebs fusionnés à la mCherry

- Vecteurs répliatifs pMR-Nours-mCherry-k

Les plasmides pMR-Nours-mCherry-k furent introduits dans une souche de *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*. Dix cultures liquides correspondant chacune à un clone furent inoculées la veille de l'observation. Le jour de l'observation, les dix cultures furent poolées en une seule et des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* lorsque les cultures atteignirent une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope.

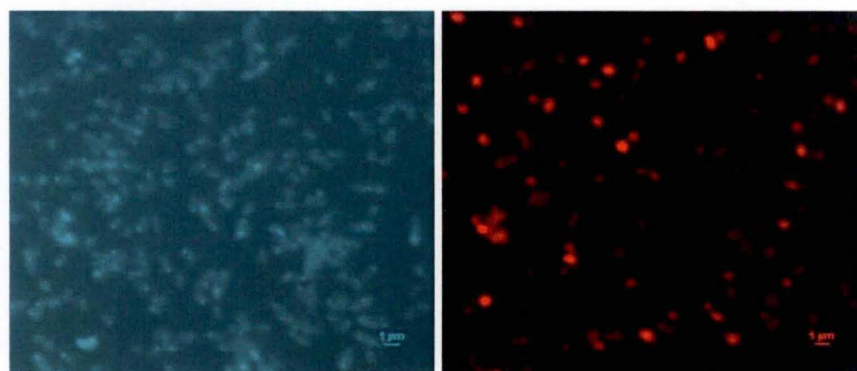


Figure 29 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique mCherry-k dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-mCherry-k *pdhS-cfp*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant à la CFP. A droite, canal correspondant au TxRed. La barre d'échelle représente 1 µm.

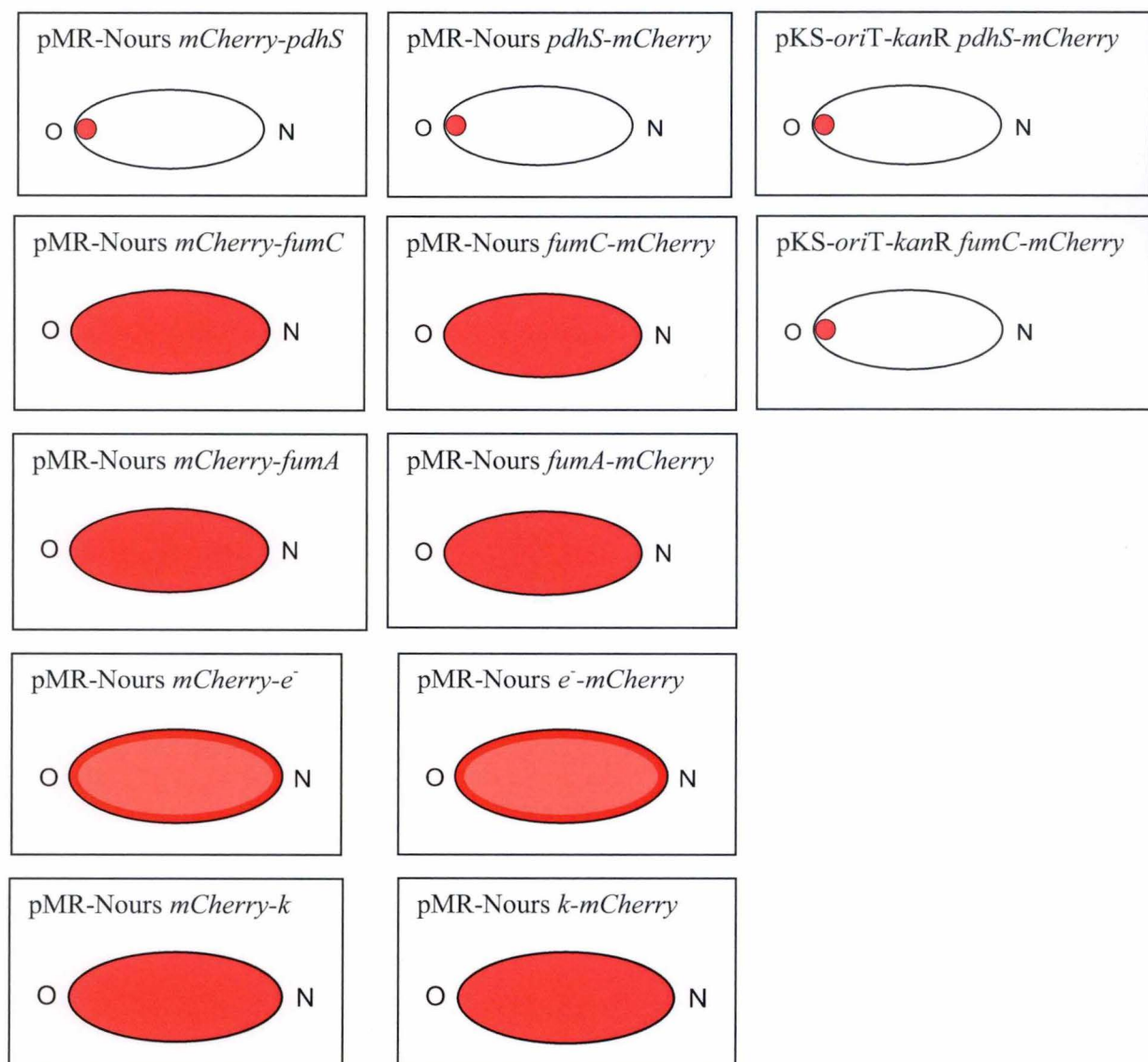


Figure 30 : Schéma récapitulatif des patterns de localisation. O correspond au vieux pôle de la bactérie. N correspond au nouveau pôle de la bactérie

Aucun foci polaire n'est observé, suggérant que les fusions protéiques mCherry-k ne localisent pas préférentiellement au pôle lorsque celles-ci sont exprimées à partir du pMR-Nours *mCherry-k* chez *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*.

- pMR-Nours-*k-mCherry*

Les plasmides pMR-Nours *k-mCherry* furent introduits séparément dans une souche de *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*. Dix cultures liquides correspondantes chacune à un clone furent inoculées la veille de l'observation. Le jour de l'observation, les dix cultures furent poolées en une seule et des bactéries furent disposées sur *Agarose pad* lorsque les cultures atteignirent une DO^{600} de 0.5 pour l'observation au microscope.

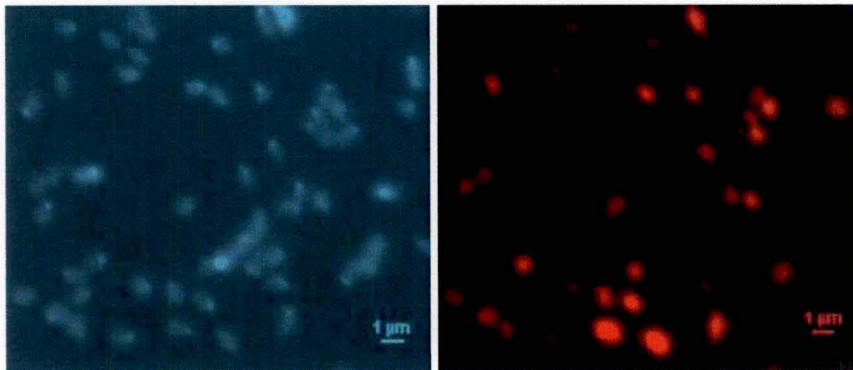


Figure 31 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique k-mCherry dans une souche *Brucella abortus* pMR-Nours-*k-mCherry* *pdhS-cfp*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant à la CFP. A droite, canal correspondant au TxRed. La barre d'échelle représente 1 µm.

De même que pour les fusions où mCherry est fusionnées du côté N-terminal des protéines du cycle de Krebs, aucun focus polaire n'est observé pour la fusion k-mCherry lorsque celle-ci est exprimée à partir du pMR-Nours-*k-mCherry* chez *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp*.

Le cycle de Krebs ne semble donc pas localiser préférentiellement au niveau du vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* 544.

Diversité des pools

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, pooler des souches portant des plasmides différents risque d'entraîner une compétition au sein de la population bactérienne où un nombre restreint de clones pourraient se développer mieux que les autres et prendre le pas sur les autres souches. Pour tenter de limiter la perte de diversité au sein des pools nous avons regroupé les *ORFs* suivant leurs tailles (**Table 2**).

Pour confirmer la présence d'une diversité d'*ORFs* au sein de nos pools nous avons effectué des réactions PCR sur les extraits cellulaires totaux nous ayant servi pour le western blot. Ces extraits furent réalisés pour les tests de stabilité et de diversité.

Diversité des *ORFs* de la chaîne de transport d'électrons

La migration de huit produits d'amplification à partir de huit clones différents révèle des tailles d'*ORFs* différentes pour au moins cinq de ces huit produits d'amplification. Cette donnée suggère donc une diversité correcte au sein de nos pools d'*ORFs* de la chaîne de

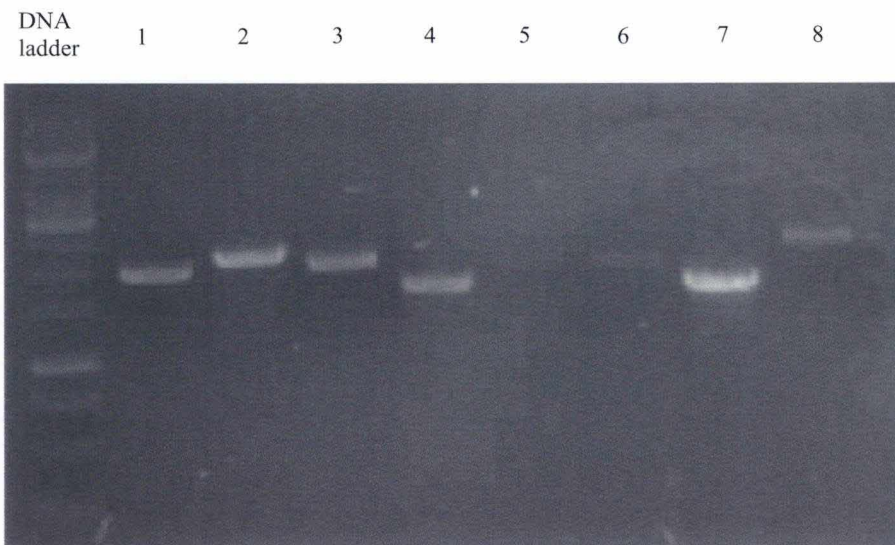


Figure 32 : Visualisation de la migration des produits PCR correspondants à l'amplification de huit fusions *e-mCherry* effectuée à partir de huit clones observés pris aléatoirement.

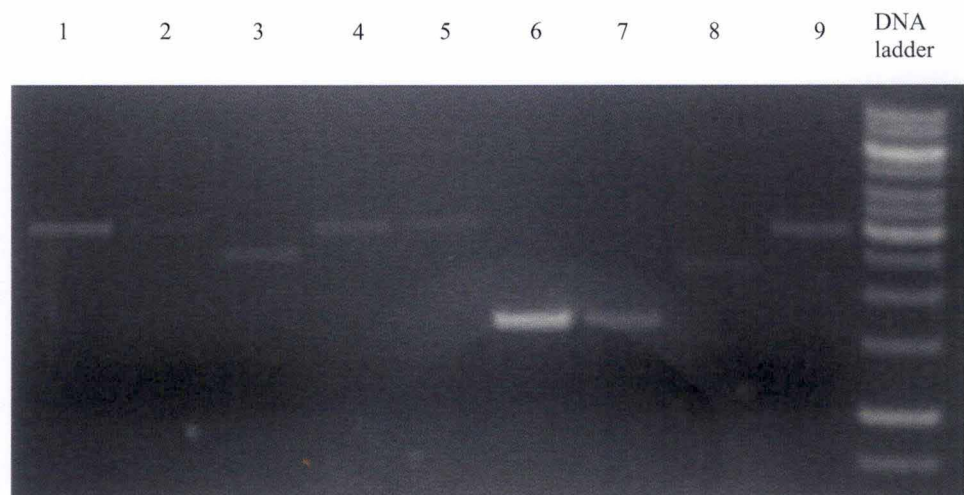


Figure 33 : Visualisation de la migration des produits PCR correspondants à l'amplification de neuf fusions *k-mCherry* effectuée à partir de neuf clones observés pris aléatoirement.

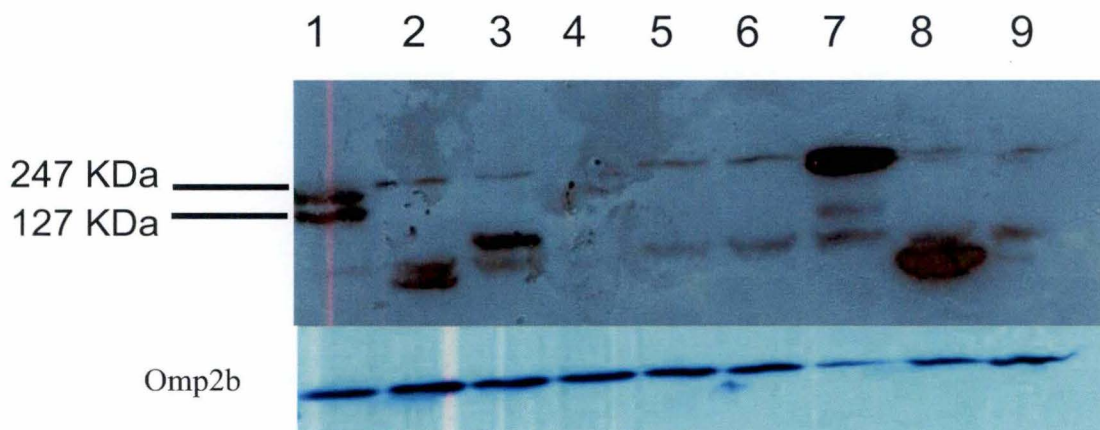
transport d'électrons (Fig32). Par ailleurs, aucune double bande n'est observée, ce qui suggère que les clones sont forcément isolés.

Diversité des ORFs du cycle de Krebs

La migration de neuf produits d'amplification, à partir des mêmes amorces X et Y à partir de neuf clones différents révèle pour les fusions k-mCherry des tailles différentes d'ORFs pour au moins quatre de ces neuf produits d'amplification. Cette donnée suggère donc une correcte diversité au sein de nos pools d'ORFs du cycle de Krebs (Fig33).

- **Vérification de la diversité et de la stabilité des fusions**

Pour vérifier que les observations que nous avons effectuées produisent bien des fusions protéiques stables entre des protéines de la chaîne de transport d'électrons, un western blot a été réalisé. Neuf des clones ayant été observés au microscope ont été prélevés sur les boîtes de Petri et furent inoculés en culture. Les extraits protéiques utilisés pour le western blot furent réalisés à partir de cultures de *Brucella abortus* présentant une DO^{600} de 0.5. La méthode ainsi que les anticorps furent les mêmes que ceux utilisés pour la vérification des vecteurs répliatifs et intégratifs portant la séquence codante *mCherry* fusionnée à *pdhS*, *fumC* et *fumA*. Après révélation, nous obtenons les résultats présentés ci-dessous pour les fusions e⁻-mCherry.



Les bandes présentes au niveau de chacun des puits du western blot ne représentent pas la taille de la mCherry seule mais bien de fusions protéiques où mCherry est associée à des protéines de poids moléculaire plus élevés qu'elle. Les bandes observées sont visibles à la taille attendue du produit PCR. Toutefois, on observe pour certains puits, comme pour les fusions de FumC à la protéine mCherry à partir de vecteurs répliatifs, la coexistence de différentes versions de la fusion protéique.

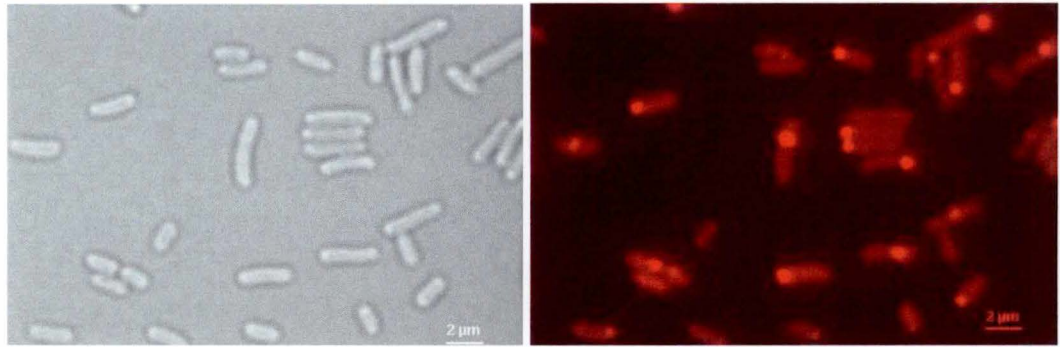


Figure 34 : Visualisation de la localisation de PdhS-mCherry produite à partir du pKS-oriT-kanR *pdhS-mCherry* dans une souche *E. coli* S17-1. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 µm.

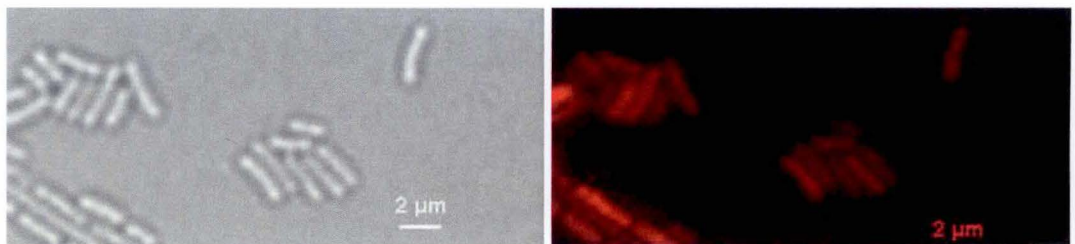


Figure 35 : Visualisation de la localisation de FumC-mCherry produite à partir du pKS-oriT-kanR *fumC-mCherry* dans une souche *E. coli* S17-1. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 µm.

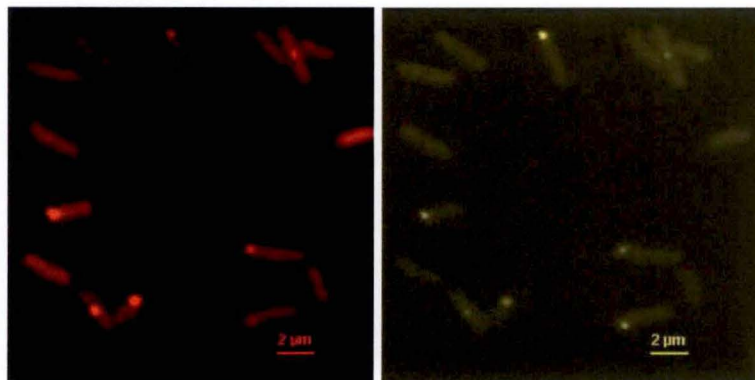


Figure 36 : Visualisation du pattern de localisation de FumC-YFP produite à partir d'un pMR30*nat-fumC-YFP* à partir d'une souche d'*E. coli* S17-1 pKS-oriT-kanR *fumC-mCherry*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant au TxRed. A droite, canal correspondant à l'YFP. La barre d'échelle représente 2 µm.



Figure 37 : Visualisation du pattern de localisation de FumA-YFP produite à partir d'un pMR30*nat-fumA-YFP* à partir d'une souche d'*E. coli* S17-1 pKS-oriT-kanR *fumC-mCherry*. Micrographies en épifluorescence. A gauche, canal correspondant au TxRed. A droite, canal correspondant à l'YFP. La barre d'échelle représente 2 µm.

Localisation des vecteurs chez *Escherichia coli*

De tout temps, la curiosité a poussé les scientifiques à approfondir leurs connaissances et c'est également elle qui a permis de nombreuses découvertes importantes.

Mû par cette même curiosité, nous avons également pris le temps d'observer des bactéries *E. coli* contenant des plasmides porteurs de la fusion à la protéine mCherry. En effet, avant l'introduction de nos vecteurs de fusion chez *B. abortus*, nos plasmides, pour leur construction et leur transfert conjugatif, sont passés par les souches DH10B et S17-1 de *E. coli*.

La fusion PdhS-mCherry produite à partir du pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry présente un signal fluorescent au niveau du vieux pôle de la bactérie ou au niveau du septum nouvellement formé dans une souche d'*E. coli* S17-1 (**Fig34**). Pourtant, la même fusion protéique exprimée dans la même souche bactérienne mais à partir du pMR-Nours-pdhS-mCherry ou du pMR-Nours-mCherry-pdhS ne présente pas de localisation polaire. Cette donnée indique qu'une protéine possédant une localisation polaire chez *B. abortus* présenterait un même profil de localisation chez une autre espèce bactérienne ne possédant pas d'homologue. De plus cette localisation inter-espèce ne s'effectue qu'à partir d'un vecteur à haut nombre de copie chez *E. coli* et intégratif chez *B. abortus*. Ces observations furent réalisées à une DO^{600nm} de 1. Des travaux antérieurs, réalisés à une DO^{600nm} de 0.5 ont montré que PdhS ne localisait pas au pôle d'*E. coli*.

La fusion PdhS-mCherry localise sous forme d'un focus, souvent polaire, chez *E. coli* S17-1. Pour savoir si cette localisation était spécifique à PdhS, nous avons tenté de faire de même avec la fusion FumC-mCherry générée à partir d'un pKS-oriT-kanR-fumC-mCherry (**Fig35**). La fusion FumC-mCherry ne montre pas de signal fluorescent polaire indiquant que toutes les protéines de *B. abortus* fusionnées à la mCherry ne localisent pas chez *E. coli*. Pour savoir si PdhS conserve chez *E. coli* sa capacité de recrutement de FumC, nous avons effectué une colocalisation entre PdhS-mCherry exprimé à partir du pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry et de FumC-YFP exprimée à partir du pMR30nat-fumC-YFP chez *E. coli* (**Fig36**). Les signaux fluorescents mCherry et YFP observés se superposent au niveau d'un focus dans bactérie. Lors d'une localisation de FumC-YFP à partir de la même souche (**Fig38**), aucun signal fluorescent polaire n'est observé suggérant que FumC-YFP est recruté par PdhS-mCherry. Ces résultats indiquent qu'au moins le fragment protéique de PdhS contenant le site d'interaction avec FumC se trouve dans une conformation tridimensionnelle lui permettant de remplir sa fonction de recruteur.

Pour s'assurer que le recrutement de FumC-YFP par PdhS-mCherry est spécifique, une colocalisation de FumA-YFP exprimée à partir d'un pMR30nat-fumA-YFP et de PdhS-mCherry à partir du pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry a également été réalisée chez *E. coli* S17-1 (**Fig37**). Comme attendu, les résultats ne montrent pas de colocalisation entre la fusion PdhS-mCherry et FumA-YFP. Cette donnée suggère que l'interaction entre FumC-YFP et PdhS-mCherry est spécifique chez la souche *E. coli* S17-1.

Afin de s'assurer que le plasmide portant la fusion génique *pdhS-mCherry* n'intervienne pas dans la localisation de la fusion protéique, *pdhS-mCherry* cloné dans un pBBR (voir **matériels et méthodes**) pour générer une forte surexpression de cette fusion génique. Les résultats montrèrent que les *E. coli* possédant un pBBR-*pdhS-mCherry* présentaient une morphologie filamenteuse tandis que celles portant un pBBR dénué de cette fusion ne comportaient aucun phénotype particulier (**Fig39**). Il semblerait donc que, à l'instar de ce qui

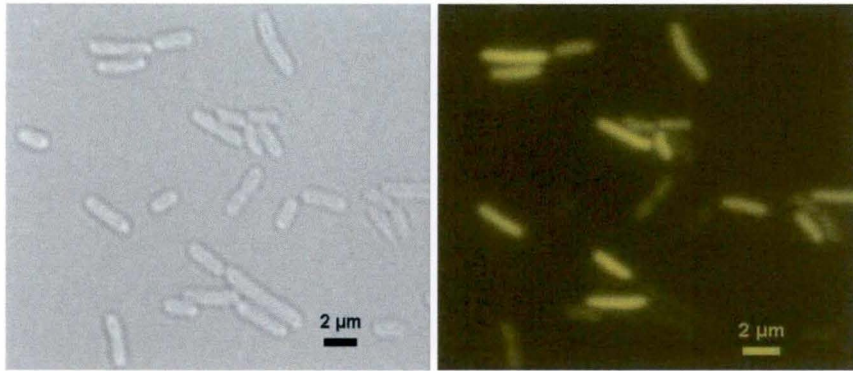


Figure 38 : Visualisation du pattern de localisation de la fusion protéique FumA-mCherry produite à partir du pMR-Nours-*fumA-mCherry* dans une souche S17-1 *E. coli*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 µm.

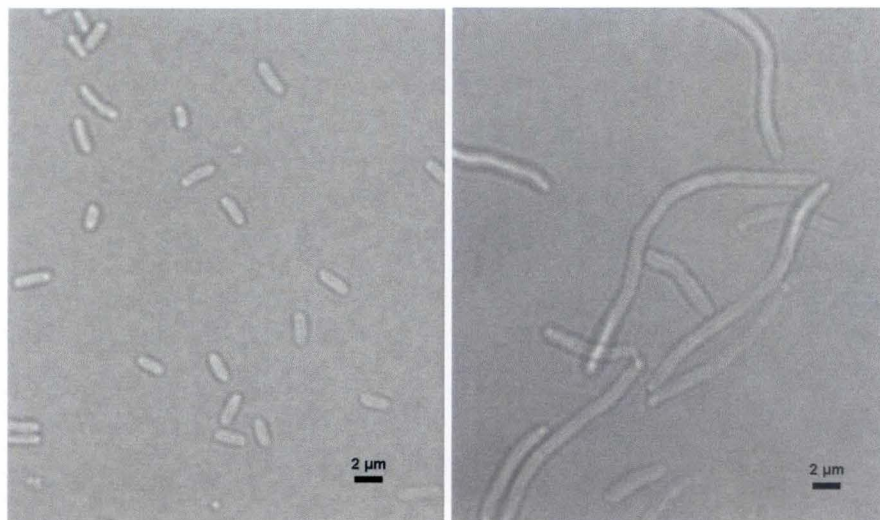


Figure 39 : Visualisation de la surexpression de PdhS produite à partir d'un plasmide pBBR dans une souche S17-1 *E. coli*. Micrographies en DIC. A gauche, pBBR vide. A droite, pBBR-*pdhS*. La barre d'échelle représente 2 µm.

se produit chez *B. abortus* (Hallez et al., 2007), la surexpression de PdhS induit la production d'aberrations morphologiques.

La localisation de PdhS-mCherry à partir du pKS-oriT-kanR-pdhS-mCherry à partir d'une souche d'*E. coli* DH10B a également été réalisée. Une observation microscopique montre un signal fluorescent polaire de la fusion PdhS-mCherry suggérant que cette fusion présente la même distribution dans différentes souches d'*E. coli*.

Discussions

Les localisations cytoplasmiques de la protéine mCherry fusionnée à des protéines de la chaîne de transport d'électrons et des protéines impliquées dans le cycle de Krebs du côté N-terminal ou C-terminal à partir de vecteurs répliatifs indiquent une absence de localisation au niveau de vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* de la chaîne de transport d'électrons ainsi que du cycle de Krebs.

Les vecteurs construits pour permettre l'observation de fusions de protéines d'intérêts à la protéine mCherry ont subi une étape de vérification. Les gènes *pdhS*, *fumC* et *fumA* furent fusionnés au gène *mCherry* au niveau des trois vecteurs pMD007, pMD008 et pMD009.

Les observations en fluorescence des fusions protéiques PdhS avec mCherry produites à partir de vecteurs répliatifs ou intégratifs ont montré la présence de foci polaires à l'instar de ce que l'on observe pour la fusion de PdhS à des protéines fluorescentes dérivant de la GFP.

Les localisations des fusions FumA-mCherry et mCherry-FumA présentent également la même distribution cytoplasmique de FumA que lorsque celle-ci est fusionnée aux dérivés de la GFP. Par contre, si la fusion FumC-mCherry produite à partir du vecteur intégratif montre la même localisation polaire que les fusions de FumC avec des dérivés de la GFP, les fusions à partir de vecteurs répliatifs montrent un pattern de localisation tout à fait différent.

Un western blot visant à la compréhension de l'absence de localisation des fusions FumC-mCherry et mCherry-FumC produites à partir de vecteurs répliatifs fut réalisé. Les résultats de ce western blot indiquent que la protéine mCherry est fusionnée de manière stable à la protéine FumA aussi bien du côté N-terminal que du côté C-terminal lors d'une production des protéines de fusion à partir des pMR-Nours-*fumA-mCherry* ou pMR-Nours-*mCherry-fumA*. En ce qui concerne les différentes fusions de la protéine mCherry à la protéine PdhS, les bandes observées au niveau du western blot indiquent également des fusions stables entre PdhS et mCherry produites à partir de vecteurs intégratifs comme répliatifs.

Par contre, le western blot présente des profils de bandes de taille et d'intensité différente pour certaines des fusions de la protéine mCherry à la protéine FumC produite à partir des vecteurs répliatifs ou du vecteur intégratif. En effet, alors qu'au niveau de la souche contenant le plasmide intégré la fusion FumC-mCherry montre une bande unique à la taille attendue, les puits correspondants aux vecteurs répliatifs indiquent la présence de bandes multiples. La présence des différentes bandes observées pour les fusions FumC-mCherry ou mCherry-FumC à partir de vecteurs répliatifs indique la coexistence de versions multiples de ces fusions protéiques. L'une des bandes observées se trouve être de taille plus importante que la somme des tailles de la protéine mCherry et de FumC. Cette taille bande de taille plus élevée correspondant à la présence d'une partie du gène *lacZ'*. En effet, l'insertion de la séquence codante *mCherry* fusionnés à une *K7GW* au niveau du plasmide pKS-oriT pour

former le pMD005 et pMD006 se produit au niveau du gène encodant le fragment α de la β -galactosidase, *lacZ'*. Lors de l'excision de la fusion *mCherry-K7GW* ou *K7GW-mCherry*, la partie du gène *lacZ* se trouvant en amont du site d'insertion est également emportée et liguée au niveau des pMD007 et pMD008. Après réaction LR, une protéine de fusion serait dès lors produite comportant FumC, la protéine mCherry bordées de part de d'autres par de courts segments de la β -galactosidase. Ces segments de β -galactosidase pourraient représenter des parties instables au niveau de la protéine de fusion. Certaines de ces fusions pourraient alors être protéolysées au niveau des segments de la β -galactosidase. Cette protéolyse générerait alors une protéine dont la taille ne correspondrait qu'à la somme de mCherry et de FumC, ce qui est observé au niveau du western blot. La présence de plusieurs types protéiques de la fusion FumC-mCherry en répliatif pourrait expliquer son absence de localisation polaire en microscopie à fluorescence. La coexistence de versions multiples de ces protéines de fusion pourrait influencer leur distribution cellulaire car les deux fusions problématiques présentent des bandes de tailles protéiques différentes.

De plus, la surexpression induite par le promoteur *Plac* chez *E. coli* présent au niveau des vecteurs répliatifs pourrait également empêcher l'établissement d'une localisation polaire des protéines. En effet, des protéines d'ancrage potentielles, localisées de manière polaire, pourraient être impliquées dans le recrutement des protéines de la chaîne de transport d'électrons notamment. Si les sites d'ancrages de ces protéines sont saturés, l'entièreté des protéines à observer ne sera pas recrutée au pôle et diffusera librement dans la cellule. Dans le cas où les protéines de fusions sont en très grand nombre, le signal de fluorescence observé indiquera une répartition diffuse dans l'ensemble du cytoplasme des fusions protéiques.

L'observation des fusions des protéines de la chaîne de transport d'électrons à la protéine mCherry produite à partir de vecteurs répliatifs indiquent une absence de localisation préférentiellement polaire du complexe de la chaîne de transport d'électrons.

Un western blot fut réalisé dans le but de vérifier la stabilité des fusions protéiques entre la mCherry et les protéines de la chaîne de transport d'électrons. Les données montrent que les signaux fluorescents observés au niveau des pools de la chaîne de transport d'électrons ne sont pas dus à la présence de la protéine mCherry seule car aucune bande n'apparaît au niveau de sa taille. Ces données indiquent que les signaux fluorescents sont effectivement le reflet de la distribution diffuse de nos fusions protéiques dans l'ensemble de la cellule au moins dans une proportion de la population. Cependant, comme pour les fusions FumC-mCherry ou mCherry-FumC à partir de vecteurs répliatifs, des bandes multiples apparaissent dans six sur huit des puits. La présence de ces bandes multiples indique que les vecteurs répliatifs génèrent la production de différentes versions des fusions protéiques influençant probablement leur profil de localisation. Comme nous avons pu corréliser la présence de bandes multiples avec l'absence de localisation polaire de FumC, cette donnée pourrait nous indiquer que l'utilisation de plasmides répliatifs pourrait avoir limité la détection de localisations polaires

La diversité des pools d'*ORFs* de la chaîne de transport d'électrons utilisés pour les réactions LR a été testée via des PCR sur colonies observées. Les profils de migration montrent qu'au moins cinq bandes sur huit possèdent une taille différente indiquant une correcte diversité des *ORFs* au niveau de nos pools de la chaîne de transport d'électrons. L'observation des fusions de la protéine mCherry aux protéines impliquées dans le cycle de Krebs produites à partir de vecteurs répliatifs indique une localisation cytoplasmique diffuse de ces fusions protéiques. La diversité du pool d'*ORFs* du cycle de Krebs générées pour la réalisation de réactions LR avec les vecteurs répliatifs a été testée via des PCR sur les colonies observées.

Les profils de migration montrent la présence d'un fragment par clone et qu'au moins quatre fragments sur les neuf observés montrent des tailles différentes indiquant une diversité importante des *ORFs* portées par les différents pDONR201 compte tenu du fait que le pool réalisé pour les *ORFs* du cycle de Krebs ne compte que onze *ORFs*.

Ces résultats indiquent que, dans les conditions testées, les protéines de la chaîne de transport d'électrons ainsi que les protéines du cycle de Krebs ne localisent pas au niveau du vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus*.

La présence d'une histidine kinase localisée au pôle d'une bactérie ne contenant aucun homologue de cette protéine est quelque chose d'atypique. Régulièrement, on associe ces distributions à des agrégats de protéines non fonctionnelles que la bactérie stocke à un endroit particulier. Dans le cas qui nous intéresse, cette concentration de PdhS-mCherry polaire se trouve être capable de remplir des fonctions qu'elle n'effectue d'habitude que chez *Brucella abortus*. Ces données suggèrent que *E. coli* permet à PdhS d'adopter une conformation qui la rend active.

Le fait que ces foci polaires se forment à une DO^{600nm} de 1, là où les bactéries arrivent en phase stationnaire, indiquent que ce phénomène se produit en cours de sénescence de la colonie bactérienne.

La présence de foci polaires fluorescents correspondant à une fusion protéique ne comportant aucun homologue chez *E. coli* peut soulever plusieurs hypothèses. L'une d'entre elles est que PdhS est effectivement bien repliée et fonctionnelle chez *E. coli* et de ce fait, capable de remplir certaines fonctions qu'elle exerce chez *B. abortus*. Une seconde hypothèse est qu'il s'agit d'agrégats polaires fluorescents présentant des caractéristiques atypiques comme le recrutement par exemple.

*Conclusions générales
et perspectives*

Conclusions générales et perspectives

Afin de tester l'hypothèse d'une localisation préférentiellement polaire des protéines de la chaîne de transport d'électrons chez *B. abortus*, nous avons construit des vecteurs permettant la production de fusions entre la protéine mCherry et les protéines de cette chaîne de transport d'électrons. Ces vecteurs furent construits pour permettre soit la surexpression des gènes de fusions soit l'expression au niveau endogène. Après vérification de ces vecteurs, nous avons généré des pools d'*ORFs* permettant d'effectuer des réactions LR sur plusieurs pDONR201 à la fois dans le but de fusionner le gène *mCherry* en amont ou en aval des différentes *ORFs*. La diversité des pools d'*ORFs* ainsi que la stabilité des fusions protéiques furent contrôlées et indiquèrent des résultats positifs permettant de tester les hypothèses de localisation polaire des protéines de la chaîne de transport d'électrons et de celles impliquées dans le cycle de Krebs.

Les résultats obtenus quant à ces localisations, dans les conditions testées, indiquèrent que les protéines du cycle de Krebs ne localisent pas au vieux pôle de la bactérie, mis à part FumC, et que les protéines de la chaîne de transport d'électrons sont distribuées de façon non polaire en membrane de *Brucella abortus*.

Le western blot réalisé pour la vérification de la diversité et de la stabilité des fusions protéiques a confirmé que les différentes protéines de la chaîne de transport d'électrons sont effectivement fusionnées à la protéine mCherry lorsqu'ils sont produits à partir de plasmides réplicatifs. La présence de fusions stables confirmées par le western blot indique que les vecteurs réplicatifs construits génèrent des liens stables entre les deux protéines de fusions. En ce qui concerne la localisation des protéines du cycle de Krebs fusionnées à la protéine mCherry, les différentes réactions de PCR réalisées suggèrent que les vecteurs portant les *ORFs* du cycle de Krebs ont bien été fusionnés au gène *mCherry*. Cependant, la réalisation d'un western blot, comme ce fut le cas pour les protéines de la chaîne de transport d'électrons, permettrait de confirmer la stabilité de ces fusions protéiques.

Les protéines formant les complexes de la chaîne de transport d'électrons ainsi que celles impliquées dans le cycle de Krebs, en fusion avec la protéine fluorescente mCherry, montrent une distribution cytoplasmique. Ces fusions protéiques sont produites à partir de vecteurs réplicatifs générant la surexpression des gènes codant pour ces protéines de fusions. Toutefois, les données des plasmides pMR-Nours-*mCherry-fumC* et pMR-Nours-*fumC-mCherry* ont indiqué que l'environnement plasmidique où se situaient certains gènes modifiait la distribution des protéines pour lesquelles ils codaient.

Une observation de nos protéines d'intérêt à partir de vecteurs intégratifs présenterait-elle un pattern de localisation différent ? Les vecteurs intégratifs furent construits de manière à placer la fusion génique sous le contrôle du promoteur natif de l'*ORF* d'intérêt. De cette manière, la fusion génique sera exprimée à un même taux que l'était le gène sauvage. La protéine de fusion produite sera dès lors présente en quantité moindre par rapport au contexte de surexpression, ce qui lui accordera une plus grande tolérance de la cellule et pourrait, de cette façon, éviter tout artéfact de localisation spécifique.

La localisation de protéines de fusions produites à partir de vecteurs intégratifs nécessite un événement de recombinaison homologue pour permettre l'intégration des gènes codant pour ces protéines (**Fig17**). L'efficacité d'une recombinaison homologue peut différer suivant la région génomique où celle-ci doit se dérouler. En effet, certaines zones du génome sont dites

peu recombinogènes, c'est-à-dire qu'elles ne tolèrent guère des événements de recombinaison. Le système de pools pourrait donc se révéler inefficace dans le sens où un plasmide s'intègre au niveau d'un opéron et engendre des problèmes d'expression des gènes se trouvant en aval du site d'intégration. En effet, les gènes codant pour les protéines de la chaîne de transport d'électrons sont généralement placés en opéron, probablement de manière à synchroniser leur expression. Enfin, des problèmes de sensibilité sont prévisibles, l'expression génique pourrait être difficilement détectable selon la fluorescence du rapporteur et la stabilité de la fusion protéique notamment.

La protéine mCherry pourrait également jouer un rôle dans la distribution cellulaire de nos protéines d'intérêts. En effet celle-ci pourrait engendrer des problèmes conformationnels aux protéines auxquelles elle est fusionnée. Pour vérifier cela, une protéine fluorescente différente de la protéine mCherry pourrait être utilisée. Des vecteurs intégratifs compatibles au système Gateway® et permettant la fusion d'*ORFs* au gène codant l'YFP (Yellow Fluorescent Protein) ou la GFP (Green Fluorescent Protein) seront utilisés pour effectuer des réactions LR et permettre ainsi la fusion de nos *ORFs* d'intérêts à cette protéine fluorescente.

En tentant de localiser la chaîne de transport d'électrons, nous avons opté pour une approche indirecte via la détection de ROS. Une tentative de localisation directe des ROS via des sondes spécifiques pourrait s'avérer intéressante. Ces sondes vont réagir spécifiquement avec certains ROS. En absence de ces ROS, les sondes ne sont pas détectables car certaines molécules sensibles aux chocs oxydatifs (« quencher ») les empêchent d'émettre de la fluorescence. En présence de ROS, les molécules bloquant la fluorescence sont dégradées permettant aux sondes d'émettre de la fluorescence. Toutefois, ces sondes doivent répondre à certains critères spécifiques (Wardman, 2007). Premièrement, celles-ci doivent pouvoir être sensibles à de faibles concentrations en ROS de manière à pouvoir discriminer les régions présentant une plus grande concentration en ROS. Deuxièmement, les sondes ne doivent pas être toxiques pour la bactérie ou encore interférer dans son métabolisme. Troisièmement, elles doivent également pouvoir être facilement introduites dans la cellule et ne pas être excrétées ou détruites par les systèmes de défense de la bactérie. Enfin, *Brucella abortus* étant une bactérie de seulement 1 µm de long, ces sondes doivent posséder une résolution suffisante pour qu'elles puissent être détectées dans une partie de la cellule. À notre connaissance, aucune des sondes proposées sur le marché ne remplit, pour le moment, tous ces critères. Cependant, certains candidats sortent du lot. L'hydroéthidium, par exemple, est considérée comme la sonde fluorescente la plus spécifique pour la reconnaissance de l'O₂⁻ (Wardman, 2007). Le chlorométhyl est également recommandé car les cellules le tolèrent bien. Toutefois, nous manquons d'information quant au pouvoir de résolution de ces différentes sondes. Dans le cas où une des sondes proposées nous conviendrait, celle-ci se devrait d'être de type fluorescent. En effet, deux types de sondes existent : les sondes fluorescentes et les sondes luminescentes. En ce qui concerne notre étude, cette sonde devrait pouvoir être détectée par un microscope à fluorescence lors d'observations de souches *Brucella abortus* 544 *pdhS-cfp* où la fusion protéique PdhS-CFP nous servirait comme marqueur du vieux pôle de la grande cellule.

Deux hypothèses non-exclusives concernant la localisation polaire de la fumarase FumC ont été émises. La première de ces hypothèses est celle que nous avons testée au cours de ce mémoire, à savoir que la protéine FumC localise au vieux pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* car celle-ci doit posséder une fumarase résistante aux ROS à cet endroit spécifique.

Une seconde hypothèse concerne la séquestration de FumC au pôle. Dans cette hypothèse, la fumarase C devrait remplir sa fonction dans le cytoplasme dans des conditions précises et serait séquestrée au pôle dans toutes les autres conditions. En effet, FumC endosserait le rôle joué par FumA, au niveau du cytoplasme, dans des conditions de stress oxydatifs et/ou de déplétion en fer par exemple, conditions rencontrées lors d'infections cellulaires par *B. abortus* notamment (Liochev and Fridovich, 1992). En effet, cette bactérie pathogène intracellulaire, lors de son invasion, rencontre des mécanismes de défense mis en place par la cellule hôte dans le but d'éviter la colonisation bactérienne. Lors de son processus d'infection, *B. abortus* va être phagocytée par une cellule professionnelle tel que le macrophage (Celli, 2006). Lors de cette phagocytose, la bactérie pourrait donc être confrontée aux chocs oxydatifs et à une diminution de la présence de fer dans le milieu. FumA étant sensible à ces conditions, l'activité fumarase qu'effectue FumA ne pourrait dès lors plus avoir lieu. Dans ces conditions, FumC pourrait être relarguée du pôle de la bactérie pour se distribuer dans le cytoplasme et ainsi jouer le rôle de relayeur de l'activité fumarase de FumA. Cette hypothèse pourrait se vérifier via des observations de localisation de FumC fusionnée à une protéine fluorescente lors d'infections cellulaires de *Brucella abortus* ou sur boîtes de Petri contenant du paraquat. En accord avec cette hypothèse, une délocalisation de FumC serait dès lors attendue. L'histidine kinase PdhS, dans ce cas, servirait à la séquestration de FumC. Ensuite, PdhS, via la perception des changements de conditions du milieu qu'entraîne l'internalisation, libérerait FumC. Le domaine PAS ainsi que les deux domaines PAS-like prédits au niveau de la séquence de la protéine PdhS pourraient notamment servir de senseur des variations des conditions redox de la cellule (Taylor and Zhulin, 1999).

Concernant la localisation de la fusion protéique PdhS-mCherry chez *E. coli* produite à partir d'un vecteur intégratif, une observation en microscopie à fluorescence montre une localisation polaire de cette fusion qui de plus, conserve sa capacité de recrutement de FumC-YFP. Une confirmation de la présence de la protéine PdhS conformationnellement active permettraient d'utiliser *E. coli* comme outil d'investigation sur les fonctions de cette protéine. En effet, *E. coli* représenterait un outil de choix car la fonction de PdhS chez cette bactérie n'est pas essentielle, permettant la génération de mutants de cette protéine. Effectuer des recherches sur une espèce comme *E. coli* ne nécessite pas, au contraire de *B. abortus*, de travailler dans des enceintes sécurisées tel que des laboratoires de sécurité de niveau 3. De plus, cette bactérie possède un temps de génération beaucoup plus court que celui de *B. abortus* (3 heures pour *Brucella spp.* contre 20 minutes pour *E. coli*), rendant les recherches avec cette bactérie plus efficaces.

La bactérie *E. coli* pourrait dès lors représenter un support pour la réalisation d'un test double hybride en bactérie qui servirait à remettre en évidence les interactants potentiels de PdhS déjà découverts mais également à la mise en évidence de nouveaux interactants, notamment membranaires.

La technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) pourrait également être utilisée chez *E. coli* pour confirmer les interactions mises en évidence par les observations microscopiques et les tests de double hybride en levure.

La fusion protéique PdhS-mCherry surproduite chez *E. coli* pourrait former des agrégats comme ceux rapportés chez cette espèce bactérienne par A. Lindner indiquant qu'un événement de sénescence plus important se déroule au niveau du vieux pôle bactérien (Lindner et al., 2008). La révélation d'agrégats protéiques peut être mise en évidence par l'observation de la localisation d'une petite protéine « heat-shock » fusionnée à l'YFP, nommée IbpA (Inclusion body protein A) se liant spécifiquement aux agrégats. L'expression du gène *ibpA* mais également d'autres gènes dont l'expression dépend de chaperonnes est induite lors de la

phase stationnaire des bactéries. Lors de nos observations, les bactéries se trouvaient également en phase stationnaire reflétant peut-être les conditions propices à la formation d'agrégats contenant la fusion protéique PdhS-mCherry. Par contre, le fait que FumC-YFP soit recrutée par PdhS-mCherry signifie que PdhS, chez *E.coli*, est au moins, partiellement, correctement repliée. Une colocalisation de la fusion IbpA-YFP avec la fusion protéique PdhS-mCherry nous permettrait de pencher en faveur d'une localisation spécifique ou d'une formation d'agrégats protéiques. Si le signal fluorescent produit par la fusion IbpA-YFP se superpose à celui produit par la fusion PdhS-mCherry, cela indiquerait que cette fusion PdhS-mcherry se trouve sous forme d'agrégats chez *E. coli* mais conservant la capacité de recruter d'autres protéines. En effet, l'observation d'une colocalisation de PdhS-mCherry avec une fusion protéique DivK-YFP nous permettrait de savoir si une partie du domaine carboxy-terminal de pdhS serait également correctement replié. La confirmation de la localisation au vieux pôle de la bactérie, comme cela est suggérer par A. Lindner, pourrait se réaliser via un time-lapse montrant la répartition cellulaire des différentes protéines de fusion au fil des générations.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Souches et plasmides

• Souches

***Escherichia coli* DH10B** : Cette souche représente l'outil le plus utilisé pour amplifier des fragments d'ADN circulaires (plasmides) d'intérêt in vivo. Ces plasmides sont introduits dans les bactéries via plusieurs techniques de transformations bactériennes possibles comme l'électroporation ou de la transformation CaCl₂.

Génotype : F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*ΔM15 D*lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* D (*ara,leu*)7697 *galU* *galK* 1- *rpsL* *nupG*. (GibcoBRL(Invitrogen))

***Escherichia coli* S17-1λpir** : Grâce à l'intégration du plasmide RP4 dans son génome, cette souche possède la capacité de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert. De plus, Cette souche est résistante à la streptomycine, à la spetinomucine et au triméthoprim.

Génotype : *recA* *thi* *pro* *hsdR*⁻ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogénisé avec le phage λpir.

***Escherichia coli* DB3.1** : Cette souche possède l'allèle *gyrA*462 qui lui confère une résistance à la toxine CcdB pour l'amplification de plasmides contenant la cassette gatewayTM.

Génotype : F- *gyrA*462 *endA*-D(*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsd20*(*rB*-,*mB*-) *supE*44 *ara*14 *galK*2 *lacY*1 *proA*2 *rpsL* 1- *leu* *mtl*1. (Invitrogen)

***Brucella abortus* 544** : La souche utilisée pour ce travail est *Brucella abortus* biovar 544, rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) au laboratoire de biologie moléculaire (URBM), FUNDP, Namur.

• Plasmides

pDONR201 : Ce plasmide commercialisé par Invitrogen life Technologie est conçu pour le clonage en système GatewayTM (GW) de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *attP*1 et *attP*2 situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches d'*Escherichia coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de répllication (pUC ori) fonctionnelle chez *Escherichia coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt bordé des sites *attB*1 et *attB*2. Le produit de recombinaison est alors appelé vecteur d'entrée.

pMR-Nours : Ce plasmide est utilisé pour la surexpression de d'*ORFs* de part son promoteur fort, le *Plac*. Il encode un gène de résistance à la nouséothricine, un antibiotique

qui inhibe la synthèse protéique par une action ribosomale et induit également des erreurs de codage.

pBBR1MCS-1-GW : Dérivé du pBBR1MCS-1 (Kovach et al., 1995), ce plasmide a été rendu compatible au système Gateway® (Hallez Régis). Plasmide compatible avec le pMR pouvant donc coexister dans la même bactérie.

Le pBBR1MCS-1, plasmide à moyen taux de réplication (10 à 15 copies par cellules), permet entre autre l'étude de la surexpression protéique. Il porte une origine de réplication REP. Il peut également se trouver en présence de plasmides contenant d'autres origines de réplication comme ColE1 et p15A. On y trouve un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*).

Milieux de culture

Tous les milieux utilisés sont autoclavés pour une période de 20 minutes à 121°C sous une pression de 20 bars. Le milieu est refroidi aux alentours de 55°C puis additionné d'antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de pétri.

• Milieux riches pour E. coli : milieu Luria Bertani (LB)

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

• Milieux riches pour Brucella abortus : milieu 2YT

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

Le milieu 2YT + sucrose 5% (5 gr de saccharose pour 100 ml de milieu) est utilisé pour sélectionner la désintégration du plasmide pJQ200-uc1 du génome de *Brucella abortus*.

• Milieux SOC

2% tryptone	2,5 mM chlorure de potassium	10 mM chlorure de magnésium	20 mM glucose
0,5% extrait de levure	10 mM chlorure de sodium	10 mM sulfate de magnésium	

Tampons & solutions

• Fabrication du gel d'agarose

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50x
--------------------	-------------------------	----------------

Solution de 2mg/ml H ₂ O	glycérol 50% EDTA 100mM SDS 1% Bleu de bromophénol ou méthyl orange	Tris-HCl pH 8,0 40mM EDTA 50mM Acide acétique glacial 57,1ml/litre
-------------------------------------	--	--

Tampon PBS 20X

Pour un litre d'eau désionisée			
KH ₂ PO ₄ 2mM	4 g/l	KCl 2,7 mM	4 g/l
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	22,98 g/l	NaCl 137 mM	160 g/l

• Antibiotiques

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

Les antibiotiques sont filtrés stérilement avec un filtre 0,22 µm de porosité avant d'être aliquotés et d'être dilués 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu. Les antibiotiques sont conservés à -20°C.

• Valap

Le valap est utilisé pour cercler les couvres-objets au niveau de la lame pour l'observation au microscope de *Brucella abortus*. Cette méthode permet d'éviter la contamination de l'environnement par *Brucella* lors des observations.

Vaseline	1/3 de volume	Lanoline	1/3 de volume	Paraffine	1/3 de volume
----------	---------------	----------	---------------	-----------	---------------

Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

• PCR (Polymerase chain reaction)

Cette technique est utilisée pour l'amplification rapide de fragments d'ADN d'intérêts (amplicons). Les séquences bordant le fragment d'intérêt doivent être connues afin de concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers) qui leur sont complémentaires. Les amorces bordent la séquence à amplifier, l'une s'hybride au brin « sens », l'autre au brin « antisens ». La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage à 94°C en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est refroidi (en fonction des amorces) permettant l'hybridation spécifique des amorces. La température de melting (T_m) se calcule de la manière suivante, $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ où (G+C) et (A+T) sont la somme des bases G et C et A et T respectivement, présentes dans la partie de l'amorce qui s'hybride sur la séquence à s'amplifier. Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence bordante en

5'. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools ou l'Expand High Fidelity de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. La *Taq* polymérase, générant un taux relativement élevé de mutations introduites dans les séquences, est utilisée dans les cas de PCR diagnostiques alors qu'une enzyme « proofreading » (High Fidelity) est utilisée dans les cas de clonage. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété de 25 à 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle de la séquence désirée.

Mix

Réactifs	Quantité
Tampon 5X _{Taq} ou 10X _{HF} correspondant à l'enzyme	10 µl ou 5 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	1,2 µl
Amorce 1 (20 µM)	0,5 µl
Amorce 2 (20 µM)	0,5 µl
Taq polymérase ou High Fidelity	0,5 µl
Matrice d'ADN	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl (ou 30 µl pour une PCR diagnostique)

Programmes

Dénaturation de 5 minutes à 94°C. Dans le cas d'une PCR sur colonie, une étape antérieure de 10 minutes supplémentaires à 94°C est nécessaire.

25 à 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :

1. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles Gateway™) à 94°C pour dénaturer.
2. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles Gateway™) à X°C pour hybrider où X = Tm-10°C
3. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kb) du fragment à amplifier.

Elongation finale de 10 minutes à 72°C

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

• **Electrophorèse sur gel d'agarose**

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

• Fabrication du gel

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

• Restrictions et ligations

La restriction enzymatique présente deux objectifs principaux : le premier est la restriction diagnostique, le second est la restriction dans la cadre du clonage. Les enzymes de restriction sont à l'origine produites par les bactéries elle-même pour se protéger de l'ADN étranger. Les enzymes de restriction reconnaissent des sites spécifiques qu'elles vont cliver et vont générer soit des extrémités protrudantes soit des extrémités dites « blunt » (bouts francs). La ligation consiste à liguer des produits de restriction arborant des extrémités compatibles afin de cloner un insert d'intérêt dans le plasmide voulu.

Restrictions :

- 1 µl Buffer 10X en fonction de l'enzyme (A, B, L, M ou H).
- Le volume (µl) d'enzyme de Restriction à ajouter est déterminé grâce à la formule : $Q(\text{unité}) = 48,5 * q * np / n\lambda * t$, où q est la quantité en µg du plasmide, np le nombre de sites dans le plasmide, t la taille du plasmide en kb et nλ le nombre de sites dans le phage λ. En général, les enzymes de restrictions sont conditionnées pour avoir 10U/µl. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ.
- X µl de plasmide à restreindre
- Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau distillée.

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

Ligations :

Pour 10µl final, ajouter :

- 0,5-1 µL de T4 DNA ligase
- 2 µL de T4 DNA Buffer 5X
- volume d'insert et de matrice à déterminer à partir du rapport des masses obtenu par la formule suivante :

$\text{ng insert/ng matrice} = (\text{kb insert/kb matrice}) \cdot (\text{moles insert/moles matrices})$
rapport des moles : 1/1 pour clonage directionnel, 3/1 pour clonage non directionnel

Ensuite, préparer le mélange et mettre à volume avec de l'eau désionisée. Laisser une heure à 37°C.

Purification d'ADN sur gel d'agarose

Pour les purifications d'ADN à partir d'un gel, le kit QIAquick™ Gel Extraction Kit de Qiagen fut utilisé. Le protocole est prévu pour extraire et purifier de l'ADN de 70 bp à 10 Kb à partir d'un gel d'agarose standard.

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel et peser le morceau d'agar.
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN; passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant et ajouter au culot 500 µl de solution de lavage du kit
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant et conserver l'ADN à -20°C.

• Purification sur colonne

Autre méthodes employée pour la récupération d'ADN notamment après PCR. le kit utilisé fut le MSB Spin PCRapace d'Invitex. Ce protocole est prévu pour purifier et concentrer des fragments d'ADN simple ou double brin de réactions PCR (de 80 pb à 30 kb).

• Extraction d'ADN plasmidique

Cette technique est utilisée pour l'isolement et la purification de plasmides présents chez les bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

L'ADN plasmidique est extrait à partir d'une culture bactérienne de 5 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s), en suivant les instructions du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel).

Pour les extractions d'ADN plasmidique classique :

- Inoculer une colonie isolée dans 5 mL de LB contenant l'antibiotique de sélection.
Laisser pousser sur la nuit.
- Le lendemain, centrifuger à 12500 rpm 5'.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µL de tampon P1 (à 4°C) et resuspendre.
- Ajouter 300 µL de tampon P2 et retourner.
- Laisser 5' à température ambiante.
- Ajouter 300 µL de tampon P3 et retourner.
- Laisser 10' sur glace.
- Centrifuger à 12500 rpm 15' à 4°C.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol (~ 630 µL) et retourner.
- Centrifuger à 12500 rpm 15' à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µL d'éthanol 70% (-20°C).
- Centrifuger à 12500 rpm 5' à 4°C.
- Eliminer délicatement le surnageant.
- Sècher.
- Ajouter 20 µL d'eau désionisée.

Préparation des tampons P1, P2 et P3

P1

- RNase A 100 µg/mL.
- TrisHCl 50 mM.
- EDTA 80 mM

P2

- NaOH 100mM.
- SDS 1%.

P3

- Kac 3.0 M.
- pH 5.5, 4°C.

Mettre à pH 8 et garder à 4°C.

• **Séquençage**

Le séquençage des fragments d'ADN fut réalisé via le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une seule amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence des 4 didéoxyribonucléotides permet l'arrêt de la polymérisation, entraînant l'obtention d'une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel par ordre croissant de taille. Grâce aux quatre émissions de couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Protocole : kit Perkin Elmer

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

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles d'amorce.
- 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl₂.
- Le mélange de réaction est porté à un volume de 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles

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

• Clonage Gateway®

Le système Gateway™ est basé sur des réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*Escherichia coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* présents dans le génome du phage λ et des sites *attB* présents au niveau du génome bactérien. Cette réaction génère l'intégration du génome phagien compris entre les sites *attR* et *attL* néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage λ ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément englobées sous le terme BP clonase. Cette intégration est réversible. En effet, l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien via des réactions de recombinaisons entre les sites *attR* et *attL*. La réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément englobées sous le terme LR clonase. Ce système a été adapté pour permettre des clonages faciles en laboratoire. Les composants du système de recombinaison du phage λ ont été modifiés afin d'obtenir des paires de sites à spécificités distinctes et d'améliorer l'efficacité du système. Une différence d'une paire de base suffit à donner la spécificité. Ainsi, les sites *attB1* ne recombinent qu'avec les sites *attP1* et de la même façon, *attB2* avec *attP2*, *attL1* avec *attR1* et *attL2* avec *attR2*. En pratique, ce système nécessite plusieurs étapes.

Dans un premier temps, l'ORF d'un gène est amplifiée par PCR au moyen d'une paire d'amorces dont l'extrémité 3' s'hybride sur la séquence d'intérêt et dont l'extrémité 5' contient, pour l'une, le site de recombinaison GW™ *attB1*, pour l'autre, le site *attB2*. Les produits PCR ainsi obtenus sont constitués, outre les sites *attB1* et *attB2* aux extrémités, d'une séquence débutant exactement à l'ATG (correspondant au codon d'initiation de traduction AUG d'une protéine) et continuant sur toute la séquence à l'exception du codon STOP.

La seconde étape consiste à réaliser une réaction BP des produits PCR en présence d'un vecteur donneur contenant les séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* entourant le gène de résistance au chloramphénicol *cat* et le gène de toxicité *ccdB*, regroupés sous le terme cassette Gateway (K7GW). La protéine CcdB interfère avec l'ADN gyrase d'*E. coli*, inhibant ainsi la croissance de souches bactériennes « *ccdB* sensibles ». L'ADN gyrase de bactéries *ccdB* résistantes tel que DB3.1 n'est pas affectée par CcdB. La réaction est catalysée par le « mix BP clonase » qui contient Int et IHF.

Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le produit PCR (*attB1*-séquence-*attB2*), le produit de recombinaison *attR1-K7GW-attR2*, le vecteur donneur *attP1-K7GW-attP2* et le vecteur d'entrée constitué de l'ORF flanquée des sites *attL1* et *attL2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant

(c'est-à-dire dont la cassette contenant le gène *ccdB* a été remplacée par le produit PCR) seront capables de se multiplier. De plus, l'antibiotique, pour lequel le vecteur donneur code la résistance, est ajouté au milieu et permet ainsi la sélection des bactéries contenant un plasmide. Les vecteurs d'entrée sont récupérés par extraction d'ADN plasmidique. Les vecteurs d'entrée obtenus peuvent servir par la suite, pour le clonage en divers vecteurs d'expression.

Ensuite, il ne reste plus qu'à effectuer une réaction LR qui permet la recombinaison d'un vecteur d'entrée contenant les sites *attL1* et *attL2* avec un vecteur de destination contenant les sites *attR1* et *attR2*, pour générer un vecteur d'expression contenant les sites *attB1*.et *attB2*. La réaction est catalysée par le mix « LR clonase », contenant Int, IHF et Xis. Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le vecteur d'entrée *attL1-séquence-attL2*, le vecteur de destination *attR1-K7GW-attR2*, le produit de réaction *attP1-K7GW-attP2* et le vecteur d'expression *attB1-séquence-attB2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant seront capables de se multiplier. Les bactéries contenant un plasmide peuvent être sélectionnées par l'ajout de l'antibiotique pour lequel le vecteur de destination code la résistance. Les vecteurs d'expression sont récupérés par une extraction d'ADN plasmidique.

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR201 restreint NcoI 3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt 2 µl de tampon de dilution BP 2 µl d'enzyme clonase BP 2 µl d'H ₂ O distillée Incubation à 25°C de 2 à 24h, puis la réaction est stoppée en incubant le mélange 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K	3 µl de vecteur d'entrée 3 µl de vecteur de destination 2 µl de tampon de dilution LR 0,8 µl d'enzyme clonase LR 1,2 µl d'H ₂ O distillée Incubation à 25°C de 2 à 24h.

Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

• Préparation de cellules *Escherichia coli* électro-compétentes (DH10B/S17-1)

Jour 1

1. Réveiller la souche à rendre compétente sur LB Agar à 37°C toute la nuit.

Jour 2

2. En fin de journée, lancer une préculture dans 5 ml de LB liquide en grattant si possible une seule colonie.

Jour 3

3. Au matin, verser la totalité de la préculture dans 1,2 L de LB liquide en erlen à contre-pals de type 5 L. Agiter à 37°C.
4. Surveiller la croissance de la culture en prenant la DO⁶⁰⁰ régulièrement. Quand la D.O. atteint plus ou moins 0,5, stopper la croissance sur glace pendant 10 minutes.
Rem : à partir de cette étape, il faut rester en permanence à froid.
5. Répartir la culture dans 6 biberons stériles.
6. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
7. Resuspendre dans de l'eau bidistillée stérile et froide (4°C) en répartissant 1,2 l de cette eau pour les 6 biberons.
8. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
9. Resuspendre dans 300 ml d'eau bidistillée stérile et froide (4°C) et ensuite la répartir dans 6 falcons (50 ml chacun).
10. Resuspendre dans de l'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C) et porter à 20 ml dans 2 falcons.
11. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
12. Resuspendre chaque culot dans 2,5 ml d'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C).
13. Aliquoter en eppendorfs stériles posés sur glace.
14. Stocker à -80°C.
Rem : tous les récipients utilisés sont placés à -20°C o/n.

Transformation bactérienne par électroporation

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

Les cellules électrocompétentes *E.coli* DH10B ou S17-1, gardées à -80°C, sont décongelées lentement sur la glace. Stérilement, 50 µl de cellules électrocompétentes et 2 à 7 µl de plasmides sont mis dans un eppendorf. Le contenu de l'eppendorf est mélangé et mis immédiatement sur la glace. Ce même contenu est déposé dans une cuvette^{BIORAD} de 2 mm spécialement conçu pour l'électroporation. Une pulsion est donnée d'après les paramètres déterminés par l'appareil pour l'utilisation de cellules bactériennes *E.coli* et d'une cuvette de 2 mm : 2 kV, capacité de 25 µF, low range=2. La pulsion terminée, 700 µl de milieu SOC

doit être immédiatement ajouté aux cellules et le tout doit être transféré dans un eppendorf de manière à permettre aux bactéries la reprise de leur division. Les eppendorfs sont incubés à 37°C pour 1 heure maximum sous agitation de manière à éviter la compétition entre les bactéries. On étale ensuite 100 µl du contenu de l'eppendorf sur milieu LB solide contenant un antibiotique pour permettre la sélection des clones ayant intégrés notre plasmide d'intérêt. On peut également, après centrifugation (5 min à 5000 rpm), élimination du surnageant et resuspension avec le liquide restant, étaler le reste sur milieu LB solide contenant un antibiotique et placer à 37°C jusqu'à l'obtention de colonies.

Une autre méthode, moins efficace mais plus aisée à réaliser pour faire pénétrer de l'ADN dans une bactérie se fait via l'utilisation de chocs thermiques. Pour la transformation bactérienne par choc thermique, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN grâce à des passages dans une solution hypotonique de chlorure de calcium.

Contrôle négatif

À un même volume de cellules électrocompétentes utilisées est ajouté un volume d'eau équivalent au volume de plasmide ajouté. La démarche suivie pour l'électroporation est identique à celle exposée précédemment. Cette transformation ne devra pas donner de clones sur un milieu contenant des antibiotiques pour la sélection. Après chaque électroporation, les cuvettes sont lavées à l'eau de javel, plongées dans de l'alcool o/n et passées sous UV pendant 3 minutes. Ce contrôle permet de s'assurer que les cuvettes sont bien stériles.

• Conjugaison bactérienne

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert vers une bactérie receveuse. La souche donneuse (dans notre cas S17-1) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

- Mettre 1 ml de phase stationnaire de bactéries à transformer (ici *Brucella abortus*) dans un tube eppendorf.
- A ce tube eppendorf, ajouter 50 µl de cellules *Escherichia coli* S17-1 contenant le plasmide d'intérêt.
- Centrifuger les tubes eppendorf pendant 1 minute à 7000 rpm.
- Un culot est maintenant visible au fond de l'eppendorf. Enlever le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu 2YT.
- De nouveau, centrifuger pendant 1 minute à 7000 rpm.
- Enlever le surnageant en y laissant une petite quantité de liquide sur le culot (environ 50 µl).
- Resuspendre le culot avec le liquide restant et spoter la préparation sur des petites boîtes de milieu 2YT.

- Incuber pendant 4 heures à 37°C (plasmides répliatifs) ou à température ambiante toute la nuit (plasmides intégratifs).
- Après incubation, étaler les cellules sur milieu sélectif 2YT avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixic. Pour un plasmide répliatif, stier sur les boites. Pour un plasmide intégratif, resuspendre les bactéries dans 300 µl de 2YT et étaller sur 3 boîtes avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixic.
- Incuber pendant 3 à 4 jours à 37°C.

Contrôle négatif

Les bactéries donneuses *E. coli* S17-1 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixic auxquelles elles sont sensibles et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17-1 donneuses. Les *Brucella* ne survivront donc qu'à conditions d'avoir reçu un plasmide conjugatif.

Techniques relatives aux protéines

- **Analyse de l'expression d'une protéine par Western blot**

Préparation des échantillons pour *Brucella*

- La veille, lancer une préculture dans 5 ml de 2YT à une DO⁶⁰⁰ de 0,05.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Inactiver les bactéries 1 heures à 80°C.
- Centrifuger les cultures 15 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
- Resuspendre dans 5 ml de PBS1X et mesurer la DO⁶⁰⁰.
- Centrifuger les échantillons et ajouter au culot un volume de PBS1X de telle sorte qu'ils soient ajustés à une DO⁶⁰⁰ de 6.
- Ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont le stock est concentré 5x.

Rem : on veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes.

- Faire bouillir les échantillons 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines avec le SDS.
- Enfin, les échantillons sont chargés sur le gel ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Low/High Range, Biorad). Ce dernier nous permettra de déterminer par comparaison la gamme de taille des protéines détectées.

La technique du Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine grâce à la reconnaissance cognitive via un anticorps. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

1. La séparation d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE).
2. L'électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
3. La détection immunologique de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques c'est-à-dire le Western blot à proprement dit.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide s'effectuant en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La séparation se fait dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide résultant de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysées par du TEMED (tétraméthylhydramine). On peut modifier les concentrations d'acrylamide et de bisacrylamide de manière à adapter la taille des pores du gel à la taille des protéines à séparer. La dénaturation des protéines s'effectue grâce au β -mercaptoéthanol permettant la rupture des ponts disulfures. Cette rupture va créer des chaînes polypeptidiques complètement dénaturées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement puisque toutes les protéines seront identiquement chargées. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin.

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation et d'aligner les différents puits sur une même « ligne de départ », et le running gel ou gel de séparation.

Migration

L'appareil est fixé sur 30-40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 300 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-sec dans du tampon Towbin. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose, formant ainsi une réplique du gel.

Protocole :

1. Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman aux dimensions du gel.
2. Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert (Towbin).
3. L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (Biorad).

4. Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être égal à 3 mA par cm^2 de membrane de nitrocellulose. Le voltage peut varier entre 10 V et 14 V.
5. La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent).

Immunodétection

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase (une enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière), reconnaissant l'anticorps primaire permet de détecter indirectement la protéine d'intérêt.

Etape de saturation

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

La membrane est lavée trois fois dix minutes avec du PBS-Tween 0, 05%.

Incubation avec l'anticorps primaire

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS-lait 5% contenant l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt à la dilution adéquate, pendant une heure sous agitation. Après, la solution contenant les anticorps est récupérée et conservée à -20°C. La membrane est alors lavée cinq fois avec du PBSIX-Tween 0,05% pendant trois minutes.

Incubation avec l'anticorps secondaire

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

L'anticorps secondaire utilisé Horse Radish Peroxidase (DAKO) est une IgG de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin.

La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par le fabriquant (10000X) dans du PBS - lait 5 % sous agitation pendant une heure.

La membrane est lavée trois fois avec du PBS - Tween 0, 05% pendant dix minutes.

Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL

1. La membrane est recouverte de solution de révélation ECL pendant une minute.
2. La solution de détection et la membrane sont recouvertes d'un film plastique (type SaranWrap), et est placée dans une cassette de révélation. Un film autoradiographique est alors exposé pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal obtenu.

Techniques relatives à la microscopie

• Appareillage

Le microscope employé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER. L'huile d'immersion de type DF utilisée, nous est fournie par la société Cargille et a un indice de réfraction (n_D) de 1,5150 +/- 0,0002.

• Préparation d'échantillons pour la microscopie

Agarose pad

- Préparer une solution de PBS 1X et d'Agarose 1% dans un erlen.
- Chauffer au four à micro-onde afin de dissoudre l'agarose.
- Déposer 700 μ l sur une lame de microscope et recouvrir ensuite d'une seconde lame.
- Laisser solidifier puis mettre les agarose pads dans une chambre humide pour empêcher qu'ils sèchent.

Montage de la lame

- Détacher doucement les deux lames.
- Déposer 1 μ l de culture à DO^{600} adéquate (en pleine phase exponentielle).
- Recouvrir d'une lame porte objet.
- Découper, à l'aide d'un scalpel, l'agarose non recouvert par la lame porte objet.
- Sceller le tout avec une solution de VALAP.

Bibliographie

Bibliographie

- Aaron, M. et al. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **64**, 938-52 (2007).
- Andersson, S.G. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-40 (1998).
- Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-9 (2000).
- Bartlett, D.H. Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 93-100 (1999).
- Batut, J., Andersson, S.G. & O'Callaghan, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 933-45 (2004).
- Boschiroli, M.L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64 (2001).
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, A.P., Foster, G. & Brew, S. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* **38**, 1258-62 (2000).
- Broughton, E.S. & Jahans, K.L. The differentiation of *Brucella* species by substrate specific tetrazolium reduction. *Vet Microbiol* **57**, 253-71 (1997).
- Burton, G.J., Hecht, G.B. & Newton, A. Roles of the histidine protein kinase pleC in *Caulobacter crescentus* motility and chemotaxis. *J Bacteriol* **179**, 5849-53 (1997).
- Cabeen, M.T. & Jacobs-Wagner, C. Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **3**, 601-10 (2005).
- Celli, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**, 93-8 (2006).
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5 (1994).
- Chen, J.C. et al. Cytokinesis signals truncation of the PodJ polarity factor by a cell cycle-regulated protease. *Embo J* **25**, 377-86 (2006).
- Divakaruni, A.V., Baida, C., White, C.L. & Gober, J.W. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol* **66**, 174-88 (2007).
- Dricot, A. et al. Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**, 2201-6 (2004).
- Errington, J., Daniel, R.A. & Scheffers, D.J. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 52-65, table of contents (2003).
- Farr, S.B. & Kogoma, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**, 561-85 (1991).
- Flint, D.H., Tuminello, J.F. & Emptage, M.H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268**, 22369-76 (1993).
- Godfroid, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**, 313-26 (2005).
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J. & De Bolle, X. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**, 361-5 (2004).

- Hallez, R. et al. The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**, 1444-55 (2007).
- Hinz, A.J., Larson, D.E., Smith, C.S. & Brun, Y.V. The *Caulobacter crescentus* polar organelle development protein PodJ is differentially localized and is required for polar targeting of the PleC development regulator. *Mol Microbiol* **47**, 929-41 (2003).
- Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S.K. & Viollier, P.H. Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* **124**, 1025-37 (2006).
- Imlay, J. & Fridovich, I. Exogenous quinones directly inhibit the respiratory NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **296**, 337-46 (1992).
- Imlay, J.A. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 19767-77 (1995).
- Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**, 395-418 (2003).
- Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4095-100 (2001).
- Jacobs-Wagner, C. Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol Microbiol* **51**, 7-13 (2004).
- Jenal, U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 177-91 (2000).
- Jenal, U. & Stephens, C. The *Caulobacter* cell cycle: timing, spatial organization and checkpoints. *Curr Opin Microbiol* **5**, 558-63 (2002).
- Lam, H., Matroule, J.Y. & Jacobs-Wagner, C. The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**, 149-59 (2003).
- Lam, H., Schofield, W.B. & Jacobs-Wagner, C. A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell* **124**, 1011-23 (2006).
- Lawler, M.L. & Brun, Y.V. A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry. *Cell* **124**, 891-3 (2006).
- Lindner, A.B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E.J. & Taddei, F. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3076-81 (2008).
- Livet, J. [The brain in color: transgenic "Brainbow" mice for visualizing neuronal circuits]. *Med Sci (Paris)* **23**, 1173-6 (2007).
- Lybarger, S.R. & Maddock, J.R. Polarity in action: asymmetric protein localization in bacteria. *J Bacteriol* **183**, 3261-7 (2001).
- Mascher, T., Helmann, J.D. & Uden, G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 910-38 (2006).
- Matroule, J.Y., Lam, H., Burnette, D.T. & Jacobs-Wagner, C. Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* **118**, 579-90 (2004).
- Mesbah, N.M. & Wiegel, J. Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 44-57 (2008).
- Moreno, E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75 (1998).

- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E.G., Sommer, J.M. & Newton, A. A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10297-301 (1992).
- Park, S.J. & Gunsalus, R.P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J Bacteriol* **177**, 6255-62 (1995).
- Poindexter, J.S. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* **45**, 123-79 (1981).
- Repik, A. et al. PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**, 806-16 (2000).
- Sallstrom, B. & Andersson, S.G. Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**, 579-85 (2005).
- Sciochetti, S.A., Lane, T., Ohta, N. & Newton, A. Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **184**, 6037-49 (2002).
- Shaner, N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-72 (2004).
- Shapiro, L., McAdams, H.H. & Losick, R. Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**, 1942-6 (2002).
- Skerker, J.M. & Laub, M.T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37 (2004).
- Squier, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* **36**, 1539-50 (2001).
- Steinhauer, J., Agha, R., Pham, T., Varga, A.W. & Goldberg, M.B. The unipolar *Shigella* surface protein *IcsA* is targeted directly to the bacterial old pole: *IcsP* 367-77 (1999).
- Stetter, K.O. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles* **10**, 357-62 (2006).
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. & Johnson, M.S. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**, 103-28 (1999).
- Tseng, C.P. Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products. *FEMS Microbiol Lett* **157**, 67-72 (1997).
- Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44 (1998).
- van Heijenoort, J. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 620-35 (2007).
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhoute, J. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**, 739-46 (2003).
- Viollier, P.H., Sternheim, N. & Shapiro, L. Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13831-6 (2002).
- Wang, S.P., Sharma, P.L., Schoenlein, P.V. & Ely, B. A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 630-4 (1993).
- Wardman, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* **43**, 995-1022 (2007).

Wheeler, R.T. & Shapiro, L. Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 683-94 (1999).

Young, K.D. Bacterial shape. *Mol Microbiol* **49**, 571-80 (2003).

Yu, Y.B. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1113-29 (2002).