



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation des trois protéines à domaine patatine-like chez Brucella

Gérard, Aurélie

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

Caractérisation des trois protéines à domaine patatine-like chez *Brucella*

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire

Aurélie GERARD

Janvier 2009

Caractérisation des trois protéines à domaine patatine-like chez *Brucella*

GERARD Aurélie

Résumé

Brucella spp. est une bactérie intracellulaire facultative qui possède trois patatine-like protéines que nous avons nommées PatA, PatB et PatC. Les protéines à domaine patatine ont été identifiées comme des protéines de stockage chez les plantes tandis que chez les bactéries, elles semblent être considérées comme des facteurs de virulence. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* possède une protéine sécrétée durant l'infection par le système de sécrétion de type III, ExoU, qui contient un domaine patatine-like. Cette protéine effectrice induit une toxicité dramatique après transfection ou durant l'infection des cellules hôtes. Etant donné que *Brucella*, comme de nombreuses bactéries pathogènes, est capable de pirater des fonctions cellulaires, ce processus pourrait dépendre de la sécrétion d'effecteurs. Dans une étude préalablement réalisée au laboratoire (A. Jamet, URBM Namur), il a été montré que la virulence d'un mutant de délétion *patA* de *Brucella melitensis* 16M diminue en souris en comparaison à la souche sauvage.

Les objectifs de ce mémoire étaient (i) de caractériser le rôle de PatA, PatB et PatC dans la virulence de *Brucella*, (ii) de tester leur éventuelle fonction de stockage, (iii) de déterminer l'activité phospholipase putative de PatA et PatAt (un variant tronqué de la protéine qui ne contient que le domaine patatine-like) et (iv) de tester la toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules mammifères et en levure. Afin de répondre aux deux premiers objectifs, la construction de mutants $\Delta patA$, $\Delta patB$ et $\Delta patC$ de *Brucella abortus* a été entreprise. Ces mutants seront testés dans (i) des modèles d'infection et (ii) lors de tests de croissance dans différents milieux définis. Le test de croissance sur milieux définis a montré que PatA ne semble pas posséder une fonction de stockage. (iii) La surproduction de PatA et de PatAt s'effectuera suite à l'utilisation d'un plasmide de surproduction (en cours de construction) et des tests d'activité phospholipase seront réalisés. (iv) La mesure de la libération de la LDH par les cellules produisant PatA ou PatB a montré que ces protéines n'ont pas d'effet toxique en cellules HeLa alors qu'un test préliminaire sur des levures produisant ces mêmes protéines a montré que PatB induirait un défaut de croissance.

Mémoire de Master en Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: Prof. X. De Bolle

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

Characterization of patatin-like proteins in *Brucella*

GERARD Aurélie

Summary

Brucella spp. is a facultative intracellular pathogen which contains in its genome three predicted coding sequences for patatin-like proteins that we named PatA, PatB and PatC. Patatin-like proteins have so far been characterized as storage proteins in plants or as bacterial proteins which play a role in pathogen-host interactions. For example, *Pseudomonas aeruginosa* has a protein secreted by the type III secretion system, ExoU, which contains a patatin-like domain. This effector has been shown to be highly cytotoxic after transfection or during infection of host cells. *Brucella* such as a lot of pathogenic bacteria is able to hijack many cellular functions. An hypothesis is that this might be depending on the secretion of effectors. In a previous study, A. Jamet (URBM, Namur) has shown that a *patA* deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M is attenuated compared to the wild type strain (after four weeks of infection) in a mouse virulence model.

The purposes of this study were (i) to characterize the role of PatA, PatB and PatC in *Brucella* virulence, (ii) to test their putative storage function, (iii) to determine the putative phospholipase activity of PatA and a truncated PatA variant limited to the patatin-like domain (PatAt) and (iv) to test the cytotoxicity of PatA, PatB and PatC in cultured mammalian cells and yeast. To achieve the first two objectives, mutants are under construction and will be tested (i) in infection models and (ii) during growth tests in various media. The growth assay in various media has shown that PatA does not seem to have a storage function.

(iii) Overproduction of PatA and PatAt will be performed using overexpression plasmids that are currently under construction and enzymatic activity assays will be performed. (iv) Our cytotoxicity assay of PatA, PatB and PatC, based on the release of LDH, has shown that these proteins do not cause a cytotoxic effect on HeLa cells. Preliminary toxicity assay of these three patatin-like proteins in a yeast growth model tend to shown that PatB induced a growth defect.

Master thesis in Biochemistry, molecular and cellular Biology

Janvier 2009

Promotor: Prof. X. De Bolle

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les professeurs Xavier De Bolle et Jean-Jacques Letesson pour m'avoir acceptée dans leur laboratoire. Un merci tout particulier au promoteur de ce mémoire, Xavier De Bolle, pour m'avoir donné goût à la biologie moléculaire mais aussi pour sa gentillesse et ses nombreux conseils.

Un tout grand Merci (avec un grand « M ») à la « Team effecteur », Marie, Bernard et spécialement à mes tuteurs, Didier et Géraldine, pour m'avoir encadrée et aidée tout au long de ce mémoire. Didier, merci pour ta patience, ton calme et tes conseils. Sans toi, je serai toujours en train d'attendre que les bandes migrent sur mon gel... Gégé alias la groupie, merci pour ces moments de fous rires, tes encouragements et ton aide. Réserve une date dans ton agenda pour qu'on puisse tester dans un pub anglais le fameux et incontournable « Have you met Gégé ? ». Sinon que dire d'autres... à part que vous m'avez appris beaucoup et que je vais faire de mon mieux pour appliquer outre-Manche ce que vous m'avez enseigné. Attention, le moment fatidique arrive... Click...Crack... Bong... Voilà, vous êtes enfin délestés de votre boulet ;) xoxo...

Je tiens également à remercier l'ensemble du laboratoire de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire pour nous avoir si bien accueillis durant cette année. Anne-Michelle (n'oublie pas de continuer la conception de notre tablier d'été), Cécile (grâce à ton aide, le problème du stockage a trouvé une réponse), Charles (Non, ça sent plus le stress en Bauchau), Christian, Fanélie, Julien, Marie-Alice, Marie G, Matthieu, Maxime, Monique, Mira, Richard, Rose-Ma, Sophie et Yohann (GéoChallenge c'est beaucoup plus facile avec ton aide), merci à vous tous, pour l'ambiance et la bonne humeur quotidiennes. Merci aussi à Aurore (et ses expressions inoubliables) et à Dédé (et ses petits grégroly, p.s. : tu n'as pas encore réussi à te venger pour les batailles de glaçons :p), pour les nombreuses discussions échangées lors des temps d'incubation et pour vos encouragements.

Merci aux biologistes et tout particulièrement à mon binôooooome (Sophie), à Annick, Christophe, Emy, Ludo et Sam pour votre amitié, votre soutien et toutes ses soirées et délires partagés. A dans 3 ans si je ne me trompe pas ;). Sans oublier mes collègues mémorants : Céline (Dear S. it's gonna be legend...wait for it...), Mike (il va falloir te mettre à la culture anglaise pour pouvoir continuer à faire le jukebox), Caro (la virtuose des macs) et Céline G (la pro des calculs de dilution et de concentration).

Merci aussi à Bene (pour toutes ces soirées « études » et les pétages de plomb à la péda !! *un bateau qui passe et je suis heureux houhououou*), Leti et TDC, Nath et Lombric, Catherine et Dé, Alizée, Séverine, Edward, mes co-koteuses et à toi aussi ;) pour tous ces bons moments et délires passés à Namur mais aussi pour ceux à venir.

Je voudrais également remercier mes parents, ma sœur et mes grands-parents pour l'aide et le soutien apportés lors de la correction de ce mémoire.

Enfin, je tiens tout particulièrement à écrire un « spécial merci » à la patate sans qui ce mémoire n'aurait jamais été possible ! Et aussi à l'incidine qui m'a de nombreuses fois sauvée de *Brucella* la perfide (hein, Didier :D) En même temps, je ne sens toujours pas la paille mouillée alors tout va bien !

Mesdames C. Michiels et S. Pastoret ainsi que Messieurs J-Y. Matroule et S. Vankoningsloo, membres du jury, je vous remercie d'avance pour le temps que vous allez consacrer à la lecture critique de ce mémoire.

... dary

Tables des matières

Introduction	1
1. Le genre <i>Brucella</i>	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. La brucellose	1
1.3. Internalisation et trafic intracellulaire de <i>Brucella</i>	2
1.4. Exemples de différentes stratégies utilisées par deux bactéries pathogènes intracellulaires pour dévier le trafic	3
1.4.1. Internalisation de <i>Salmonella</i> et arrêt de la maturation du phagosome.....	4
1.4.2. Détournement de la voie classique de phagocytose par <i>Legionella</i>	4
2. Recherche d'effecteurs chez <i>Brucella</i>	6
3. Les patatines	7
3.1. Découverte de la patatine chez les plantes	7
3.2. Les phospholipases.....	7
3.2.1. Définition et classification des phospholipases.....	7
3.2.2. Les phospholipases A.....	7
3.2.3. Activité phospholipase A2 de la patatine	8
4. Activité phospholipase dans la relation hôte-pathogène	9
4.1. Action des phospholipases chez les bactéries	9
4.2. Action des phospholipases chez l'hôte eucaryote	9
5. Deux exemples de bactéries possédant une protéine à domaine patatine-like phospholipase	10
5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
5.1.1. Quatre effecteurs du système de sécrétion de type III.....	10
5.1.2. Toxicité d'ExoU en cellules mammifères	10
5.1.3. Toxicité d'ExoU en levure	11
5.2. <i>Legionella pneumophila</i>	11
Objectifs du mémoire.....	13
Résultats	14
1. Analyses bioinformatiques.....	14
2. Construction des mutants de délétion de <i>patA</i> , <i>patB</i> et <i>patC</i>	15
2.1. Stratégie utilisée pour obtenir les mutants de délétion.....	15
2.2. Construction des mutants $\Delta patA$, $\Delta patB$ et $\Delta patC$	16
2.3. Infection de cellules HeLa par <i>Brucella melitensis</i> $\Delta patA$	19
2.4. Test de l'éventuelle fonction de stockage de PatA.....	20
3. Construction des vecteurs d'expression pour la surproduction et la purification de PatA et PatAt	22
4. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules mammifères	24
4.1. Construction des vecteurs de destination	24
4.2. Transfection de cellules mammifères avec les plasmides de destination.....	25
4.3. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC	27
4.4. Résultats du test de toxicité.....	27
5. Test de toxicité de PatA, PatB et PatC en levure	29
5.1. Construction des vecteurs de destination	29
5.2. Test de survie de PatA, PatB et PatC en levure.....	30
Discussions et perspectives	33
1. Construction des mutants de délétion.....	33

2. Test d'infection de cellules HeLa par le mutant $\Delta patA$	34
3. Détermination de l'éventuelle fonction de stockage de <i>patA</i>	35
4. Construction de plasmides d'expression pour la surproduction et la purification de PatA et PatAt	35
5. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules HeLa et BHK-21	36
6. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en levure	37
7. Conclusion	38
Matériels et méthodes	39
1. Milieux de culture	39
1.1. Milieux de culture pour les bactéries	39
1.1.1. Milieu riche pour <i>E. coli</i> : milieu Luria Bertani (LB)	39
1.1.2. Milieu riche pour <i>Brucella spp.</i> : milieu 2YT	39
1.1.3. Milieu défini : composition de la base saline	39
1.1.4. Sources de carbone et d'azote utilisées dans le milieu défini	39
1.2. Milieux de culture pour les cellules eucaryotes	40
1.3. Milieux de culture pour les levures	40
1.3.1. Milieux synthétiques complets (Sc) (milieux sélectifs)	40
1.3.2. Préparation du mélange poudré d'acides aminés	41
1.3.3. Milieu Yeast Extract bacto-Peptone D-glucose (YEPD) (milieu riche)	41
2. Techniques relatives à l'ADN	41
2.1. Extraction d'ADN plasmidique « Miniprep »	41
2.2. Dosage au nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Isogen Life Science)	41
2.3. Restriction d'ADN	42
2.4. Réaction de ligation	42
2.5. Amplification par PCR	42
2.6. Purification de produit PCR (MSB spin PCRapace, Invitex)	43
2.7. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose	43
2.8. Extraction d'ADN d'un gel agarose (PurExtrem Kit, Fermentas)	44
2.9. Clonage Gateway™	44
3. Techniques relatives aux protéines	45
3.1. Préparation d'extraits cellulaires	45
3.2. Analyse par Western blot	45
3.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	45
3.2.2. Préparation et chargement des échantillons	46
3.2.3. Migration	46
3.2.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose	46
3.2.5. Immunodétection	46
4. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	47
4.1. Préparation de cellules $CaCl_2$ compétentes	47
4.2. Transformation bactérienne par choc thermique	48
4.3. Conjugaison bactérienne	48
5. Techniques relatives à l'utilisation de cellules mammifères	49
5.1. Préparation de cellules eucaryotes mammifères pour la transfection	49
5.2. Transfection transitoire de cellules eucaryotes	49
5.3. Kit de détection de cytotoxicité en mesurant la libération de LDH (Roche)	49
5.4. Infection de cellules HeLa par <i>Brucella melitensis</i> 16 M et $\Delta patA$	50
6. Transformation de levures	50
Références bibliographiques	51

Liste des abréviations

Abréviation	Nom complet
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp ^R	Résistance à l'ampicilline
pb	Paire de base
BCV	<i>Brucella</i> -containing vacuole
BMEI	<i>Brucella melitensis</i> chromosome I
BMEII	<i>Brucella melitensis</i> chromosome II
CFU	Colony forming unit
C-terminal	Extrémité carboxy-terminale
dH ₂ O	Eau distillée
ddH ₂ O	Eau désionisée et distillée
D.O.	Densité optique
dNTP	Déoxynucléotide triphosphates
EEA1	Early endosome antigen 1
ERES	Endoplasmic reticulum exit site
ExoU	Exoenzyme U
HIV	Human immunodeficiency virus
iPLA2	Independant calcium phospholipase A2
Kan ^R	Résistance à la kanamycine
KDa	Kilo Dalton
LAMP-1	Lysosomal associated membrane protein 1
LB	Luria Bertani
LCV	<i>Legionella</i> -containing vacuole
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MW	Molecular weight
N-terminal	Extrémité amino-terminale
ORF	Open reading frame
PAF	Platelet activating factor synthesis
PatA	Patatine-like protéine A
PatAt	Patatine-like protéine A tronquée
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PLA2	Phospholipase A2
PLA2c	Phospholipase A2 intracytoplasmique
PLA2s	Phospholipase A2 extracellulaire
PMN	Polymorphonucléaire

RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Rotation par minute
SCV	<i>Salmonella</i> -containing vacuole
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity islands
T4SS	Système de sécrétion de type IV
T _m	Température de melting
TNF	Tumor necrosis factor
TTSS	Type three secretion system
UV	Ultraviolet
VIP	Vacuole protein sorting inhibitor protein
WT	Wild-type

Introduction

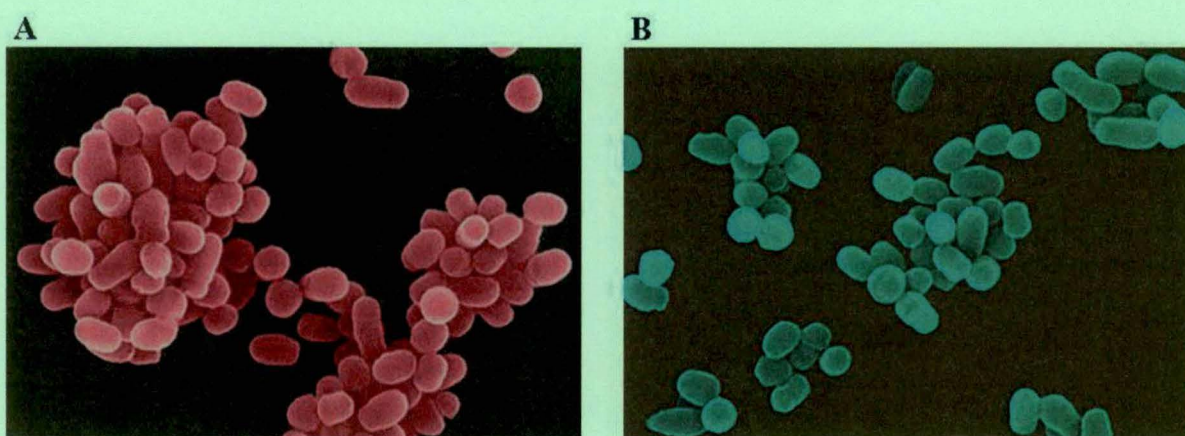


Figure 1 : Micrographie électronique à balayage de *Brucella abortus* (A) et de *Brucella melitensis* (B). Reproduit de : <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Bmelitensis.html>

Tableau 1 : Les différentes espèces et biovars du genre *Brucella*, leurs caractéristiques épidémiologiques, et leur pouvoir pathogène chez l'homme (Maurin, 2005).

Espèce	Biovars	Répartition géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. abortus</i>	1 à 6, et 9	ubiquitaire	bovins, ongulés sauvages	modérée
<i>B. melitensis</i>	1 à 3	bassin méditerranéen, moyen orient	ovins, caprins, ongulés sauvages	forte
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	suidés	forte
<i>B. suis</i>	2	Europe centrale et occidentale	suidés et lièvres	Faible ^a
<i>B. suis</i>	4	Amérique du Nord, Russie	rennes	modérée
<i>B. suis</i>	5	Russie	rongeurs sauvages	forte
<i>B. canis</i>		ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	chiens	faible
<i>B. ovis</i>		bassin méditerranéen	ovins	nulle
<i>B. neotomae</i>		Utah (États Unis)	rats du désert	non connue
<i>B. cetaceae</i>		non connue	cétacés (dauphins)	non connue
<i>B. pinnipediae</i>		non connue	pinnipèdes (phoques, otaries)	non connue ^b

^a Rares cas d'infections humaines rapportés dans la littérature

^b Deux cas probables d'infection humaine, rapportés chez des patients péruviens émigrés récemment aux États-Unis, et présentant une atteinte neurologique, et comme facteurs de risque une consommation régulière de fromages frais et de fruits de mer crus

1. Le genre *Brucella*

1.1. Généralités

Brucella spp. est un coccobacille à Gram négatif (0,6 à 1,5 µm de long sur 0,5 à 0,7 µm de diamètre), non mobile, asporulé et dépourvu de capsule (Corbel, 1984) (**figure 1**). Cette bactérie pathogène, qui a été découverte en 1887 par le microbiologiste David Bruce, appartient au genre *Brucella* et à la famille des alpha-protéobactéries. Cette famille comprend aussi d'autres pathogènes ou symbiotes d'animaux et de plantes qui ont la capacité d'interagir avec des cellules eucaryotes telles qu'*Agrobacterium spp.*, *Rhizobium spp.* ou encore *Bartonella spp.* (Sallstrom and Anderson, 2005).

Les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont des agents étiologiques d'une maladie infectieuse chronique appelée brucellose. Ces bactéries sont divisées en huit espèces sur base de leurs préférences pour des hôtes spécifiques, et de tests biochimiques et immunologiques : *Brucella abortus* (bovins), *Brucella canis* (chiens), *Brucella cetacean* (cétacés), *Brucella melitensis* (petits ruminants), *Brucella neotomae* (rats du désert), *Brucella ovis* (béliers), *Brucella pinnipediae* (otaries et morsés) et *Brucella suis* (porcs) (**tableau 1**) (Boschiroli *et al.*, 2001 ; Moreno *et al.*, 2002, Maurin, 2005).

1.2. La brucellose

La brucellose¹ est une des zoonoses la plus répandue au monde. Cette maladie chronique, handicapante et sévère est provoquée par les bactéries du genre *Brucella*. Etant donné que cinq *Brucella melitensis* 16M sont suffisantes pour infecter un être humain et que la maladie qui en découle requiert un traitement coûteux et de longue durée, les Etats-Unis considèrent *Brucella* comme un agent potentiel de bioterrorisme (Boschiroli *et al.*, 2001).

La brucellose animale est essentiellement une maladie du système reproducteur. Chez le mâle, elle se caractérise par des épидidymites et des problèmes de stérilité tandis que chez la femelle, elle se manifeste par des atteintes de l'utérus, des infections mammaires, des infections du fœtus et un avortement. La brucellose chez les animaux est responsable de nombreux problèmes économiques et de santé publique dans la plupart des pays en voie de développement puisque l'agriculture et l'élevage constituent les ressources principales de ces populations. En région moins endémique, la brucellose se détecte parfois chez des personnes exerçant des professions à risque tels que les chercheurs, les fermiers et les vétérinaires (Boschiroli *et al.*, 2001), mais l'homme est considéré comme un hôte accidentel.

¹ Dans la littérature, plusieurs termes peuvent être utilisés pour désigner la brucellose : fièvre de Malte, fièvre ondulante, mélitococcie, fièvre sudoro-algique, fièvre méditerranéenne ou encore maladie de Bang.

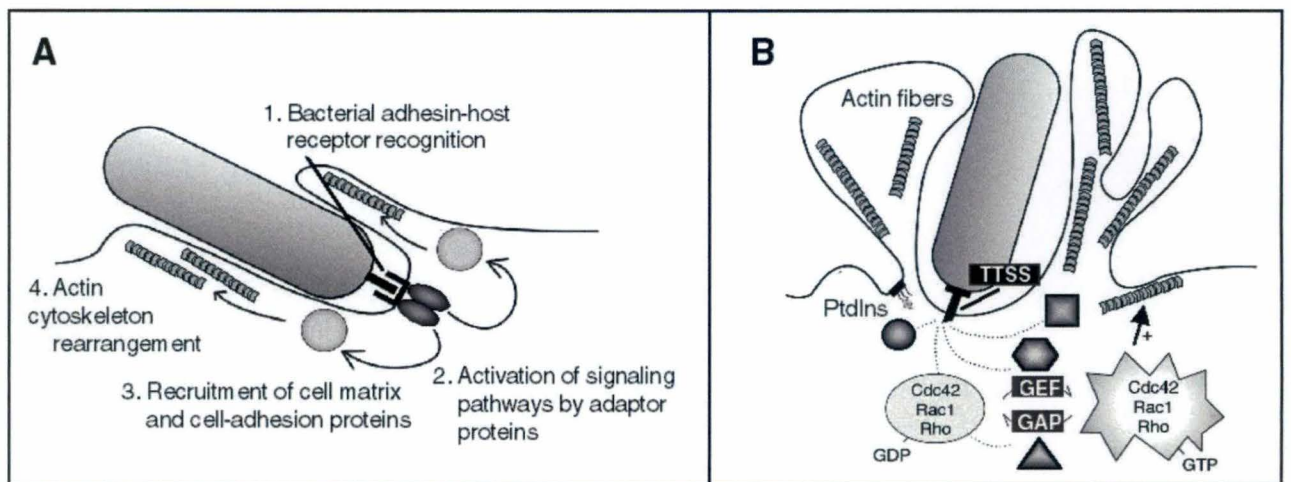


Figure 2 : Mécanismes d'entrée d'un pathogène dans une cellule eucaryote (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004). (A) Entrée par zippering via des interactions spécifiques ligands-récepteurs. (B) Entrée par triggering qui dépend d'un réarrangement du cytosquelette d'actine suite à l'injection de protéines dans la cellule hôte.

Parmi les huit espèces de *Brucella* qui ont été décrites et nommées en fonction de l'hôte dans lequel elles ont été isolées, quatre sont capables d'infecter l'homme : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* et *Brucella canis* (Corbel, 1984). L'infection se transmet à l'homme soit par contact direct au niveau d'une lésion cutanée ou bien d'une muqueuse, soit par ingestion d'aliments contaminés d'origine animale (comme le fromage et le lait non pasteurisé) ou encore par inhalation (Smith and Ficht, 1990 ; Boschioli *et al.*, 2001). La brucellose humaine se caractérise par une phase aiguë et une phase chronique. La phase aiguë se définit par les symptômes suivants : fièvre intermittente, sueurs nocturnes, maux de tête, fatigue et perte de poids. Dans 30 % des patients infectés par *Brucella*, la phase aiguë évolue en phase chronique. Cette phase chronique induit une multitude de complications pouvant être de types pulmonaire, ostéoarticulaire, gastro-intestinale, urogénitale, cardiovasculaire et/ou neurologique (Young, 1995 ; Jimenez de Bagues *et al.*, 2005). Etant donné qu'il n'existe pas de vaccin contre la brucellose humaine mais qu'il existe un traitement antibiotique efficace (à base de rifampicine et de doxycycline), *Brucella* est considérée comme un pathogène de type III (Jimenez de Bagues *et al.*, 2005).

1.3. Internalisation et trafic intracellulaire de *Brucella*

Les bactéries intracellulaires pathogènes comme *Brucella* se sont adaptées à leurs hôtes en établissant des stratégies pour contourner le système immunitaire et les processus cellulaires à leur avantage. Ces bactéries sont internalisées dans la cellule soit à l'aide de phagocytes professionnels tels que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques ou les monocytes, soit à l'aide de cellules non-professionnelles.

L'entrée de *Brucella* dans les cellules eucaryotes se réalise suite à un processus de type zippering (Ackermann *et al.*, 1988). De manière générale, ce processus permet une entrée médiée par des interactions spécifiques ligands-récepteurs : (i) une ou plusieurs adhésines de la bactérie se lient à un ou plusieurs récepteurs de surface de la cellule hôte. (ii) Cette interaction induit l'activation des voies de signalisation de la cellule hôte permettant : (iii) le réarrangement du cytosquelette d'actine, (iv) la réorganisation de la membrane et (v) l'internalisation de la bactérie (**figure 2 A**) (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004). Les récepteurs ciblés par les pathogènes se situent généralement au niveau des radeaux lipidiques. Ces « lipid rafts » sont des microdomaines spécialisés de la membrane plasmique enrichis en sphingolipides et cholestérol.

Brucella est capable de pénétrer par zippering dans la cellule au niveau de ces lipid rafts (Naroeni and Porte, 2002 ; Porte *et al.*, 2003). La plupart des bactéries entrées par phagocytose sont tuées pendant les premières heures qui suivent l'internalisation. Ceci signifie que toutes les bactéries n'échappent pas à la voie endocytaire et que seule une fraction survit et se réplique à long terme. Le potentiel de survie intracellulaire n'est donc pas totalement programmé à l'entrée (Celli and Gorvel, 2004). Une fois internalisée, *Brucella* réside à l'intérieur d'une vacuole que l'on nomme BCV (*Brucella* containing vacuole) qui est en réalité un phagosome modifié dans lequel la bactérie est capable de survivre (Jimenez de Bagues, 2004). La BCV nouvellement formée interagit avec les endosomes précoces définis par la présence en membrane des marqueurs Rab5 et early endosome antigen-1 puis avec les endosomes intermédiaires (marqueur LAMP-1, lysosomal associated membrane protein) (Celli, 2006). La mise en évidence du trafic intracellulaire de *Brucella* s'est réalisée suite à l'acquisition transitoire de protéines caractéristiques des compartiments cellulaires impliqués

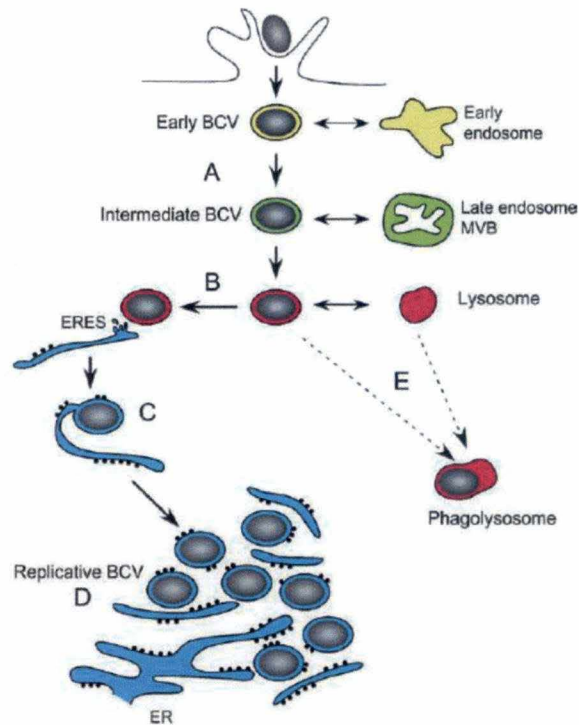


Figure 3 : Modèle du trafic intracellulaire de *Brucella* (Starr *et al.*, 2008).

(A) Après avoir été phagocytée, *Brucella* réside dans une BCV (*Brucella* containing vacuole) qui interagit avec l'endosome primaire (jaune) et l'endosome tardif (vert). (B) Cette BCV intermédiaire fusionne alors avec le lysosome (rouge) avant d'interagir avec le réticulum endoplasmique au niveau des sites de sortie (ERES, endoplasmic reticulum exit sites, bleu). (C) La BCV en fusionnant avec le RE génère une organelle dérivée du RE (D) où *Brucella* se réplique (replicative BCV).

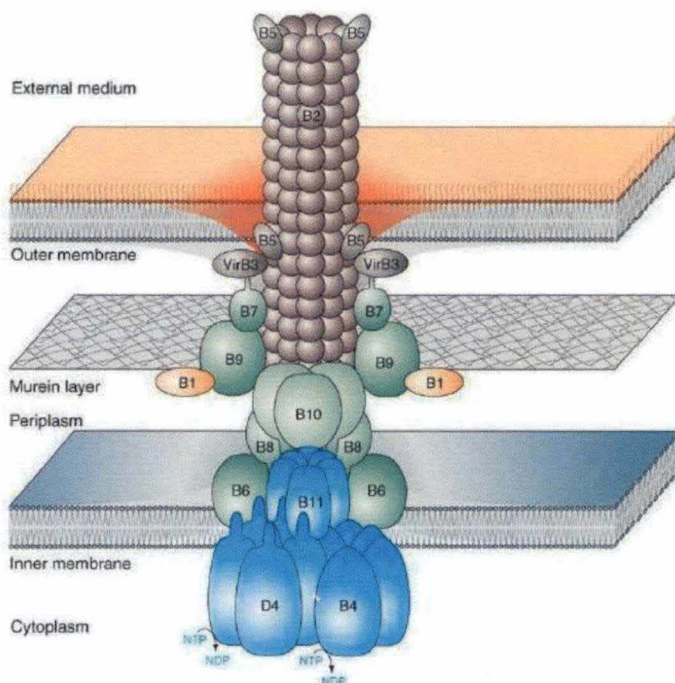


Figure 4 : Modèle de la structure du système de sécrétion de type IV (Backert *et al.*, 2006).

Le système de sécrétion de type IV est responsable de la sécrétion de protéines seules et de complexes ADN-protéine à travers l'enveloppe bactérienne

lors de la maturation de la BCV (Celli *et al.*, 2003). La BCV interagit et fusionne ensuite, pour une courte durée, avec les endosomes tardifs et le lysosome (marqueurs Rab7 et son effecteur Rab-interacting lysosomal protein, RILP) (Starr *et al.*, 2008). Lors de la fusion avec le lysosome, la BCV acquiert des propriétés lysosomales, notamment une activité protéolytique. Il est important de préciser que cette fusion avec le lysosome est limitée et contrôlée par la bactérie afin d'éviter sa dégradation (Starr *et al.*, 2008). La dernière étape du trafic intracellulaire consiste en l'interaction de la BCV avec le réticulum endoplasmique au niveau des sites de sortie (endoplasmic reticulum exit sites, ERES) et la fusion avec celui-ci pour engendrer une organelle dérivée du réticulum endoplasmique, où la réplication de *Brucella* peut se produire (**figure 3**) (Celli *et al.*, 2003 ; Starr *et al.*, 2008).

L'acidification de la BCV, qui se produit progressivement suite aux interactions avec les différents compartiments de la voie endocytaire, est requise pour la survie et la réplication bactérienne (Porte *et al.*, 1999). Ceci peut être mis en relation avec le rôle important que joue l'acidification pour l'expression du système de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB* (Boschioli *et al.*, 2002) (**figure 4**). Chez les bactéries à Gram négatif, il existe différents types de système de sécrétion qui permettent à des protéines synthétisées de franchir la membrane interne, le périplasme et la membrane externe pour se retrouver dans le milieu, qui peut être le cytosol d'une cellule infectée (Saier, 2006). Les protéines sécrétées sont nécessaires pour de nombreux aspects de la vie d'une bactérie comme par exemple l'acquisition de nourriture, la biogenèse des organelles ou encore la virulence. Le système de sécrétion de type IV est constitué par une famille de 11 protéines (VirB1-11 et parfois aussi VirD4) qui sont responsables de la sécrétion de protéines seules ou de complexes ADN-protéine à travers l'enveloppe bactérienne (Lavigne *et al.*, 2006). Ce système de sécrétion de type IV peut jouer un rôle dans la colonisation bactérienne, la formation de biofilm, l'échange de matériel génétique et l'export de facteurs de virulence dans le cytoplasme d'une cellule hôte (Backert and Meyer, 2006).

Nous avons décrit le trafic intracellulaire de *Brucella* mais il existe d'autres stratégies qui peuvent être utilisées par les bactéries pathogènes intracellulaires pour envahir une cellule hôte. Nous insisterons dans les descriptions qui suivent sur l'importance de protéines sécrétées par les bactéries dans la modulation des réponses de l'hôte et l'établissement de leur niche de réplication.

1.4. Exemples de différentes stratégies utilisées par deux bactéries pathogènes intracellulaires pour dévier le trafic

Contrairement à *Brucella* qui empêche sa dégradation dans le lysosome tout en interagissant avec les différents compartiments de la voie endocytaire, *Salmonella* provoque un arrêt de la maturation du phagosome et *Legionella* détourne le trafic en évitant la fusion avec l'endosome précoce et le lysosome (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004). Les effecteurs semblent avoir des rôles essentiels dans les processus d'internalisation de la bactérie et dans la survie intracellulaire. Dans ce mémoire, nous définissons le terme effecteur comme une protéine bactérienne qui, une fois sécrétée, peut interférer avec un ou plusieurs processus de la cellule hôte à l'avantage de la bactérie. Cette modulation peut dépendre de l'interaction physique entre l'effecteur et une protéine de l'hôte.

Tableau 2 : Effecteurs de TTSS-1 (type three secretion system-1) de *Salmonella* et leurs homologues chez les bactéries pathogènes (Ly et Casanova., 2007).

Effector	Function	Orthologues
AvrA	Cysteine protease, inhibits NF- κ B signalling	YopJ, YopP
SipA	Enhances actin filament assembly; inhibits actin disassembly; disrupts tight junctions; SCV trafficking	IpaA
SipB	Cholesterol-binding translocon component, triggers apoptosis via caspase-1 activation in macrophages and dendritic cells	IpaB, BipB, YspB
SipC	Translocon component; mediates effector molecule translocation; promotes actin polymerization and bundling	IpaC, BipC
SipD	Translocon component	IpaD, BipD, LcrV, PcrV
SopE	Guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 and Rac1; promotes assembly of branched actin filaments	BopE
SopE2	Guanine nucleotide exchange factor for Cdc42; promotes pro-inflammatory signalling	BopE
SigD/SopB	Phosphoinositide phosphatase; involved in phagosomal closure, enhances RhoG activation, disrupts tight junctions, stimulates chloride secretion, modulates SCV trafficking, prevents apoptosis through activation of Akt	IpgD
SopD	Unknown	None
SopD2	Localizes to LAMP ⁺ compartments; contributes to Sif formation	None
SirP	Leucine-rich protein of unknown function	YopM, IpaH
SspH1	Related to SirP, inhibits NF- κ B activation via protein kinase N1	YopM, IpaH
SptP	Rho GAP domain functions in downregulating host membrane ruffling after entry; tyrosine phosphatase domain acts on ACK, vimentin, presumably other substrates	YopE, ExoS

1.4.1. Internalisation de *Salmonella* et arrêt de la maturation du phagosome

Alors que *Brucella* pénètre dans la cellule par « zippering » en activant des récepteurs membranaires de la cellule, *Salmonella* quant à elle, entre dans la cellule via un mécanisme de type « triggering » qui permet un réarrangement du cytosquelette d'actine suite à l'injection de protéines dans la cellule hôte (**figure 2B**) (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004).

Salmonella possède deux Type Three secretion system (TTSS-1 et TTSS-2) qui sont encodés par des îlots de pathogénicité (SPI-1 et SPI-2, *Salmonella* pathogenicity islands) (Galan, 1996). TTSS-1 permet l'injection rapide de protéines effectrices qui initient le réarrangement du cytosquelette d'actine, la formation de crêtes membranaires et l'internalisation de la bactérie (Zhou and Galan, 2001 ; Jaffe *et al.*, 2005). Treize protéines effectrices ont été identifiées comme étant sécrétées par ce système de sécrétion de type III (**tableau 2**). Il a été montré que six d'entre elles avaient un rôle direct ou indirect à jouer dans la régulation du cytosquelette d'actine. (i) SipC est un composant du translocon qui permet le passage des effecteurs et contribue à l'internalisation de la bactérie en favorisant la polymérisation des filaments d'actine. (ii) SipA permet l'assemblage et la stabilisation des filaments d'actine. (iii) SopE, SopE2 et SopB provoquent l'activation de Rho GTPases telles que Cdc42 et Rac1 induisant la polymérisation d'actine et la formation de crêtes membranaires. (iv) SptP permet la réorganisation du cytosquelette d'actine dans sa position initiale dans la cellule hôte après l'internalisation de la bactérie (Schlumberger and Hardt, 2006 ; Ly and Casanova, 2007 ; Mattoo *et al.*, 2007).

Une fois internalisée, la bactérie se retrouve dans une vacuole nommée SCV (*Salmonella*-containing vacuole). Cette vacuole est modifiée par la bactérie afin d'arrêter la maturation du phagosome à différents stades de la voie phago-lysosomale (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004). La SCV devient alors une niche intracellulaire qui permet la protection et la réplication de *Salmonella* (Brumell and Grinstein, 2004). TTSS-2 joue un rôle important dans la survie et la capacité de réplication de *Salmonella* dans les cellules hôtes. Certains effecteurs de TTSS-1 sont requis pour la persistance de *Salmonella* mais en général ce sont les protéines effectrices de TTSS-2 qui sont impliquées dans la survie intracellulaire de la bactérie. Plus de dix effecteurs de TTSS-2 ont été identifiés. Ils permettent de moduler les fonctions de la cellule hôte notamment en induisant des changements dans l'organisation du cytosquelette et dans le trafic membranaire (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004 ; Schlumberger and Hardt, 2006 ; Bhavsar *et al.*, 2007). Ainsi, par exemple, SifA et SseJ assurent l'intégrité de la membrane vacuolaire et SseG permet la localisation de la bactérie dans le Golgi et sa réplication (Alonso et Garcia-del Portillo, 2004).

1.4.2. Détournement de la voie classique de phagocytose par *Legionella*

Dès que *Legionella* est entrée dans la cellule hôte, elle est enfermée dans une vacuole nommée *Legionella*-containing vacuole (LCV). Cette vacuole évite la fusion avec les endosomes tardifs et le lysosome (Robinson and Roy, 2006). La LCV est recouverte de ribosomes et de petites vésicules lisses qui proviennent du réticulum endoplasmique (Abu Kwaik, 1996 ; Ninio and Roy, 2007). Ces petites vésicules lisses fusionnent avec la LCV afin de former une vésicule dérivée du réticulum endoplasmique qui est propice à la réplication de *Legionella* (Tilney *et al.*, 2001 ; Kagan and Roy, 2002 ; Ninio and Roy, 2007). Des protéines

Tableau 3 : Effecteurs exportés par le système de sécrétion Dot/Icm de *Legionella* (Ninio et Roy, 2007)

Effector	Protein homology domains	Comment	Refs
RalF	Sec7	Exchange factor for ARF GTPases	[19]
LidA	Coiled coil	Binds Rab1 GTPase; involved in modulating secretory pathway	[23,26,73]
SidC	Coiled coil		[21,24,37,44,51,58]
SidG	Coiled coil	IcmW interacting protein	
SidH	Coiled coil	IcmW interacting protein	
SdhA	Coiled coil	Required for prevention of host cell death	
SidJ		Required for efficient recruitment of ER vesicles to the <i>Legionella</i> vacuole	
SdjA		IcmS interacting protein	
SdeA		IcmS interacting protein	
SdeC			
LepA	Coiled coil	Required for efficient release	[53]
LepB	Coiled coil, transmembrane	Required for efficient release	
WipA	Coiled coil	IcmW interacting protein	[24]
WipB	Coiled coil		
YifA	Coiled coil, transmembrane	Inhibits yeast growth Localizes to punctate structures in infected cells	[22]
YifB	Coiled coil, transmembrane		
VipA	Coiled coil	Inhibits lysosomal protein trafficking in yeast	[27,66]
VipF	Acetyltransferase	Inhibits lysosomal protein trafficking in yeast	
VipD	Phospholipase A2	Inhibits lysosomal protein trafficking in yeast	
VpdA	Phospholipase A2		
VpdB	Phospholipase A2		
DrrA (SidM)	Coiled coil	Exchange factor for Rab1 GTPase	[25,26]
LegL3	Leucine-rich repeat		[20]
LegL5	Leucine-rich repeat		
LegL7	Leucine rich repeat		
LegLC4	Coiled coil, Leucine rich repeat		
LegLC8	Coiled coil, Leucine rich repeat		
LegC5	Coiled coil		
LegG2	GDP/GTP exchange		
Ceg10		Regulated by PmrA	[57]
Ceg23		Regulated by PmrA	
Ceg29		Regulated by PmrA	

effectrices semblent être impliquées à tous les stades de la vie intracellulaire de la bactérie. *Legionella* est une bactérie à Gram négatif intracellulaire qui exporte des protéines effectrices dans la cellule hôte via un système de sécrétion de type IV appelé Dot/Icm (Segal *et al.*, 1998 ; Vogel *et al.*, 1998). Ce système de sécrétion est encodé par les gènes *dot* (defective organelle trafficking) et *icm* (intracellular multiplication). Il joue un rôle important dans le cycle intracellulaire et dans la virulence de la bactérie. A l'heure actuelle, une trentaine de protéines sécrétées ont été identifiées chez *Legionella* (**tableau 3**). Encore peu d'effecteurs de *Legionella* ont été caractérisés à ce jour. Néanmoins, il a été montré que : (i) VipA et VipD jouent un rôle dans la modulation du trafic vésiculaire de l'hôte et dans l'inhibition de la maturation du phagosome. (ii) RalF et SidM sont des facteurs d'échanges nucléotidiques (GDP/GTP) qui facilitent le recrutement de protéines de l'hôte Arf1 et Rab1 respectivement. Celles-ci sont impliquées dans le recrutement de vésicules au cours de la biogenèse de la vacuole répllicative en permettant la régulation de la fusion des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique avec l'appareil de Golgi. (iii) LidA stabilise le complexe qui lie les vésicules dérivées du réticulum endoplasmique à la membrane de la LCV. (iv) SidJ est impliqué dans le recrutement des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique vers la LCV. (v) Les protéines LepA et LepB (*Legionella* effector protein) favorisent quant à elles la libération des bactéries hors de la cellule hôte (Ninio and Roy, 2007).

Les deux exemples de bactéries pathogènes intracellulaires que nous avons présentés ci-dessus montrent bien que les effecteurs jouent un rôle très important dans la régulation du mécanisme d'entrée et du trafic intracellulaire des bactéries.

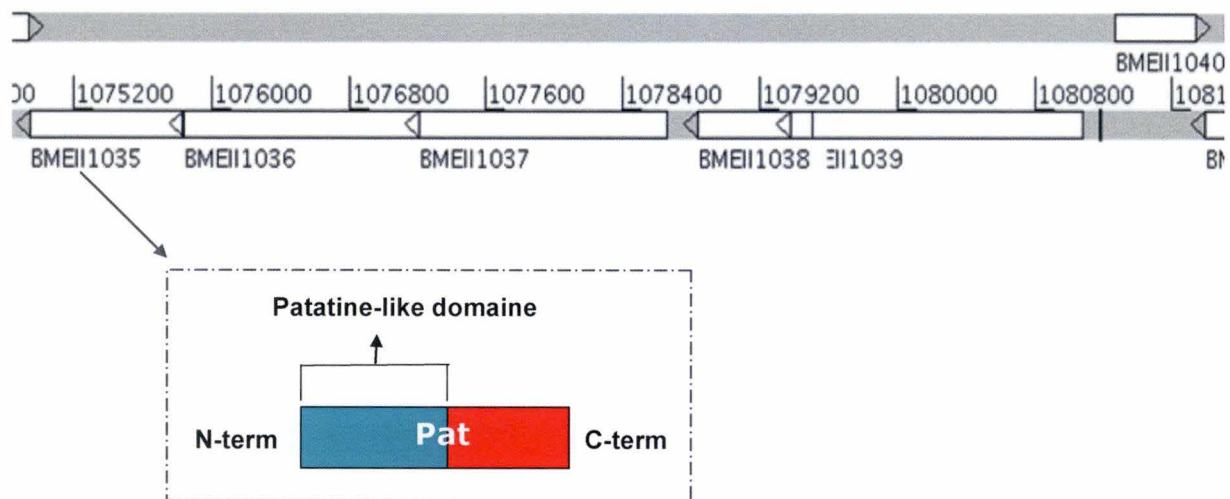


Figure 5 : Environnement génomique du gène codant PatA (BMEII1035) chez *Brucella*.

Chez *Brucella*, PatA est composée d'un domaine patatine-like en position N-terminale (bleu) et d'un domaine de fonction inconnue en position C-terminale (rouge). Cette protéine est codée par le gène BMEII1035 qui semble se trouver en opéron avec les gènes BMEII1036 et BMEII1037 (encodant tous deux des protéines annotées comme zinc protéases).

2. Recherche d'effecteurs chez *Brucella*

A l'heure actuelle, aucun effecteur de fonction connu n'a encore été identifié chez *Brucella spp.* La difficulté de trouver des effecteurs n'est pas dû à un problème d'identification de protéines sécrétées mais bel et bien à un problème de détermination de la fonction de ces protéines une fois qu'elles sont sécrétées dans la cellule hôte. Deux protéines exportées par le système de sécrétion de type IV, VceA et VceC, ont récemment été découvertes chez *Brucella spp.* (De Jong *et al.*, 2008). La fonction éventuelle de ces candidats effecteurs peut être testée suite à la réalisation de cribles fonctionnels (double-hybride). Une autre méthode par analyses bioinformatiques (analyse par homologie avec des domaines connus) permet de donner des pistes sur la fonction de ces protéines d'intérêt.

Au laboratoire, dans le cadre de la recherche d'effecteurs chez *Brucella spp.*, une stratégie a montré que, par comparaison avec la souche sauvage, le mutant de délétion du gène BMEII1035 de *Brucella melitensis* 16M est atténué en souris quatre semaines post-infection (résultat non publié, Alexandre Jamet, URBM Namur). Ceci signifie que le nombre de CFU (colony forming unit) récupérées dans la rate quatre semaines après l'infection est plus faible si la souris a été infectée avec la souche mutante par rapport à la sauvage. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ce gène est requis pour la virulence.

Une analyse bioinformatique a permis de découvrir que ce gène BMEII1035 (patatine-like) possède une homologie de séquence avec le domaine patatine de *Solanum tuberosum* (**figure 5**). Ce gène a dès lors été nommé *patA*.

Or, il est intéressant de noter que d'autres bactéries pathogènes telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* possèdent des effecteurs (respectivement ExoU et VipD) qui ont été identifiés comme ayant un domaine patatine-like qui joue un rôle dans la fonction de ces protéines (Sato *et al.*, 2004 ; Shohdy *et al.*, 2005). Il nous est donc paru intéressant de poursuivre l'étude de cette protéine BMEII1035, que nous avons renommée PatA (patatine-like protein A).

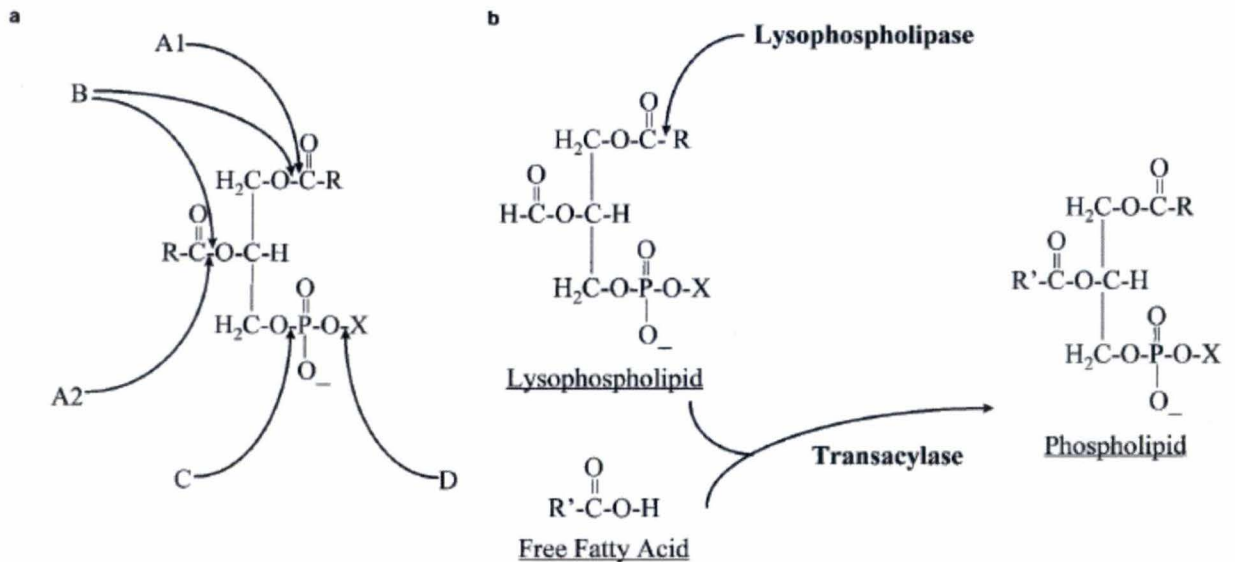


Figure 6 : Sites d'action des différentes phospholipases (Ghannoum, 2000).

(a) Représentation schématique de l'action hydrolytique des phospholipases A1, A2, B, C et D.

(b) Représentation schématique de l'activité lysophospholipase et lysophospholipase transacylase.

Rappel sur l'enveloppe des bactéries à Gram négatif.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes : la membrane interne (ou membrane cytoplasmique) et la membrane externe qui sont séparées l'une de l'autre par l'espace périplasmique. La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides et de nombreuses protéines transmembranaires. Chez les bactéries à Gram négatif, l'ensemble formé par la membrane externe et la fine couche de peptidoglycane se nomme paroi bactérienne. La membrane interne, quant à elle, est composée d'une bicouche phospholipidique classique dans laquelle sont également incorporées des protéines (**figure A**).

Les lipides sont généralement des composants fonctionnels des membranes bactériennes (**figure B**). Les composants lipidiques principaux de la membrane d'*E. coli* sont tous des phospholipides (75% phosphatidyléthanolamine, 18% phosphatidylglycérol, 5% cardiolipine et présence de trace de phosphatidylsérine) à l'exception du lipide A des lipopolysaccharides (**figure C**). Chez *Brucella*, les membranes sont essentiellement constituées de phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), lipide ornithine (OL), cardiolipine (CL) et phosphatidylglycérol (PG) (Bukata *et al*, 2008).

3. Les patatines

3.1. Découverte de la patatine chez les plantes

La dénomination du domaine « patatine-like » provient de son homologie avec la protéine de plante nommée patatine. En 1980, Racusen et Foote ont découvert la protéine la plus abondante des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) qu'ils ont nommée la "patatine". Les patatines font partie d'une famille multigénique de glycoprotéines vacuolaires d'une masse moléculaire d'environ 40 kDa (Rosahl *et al.*, 1987). Chez les plantes, les patatines sont considérées comme des protéines de stockage. Elles constituent une source d'azote, de soufre ou de carbone afin de permettre à la plante de survivre lors de conditions défavorables ou entre les périodes de pousse. Elles peuvent aussi fournir des nutriments pour permettre l'apparition d'une nouvelle plante (bourgeons ou graines) (Shewry *et al.*, 2003). Les patatines semblent être confinées dans des vacuoles de stockage spécialisées où elles sont inactives. Suite à une blessure ou une attaque de pathogènes, elles sont exportées dans le cytosol où elles deviennent actives (Hirschberg *et al.*, 2001).

Vu que la patatine est une protéine que l'on retrouve également dans d'autres espèces végétales de la famille des solanacées (tel que le piment), elle peut être considérée comme une protéine conservée qui pourrait posséder par conséquent une fonction importante dans le développement ou la survie de la plante (Vancanneyt *et al.*, 1989). Bien que les patatines soient principalement connues pour leur fonction de stockage chez la plante, elles possèdent également une activité phospholipase A2.

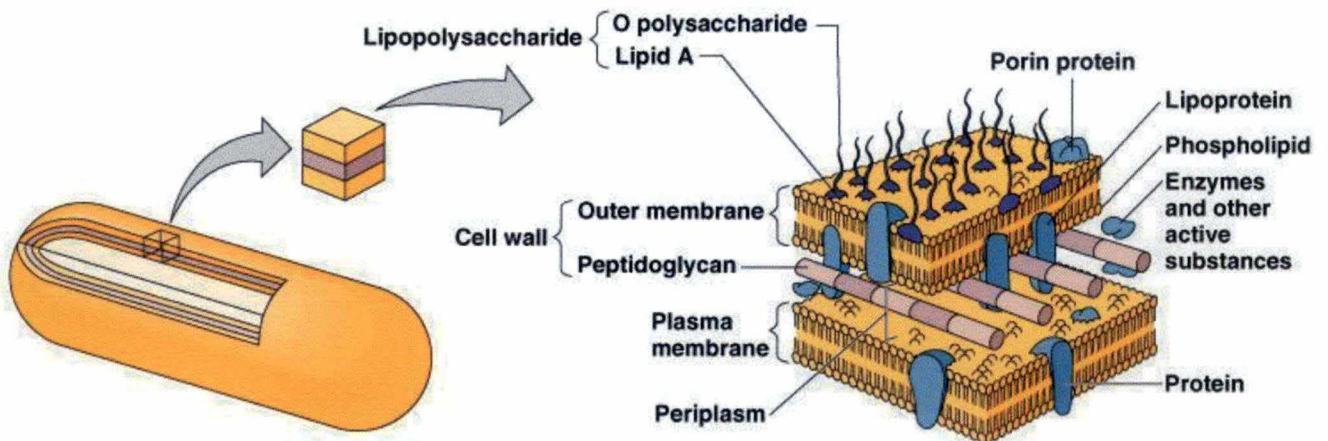
3.2. Les phospholipases

3.2.1. Définition et classification des phospholipases

Les phospholipases sont des estérases qui hydrolysent un ou plusieurs liens esters dans les phospholipides. Elles peuvent avoir un rôle à jouer dans l'induction de changements de la composition membranaire et dans l'activation de la cascade inflammatoire (Istivan *et al.*, 2006 ; Sitkiewicz *et al.*, 2007 ; Lambeau and Gelb, 2008). Elles sont divisées en quatre groupes (A, B, C et D) en fonction de la position du site de clivage sur les phospholipides (**figure 6**) (Istivan *et al.*, 2006).

3.2.2. Les phospholipases A

Les phospholipases A hydrolysent la fonction acide gras au niveau de la fonction alcool primaire (phospholipase A1) ou secondaire (phospholipase A2) du glycérol libérant ainsi un acide gras (acide arachidonique) et un lysophospholipide. La phospholipase A2 a différents rôles à jouer dans : (1) la dégradation des phospholipides, (2) le remodelage des lipides membranaires, (3) la digestion des nutriments, (4) l'activation de la cascade inflammatoire ou encore (5) la défense contre des pathogènes (Istivan *et al.*, 2006 ; Lambeau and Gelb, 2008).



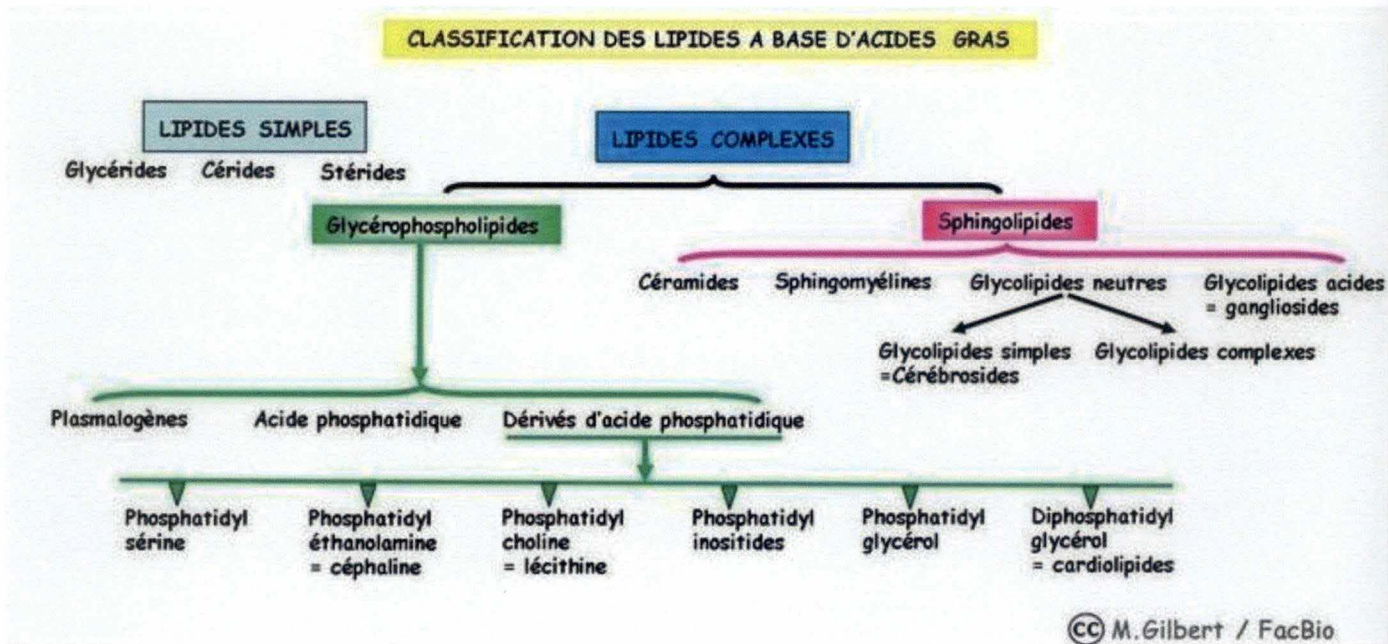
Gram-negative cell wall

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure A : Représentation de la structure de l'enveloppe d'une bactérie Gram négative.

La paroi cellulaire d'une bactérie Gram négative possède une fine couche de peptidoglycane et une membrane externe qui est composée de lipopolysaccharides, de phospholipides et de protéines. L'espace situé entre la membrane plasmique et la membrane externe se nomme le périplasm. Ce dernier contient une grande variété d'enzymes hydrolytiques et de protéines de transport.

Reproduit de : http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/04-13c_bactcellwall_1.jpg



© M. Gilbert / FacBio

Figure B : Organigramme représentant les différentes classifications de lipides.

Reproduit de : <http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/Membrane/FBMA2.htm>

Il existe trois catégories principales de phospholipases A2 : les phospholipases A2 extracellulaires (PLA2s), les phospholipases A2 intracytoplasmiques (PLA2c) et les phospholipases A2 indépendantes du calcium (iPLA2). Ces trois catégories sont, elles-mêmes, subdivisées en 13 groupes différents. Les PLA2s comprennent les PLA2s humaines présentes dans le liquide synovial et le pancréas et les PLA2s animales que l'on retrouve essentiellement dans les venins de serpents ou d'insectes et dans le pancréas du cochon. Les PLA2c sont, quant à elles, spécifiques aux phospholipides porteurs d'acide arachidonique et jouent un rôle dans la biosynthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, leukotriènes et autres) (De Maria *et al.*, 2007).

Les phospholipases A2 sont présentes dans le milieu extracellulaire de nombreuses espèces telles que les champignons (*Cryptococcus neoformans*), les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*), les virus (adénovirus), les parasites eucaryotes (*Toxoplasma gondii*) ou encore l'homme mais aussi dans le venin de certains insectes (abeilles) et serpents (cobra) (Banerji *et al.*, 2008).

3.2.3. Activité phospholipase A2 de la patatine

L'activité phospholipase A2 de la patatine chez les plantes semble être importante pour la dégradation de la membrane cellulaire et de certains métabolites, et avoir une fonction dans la transduction du signal. Via cette activité phospholipase A2, elle peut également agir comme agent de défense contre des parasites de la plante (Andrews *et al.*, 1988 ; Strickland *et al.*, 1995 ; Shewry *et al.*, 2003). Lors de l'hydrolyse de la fonction acide gras au niveau de la fonction alcool secondaire du glycérol chez la plante, une libération d'acide linoléique (à la place d'acide arachidonique chez les mammifères) et de lysophospholipide se produit. Cette libération d'acide linoléique semble être une étape importante dans la production d'éliciteurs endogènes. Ces éliciteurs produits par la plante (phytoalexines) sont des métabolites secondaires dont la biosynthèse est déclenchée par le parasitisme. Les phytoalexines jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux maladies (Senda *et al.*, 1996 ; Hirschberg *et al.*, 2001).

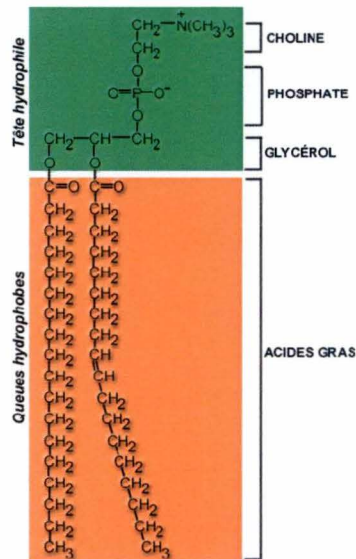


Figure C : Formule chimique d'un phospholipide.

Les phospholipides qui forment les membranes biologiques sont constitués de trois parties : (1) un groupement phosphate lié à un groupe hydrophile (choline, sérine, inositol et éthanolamine), (2) un glycérol et (3) deux acides gras. Ils comprennent une tête hydrophile polaire et deux queues hydrophobes apolaires. Le phospholipide représenté ci-dessus est un phosphatidylcholine.

Reproduit de :

<http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/Images/phosphoglycerolipides.GIF>

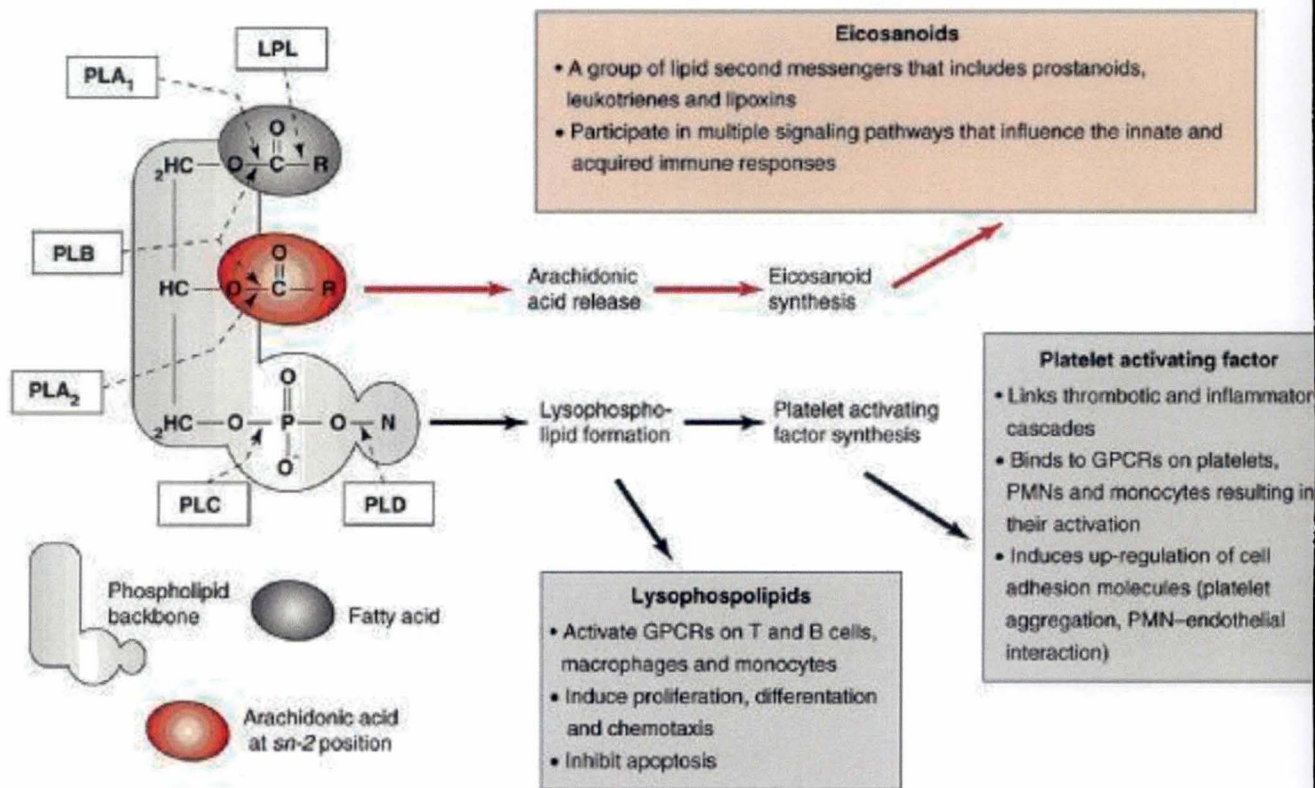


Figure 7 : L'activité phospholipase A2 induit la libération d'acide arachidonique et de la formation de lysophospholipide (Sitkiewicz, 2006).

L'acide arachidonique est un précurseur de la synthèse d'éicosanoïdes tandis que le lysophospholipide induit l'activation de la synthèse des plaquettes.

4. Activité phospholipase dans la relation hôte-pathogène

4.1. Action des phospholipases chez les bactéries

Chez certaines bactéries pathogènes, les phospholipases sont considérées comme des facteurs de virulence parce qu'elles jouent un rôle dans la modification des cellules hôtes, dans la pathogénicité, dans la survie et la dissémination bactérienne (Banerji *et al.*, 2008).

Une phospholipase A2 de *Pseudomonas aeruginosa* permet la dégradation des phospholipides de la membrane des cellules hôtes, ce qui induit une meilleure pénétration et une colonisation plus rapide des bactéries. Par conséquent, ceci provoque une augmentation de la dissémination des bactéries et la sévérité de la maladie (Sitkiewicz *et al.*, 2006).

Mycobacterium tuberculosis présente deux activités de type phospholipase. La libération d'acides gras provoquée par son activité phospholipase A permet de contribuer à la prolifération de la bactérie et de lui fournir une source de carbone (Cotes *et al.*, 2008). L'activité phospholipase C a, quant à elle, un rôle important à jouer dans la pathogénicité de la bactérie. Elle induit une libération de diacylglycérol qui participe à l'activation de précurseurs de la synthèse de triacylglycérol. Cette production de triacylglycérol peut être utilisée par la bactérie comme source de carbone durant sa période de dormance (Srinivas *et al.*, 2008).

4.2. Action des phospholipases chez l'hôte eucaryote

Au niveau cellulaire, l'action de la phospholipase A2 sur les membranes de l'hôte eucaryote permet l'hydrolyse d'un acide gras en position *sn-2* du glycérol du phospholipide. Ce clivage induit la libération d'acide arachidonique et la formation de lysophospholipide qui sont tout deux les précurseurs puissants de médiateurs de la réponse inflammatoire. Ainsi, la libération d'acide arachidonique génère la production d'eicosanoïdes tandis que la formation du lysophospholipide induit la synthèse de facteurs d'activation des plaquettes (PAF, Platelet activating factor synthesis) (**figure 7**) (Sitkiewicz *et al.*, 2007, Istivan *et al.*, 2006).

Le lysophospholipide formé se lie ensuite à des récepteurs couplés aux protéines G situés sur la surface de différents types de cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages ou encore monocytes) (Graler *et al.*, 2002). Cette liaison provoque une prolifération, une différenciation, une chimiotaxie et un réarrangement du cytosquelette (Sitkiewicz *et al.*, 2007). L'induction de la synthèse des plaquettes par les lysophospholipides permet l'activation des monocytes et de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN).

La libération d'acide arachidonique génère la production de médiateurs inflammatoires importants de l'hôte : les eicosanoïdes. Ces molécules sont obtenues suite à l'action sur l'acide arachidonique de la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase. Ceci permet la modulation de l'expression de cytokines et de leurs récepteurs qui influence la réponse immunitaire adaptatrice.

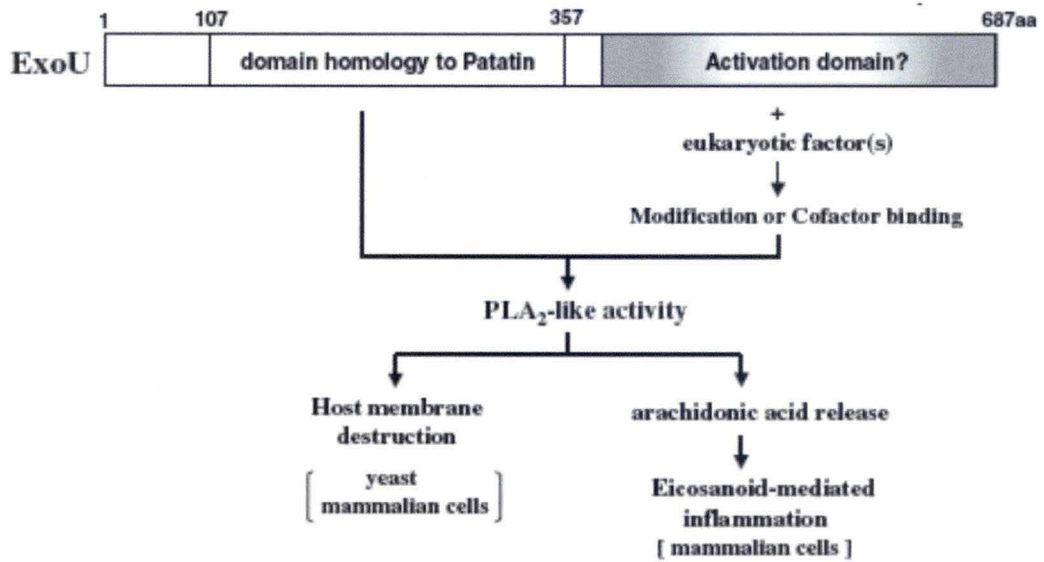


Figure 8 : Modèle de la structure d'ExoU (Sato *et al.*, 2004).

ExoU possède un domaine patatine-like en position N-terminale et semble aussi avoir un domaine d'activation en position C-terminale. Ce domaine d'activation est activé à l'aide de cofacteurs eucaryotiques spécifiques qui agissent en modifiant ExoU ou en se liant à sa partie C-terminale. L'activité phospholipase A2 par le domaine patatine-like provoque une destruction de la membrane de l'hôte (cellules mammifères et levures) ou une libération d'acide arachidonique qui induit une inflammation suite à la production d'eicosanoïdes (cellules mammifères).

5. Deux exemples de bactéries possédant une protéine à domaine patatine-like phospholipase

5.1. *Pseudomonas aeruginosa*

5.1.1. Quatre effecteurs du système de sécrétion de type III

Les études réalisées sur *Pseudomonas aeruginosa* montrent que certaines protéines à domaine patatine-like ont un rôle à jouer dans la virulence. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène Gram négatif extracellulaire souvent rencontré dans les infections nosocomiales. Cette bactérie opportuniste est susceptible de provoquer de graves infections chez des grands brûlés, des patients immunodéprimés, des patients atteints de mucoviscidose ou encore du virus HIV (Phillips *et al.*, 2003).

ExoS, ExoT, ExoY et ExoU sont quatre effecteurs qui ont été identifiés chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ces quatre protéines sont exportées directement dans le cytosol des cellules hôtes mammifères à travers le système de sécrétion de type III. ExoS et ExoT induisent une altération des composants du cytosquelette et possèdent une activité ADP-ribosyl transférase qui perturbe la transduction du signal de l'hôte. ExoY a, quant à elle, été identifiée comme étant une adénylate cyclase qui semble ne contribuer que partiellement à la virulence comparée aux trois autres exoenzymes (Allewelt *et al.*, 2000 ; Finck-Barbançon *et al.*, 2001 ; Phillips *et al.*, 2003).

ExoU est une protéine qui contient un domaine patatine-like phospholipase. Cette protéine effectrice du système de sécrétion de type III contribue à l'accélération de la sévérité de la maladie et à l'augmentation de la réaction inflammatoire. ExoU est considérée comme un facteur de virulence qui induit une toxicité en cellules mammifères et en levures et qui provoque un choc septique chez le lapin (Sitkiewicz *et al.*, 2006). Cette toxine possède une activité transférase, estérase et lipide hydrolase et a besoin de cofacteur pour déclencher son activité *in vivo* et *in vitro* (Sato *et al.*, 2004). Dans les modèles murins, la présence d'ExoU est corrélée au développement d'infections pulmonaires aiguës, de septicémie, de dissémination et persistance bactérienne (Sitkiewicz *et al.*, 2006).

5.1.2. Toxicité d'ExoU en cellules mammifères

La transfection d'ExoU dans les cellules mammifères induit des dégâts irréversibles de la membrane cellulaire et une mort rapide de type nécrotique (Finck-Barbançon *et al.*, 2001). Cet effet cytotoxique s'observe dans de nombreuses lignées cellulaires tels les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Rabin *et al.*, 2005). Etant donné que l'expression d'ExoU n'est pas détectable en Western Blot et que la mort cellulaire peut être observée avec de petites quantités d'ADN endéans 3 H post-transfection, il semble que cette toxine soit très puissante et à action rapide. Des études sur la structure et l'activité fonctionnelle d'ExoU ont montré qu'elle possède un domaine patatine-like et un domaine d'activation de l'activité phospholipase A2 du domaine patatine-like (**figure 8**). Le domaine d'activation semble avoir besoin de cofacteurs eucaryotes spécifiques permettant la

modification d'ExoU ou la liaison de ces cofacteurs sur le domaine C-terminal afin de déclencher l'activation de l'enzyme (Sato *et al.*, 2004). L'activité phospholipase A2 d'ExoU induit donc des dommages irréversibles de la bicouche lipidique des cellules mammifères et des levures et provoque aussi le déclenchement de l'inflammation durant l'infection via la libération de l'acide arachidonique. Ainsi, l'équipe d'Allewelt a montré que les dégâts provoqués par ExoU sur les cellules épithéliales du poumon contribuent à la libération de médiateurs inflammatoires à l'intérieur du système circulatoire induisant ainsi un choc septique et une augmentation de l'inflammation. De plus, étant donné qu'un mutant de délétion ExoU empêche le développement d'une inflammation systémique et d'un choc septique, cela signifie qu'ExoU semble être un facteur de virulence important de *Pseudomonas aeruginosa* (Allewelt *et al.*, 2000).

5.1.3. Toxicité d'ExoU en levure

Il est intéressant d'explorer l'action d'ExoU dans un autre organisme que l'humain, tel que la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Premièrement, car cela permet de travailler avec un système de promoteur régulable qui permet de produire et d'étudier le mécanisme d'action d'une protéine toxique. Deuxièmement, parce que la levure est un organisme modèle facile à utiliser, pour lequel beaucoup de mutants sont disponibles, et qui est beaucoup étudié dans le monde scientifique notamment pour la recherche d'effecteurs (Valvidia, 2004 ; Siggers and Lesser, 2008).

Les expériences réalisées par Sato ont montré que l'expression d'ExoU dans *Saccharomyces cerevisiae* induit une cytotoxicité drastique. En effet, la cytotoxicité est détectable 30 minutes après l'induction d'*exoU*. L'utilisation d'un marqueur de la membrane vacuolaire a permis de dévoiler qu'ExoU provoque un phénotype de fragmentation vacuolaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sato *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2003).

5.2. Legionella pneumophila

Un autre exemple de bactérie pathogène qui possède une protéine à domaine patatine-like est *Legionella pneumophila*. Cette bactérie intracellulaire à Gram négatif est à l'origine d'infections pulmonaires graves, communément appelées maladie du légionnaire ou légionellose. L'infection par *Legionella* se réalise en général via l'inhalation d'aérosols contaminés. La bactérie envahit alors les poumons et se dirige vers les macrophages vacuolaires afin de s'y répliquer. Elle réside dans une LCV (*Legionella*-containing vacuole) pour échapper à la dégradation du lysosome (Fields, 1996 ; Vogel *et al.*, 1999). L'inhibition de la maturation du phagosome et la modulation du trafic vésiculaire de l'hôte par *Legionella* se réalise suite à l'export d'effecteurs via le système de sécrétion Dot/Icm (type IV) (Cianciotto, 2001 ; Vogel *et al.*, 1998 ; Segal *et al.*, 1998). Parmi eux, trois effecteurs nommés VipA (Vacuole protein sorting inhibitor protein A), PatA/VipD et VipF ont été identifiés. VipA est prédite comme une protéine possédant une région coiled-coil impliquée dans des interactions protéiques avec des protéines similaires de l'hôte, PatA/VipD comme possédant un domaine patatine-like phospholipase semblable à celui d'ExoU et VipF comme pourvu d'un domaine acétyltransférase (Shohdy *et al.*, 2005).

Chez *Legionella pneumophila*, le domaine patatine-like protéine se retrouve chez 11 protéines : PatA/VipD, PatB, PatC/VpdA, PatD, PatE, PatF/VpdC, PatG/VpdB, PatH, PatJ et PatK (**figure 9**). Seules PatA/VipD, PatC/VpdA et PatG/VpdB sont exportées vers la cellule hôte via le système de sécrétion Dot/Icm (Banerji *et al.*, 2007). L'équipe de Vanrheenen a testé l'éventuelle toxicité de VipD en cellules mammifères et en levure. Il en ressort que l'expression de VipD est relativement bien tolérée en cellules et en levure. La surexpression de VipD en levure induit un léger retard de croissance mais pas un arrêt. Il est donc possible que VipD et ExoU n'aient pas la même fonction ou que l'activité phospholipase de VipD soit beaucoup plus faible que celle d'ExoU dans les conditions testées (Vanrheenen *et al.*, 2006).

Objectifs du mémoire

Objectifs du mémoire

Brucella est une bactérie pathogène à Gram négatif qui possède trois protéines à domaine patatine-like que nous avons nommées PatA, PatB et PatC. Dans le cadre de la recherche d'effecteurs, il a récemment été montré que la virulence du mutant de délétion *patA* de *Brucella melitensis* 16M comparé à la souche sauvage diminue en souris après quatre semaines d'infection (résultat non publié, Alexandre Jamet, URBM Namur). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le domaine patatine-like chez *Brucella* pourrait avoir un rôle tardif à jouer dans le processus de virulence. L'intérêt de l'étude des protéines à domaine patatine-like vient du fait que chez des bactéries pathogènes à Gram négatif, on le retrouve dans des protéines effectrices caractérisées comme facteurs de virulence. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* possède un effecteur de type III, ExoU qui est considéré comme un facteur de virulence, possédant un domaine patatine-like responsable d'une activité phospholipase. Cette activité induit une toxicité dramatique en cellules mammifères et une fragmentation vacuolaire en levure. Dès lors, il est possible que les patatine-like protéines de *Brucella* possèdent, elles aussi, une activité toxique en cellules mammifères et en levure.

Les objectifs de ce mémoire consistent, après avoir vérifié la présence des protéines à domaine patatine-like encodés dans le génome de *Brucella*, (1) à caractériser le rôle de PatA, PatB et PatC dans la virulence de *Brucella* en utilisant des modèles d'infection, (2) à déterminer si ces protéines possèdent ou non une fonction de stockage, (3) à caractériser l'activité phospholipase supposée de PatA et également (4) à tester la cytotoxicité de PatA, PatB et PatC en cellules mammifères et en levure.

Afin de tenter de répondre à ces questions, (1) nous construirons des mutants de délétion *patA*, *patB* and *patC* de *Brucella* dans le but de tester ces différents mutants dans des modèles d'infection cellulaires et murins. (2) La survie et la croissance de ces mutants $\Delta patA$, $\Delta patB$ ou $\Delta patC$ de *Brucella* seront évaluées sur des milieux définis et dans différentes conditions. (3) Une surproduction et une purification de PatA et PatAt (un variant de la protéine qui ne contient que le domaine patatine-like) vont être réalisées afin de tester leur activité enzymatique *in vitro*. (4) La toxicité éventuelle de PatA, PatB et PatC sera testée en cellules mammifères et en levure.

Résultats

Résultats

1. Analyses bioinformatiques

Comme nous l'avons vu précédemment, comparé à la souche sauvage, la virulence du mutant de délétion du gène BMEII1035 de *Brucella melitensis* 16M montre une diminution en souris quatre semaines post-infection (résultat non publié, A. Jamet, URBM Namur). Suite à la réalisation d'un BLAST, nous avons découvert que ce gène possède une homologie de séquence avec un domaine patatine. Après avoir effectué des recherches sur ce domaine dans la littérature, nous avons découvert que la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* possède une protéine effectrice, ExoU, qui contient aussi un domaine patatine-like. Un crible bioinformatique a été réalisé afin d'identifier d'éventuelles autres protéines de *Brucella* prédites comme possédant un domaine patatine-like. Suite à ces recherches d'homologies de domaines avec le génome de *Brucella melitensis* 16M, trois protéines patatine-like ont été identifiées chez *Brucella*. Nous les avons nommées PatA (codée par la séquence BMEII1035), PatB (codée par la séquence BMEI0401) et PatC (codée par la séquence BMEI0908) (**figure 10**). Il serait intéressant d'étudier la ou les fonction(s) possible(s) que pourraient avoir ces trois patatine-like protéines chez une bactérie pathogène telle que *Brucella*.

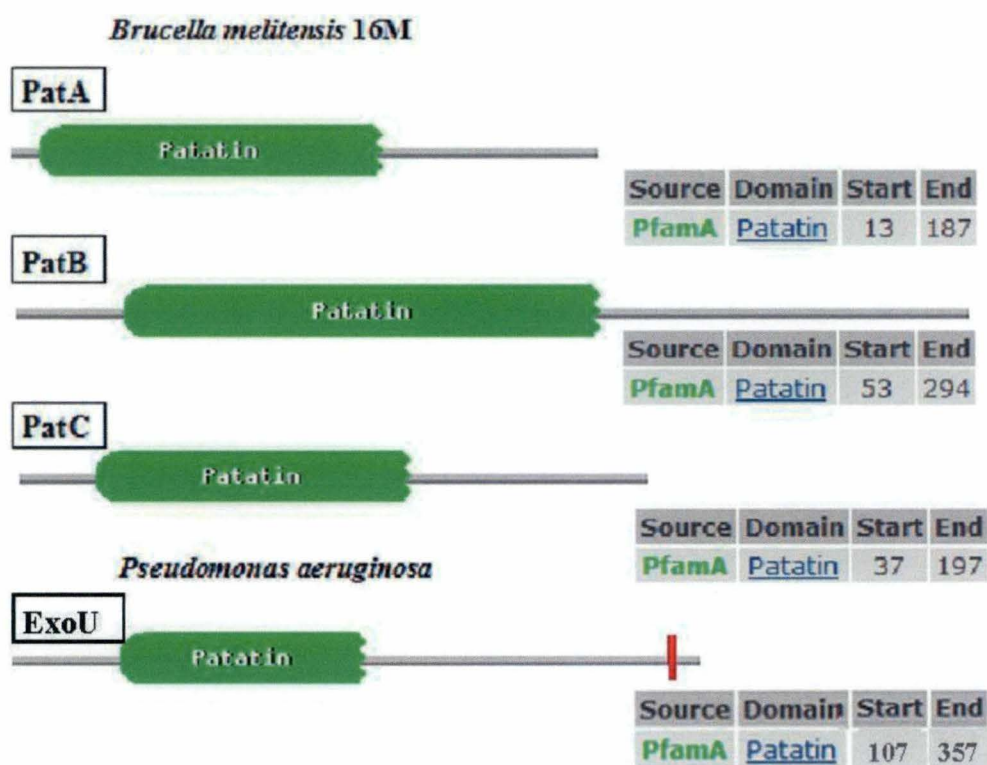


Figure 10 : Représentation schématique des domaines patatine-like de PatA, PatB et PatC de *Brucella melitensis* 16M et du domaine patatine-like d'ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces modèles ont été obtenus suite à une recherche de domaines patatine-like dans la base de données de PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)

2. Construction des mutants de délétion de *patA*, *patB* et *patC*

Un des objectifs de ce mémoire consiste à caractériser le rôle de PatA, PatB et PatC dans la virulence de *Brucella* en utilisant des modèles d'infection. Une des manières d'évaluer l'importance d'une protéine dans un processus donné est d'utiliser l'approche génétique qui consiste à déléter le gène correspondant. Une comparaison de la souche sauvage avec la souche mutée est ensuite réalisée. L'hypothèse est qu'un phénotype différent pourra être attribué à la mutation, et on pourra considérer que la protéine d'intérêt joue un rôle dans le processus en question. Nous avons donc entrepris de construire des mutants de délétion pour les gènes *patA*, *patB* et *patC*.

Une fois la construction de ces mutants réalisée, nous pourrions infecter des cellules HeLa (lignée cellulaire fréquemment utilisée comme modèle d'infection par *Brucella*) afin de déterminer si ces protéines qui possèdent un domaine patatine-like ont un rôle à jouer dans la virulence en cellules mammifères. Nous pourrions également tester si les protéines patatine-like de *Brucella* ont ou non une fonction de stockage. En effet, étant donné que comparée à la souche sauvage, la virulence du mutant de délétion *patA* diminue en souris 4 semaines post-infection, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un éventuel rôle de stockage d'acides aminés de PatA. Pour examiner cette hypothèse, nous avons réalisé un test de croissance sur milieux définis et dans différentes conditions afin de pouvoir comparer la souche sauvage à la souche mutée $\Delta patA$.

2.1. Stratégie utilisée pour obtenir les mutants de délétion

Pour construire les mutants, nous avons utilisé une stratégie de remplacement allélique se basant sur la sélection de deux événements successifs de recombinaisons homologues afin de remplacer le gène sauvage (*pat*² de *Brucella melitensis* 16M) par l'allèle délété du gène Δpat (qui porte la séquence nécessaire à l'échange allélique par recombinaison). Ce gène Δpat est porté par un plasmide non répliquatif chez *Brucella*, nommé pJQ200.

Afin de disposer du plasmide pJQ200 Δpat exprimé dans une souche de *Brucella*, nous avons réalisé une conjugaison entre une souche d'*E. coli* qui contient le plasmide pJQ200 Δpat et la souche NaI^R de *Brucella melitensis* 16M (souche bactérienne résistante à l'acide nalidixique). Nous avons ensuite sélectionné les bactéries résistantes à la gentamycine et à l'acide nalidixique. En effet, puisque pJQ200 Δpat est non répliquatif, le premier événement de recombinaison (intégration du plasmide) permet d'acquérir le gène de résistance à la gentamycine alors que la sélection du plasmide pJQ200 Δpat dans la souche de *Brucella* s'effectue à l'aide de l'acide nalidixique. Les clones résistants obtenus ont été mis dans un milieu riche (2YT) pendant 24 h à 37°C puis dilués en culture liquide avec un facteur de dilution 10x. Ensuite, les bactéries sont à nouveau cultivées en culture 2YT liquide pendant 24 h à 37°C et ce procédé est répété deux fois. Ces étapes de dilution et l'absence d'antibiotique permettent d'augmenter le temps pendant lequel la bactérie se réplique et donc par conséquent d'accroître les chances d'apparition du deuxième événement de recombinaison. Les bactéries sont alors striées sur boîtes sucrose 5% afin de sélectionner la perte de *sacB*. En effet, lorsque le gène *sacB* est présent sur milieu sucrose, il est toxique (c'est donc un marqueur de contre-sélection). Deux possibilités existent alors : (1) soit la

² Dans la suite de ce mémoire, nous considérons le terme « *pat* » comme faisant référence aux gènes *patA*, *patB* et *patC*.

deuxième recombinaison se produit dans la même partie (amont ou aval) que la première signifiant ainsi un retour au génotype sauvage ; (2) soit le deuxième évènement de recombinaison se produit dans la deuxième partie et permet par conséquent d'obtenir le mutant Δpat suite au remplacement allélique (**figure 11**).

Les bactéries sélectionnées sont donc au final sensibles à la gentamycine et résistantes au sucrose. Il est préférable de toujours vérifier la sensibilité à la gentamycine en plus de la résistance au sucrose parce que les mutations dans le gène *sacB* sont fréquentes. Afin de discriminer les souches de *Brucella melitensis* 16M sauvages des mutants Δpat , nous avons réalisé une PCR sur colonies avec des primers qui s'hybrident en amont et en aval de la région de recombinaison attendue. Ainsi, la discrimination entre la souche sauvage et la souche mutée se réalise en fonction de la taille du produit PCR obtenue après migration sur un gel d'agarose. En effet, le gène muté étant délété, il possède une taille plus petite et donc migre plus vite que le gène sauvage.

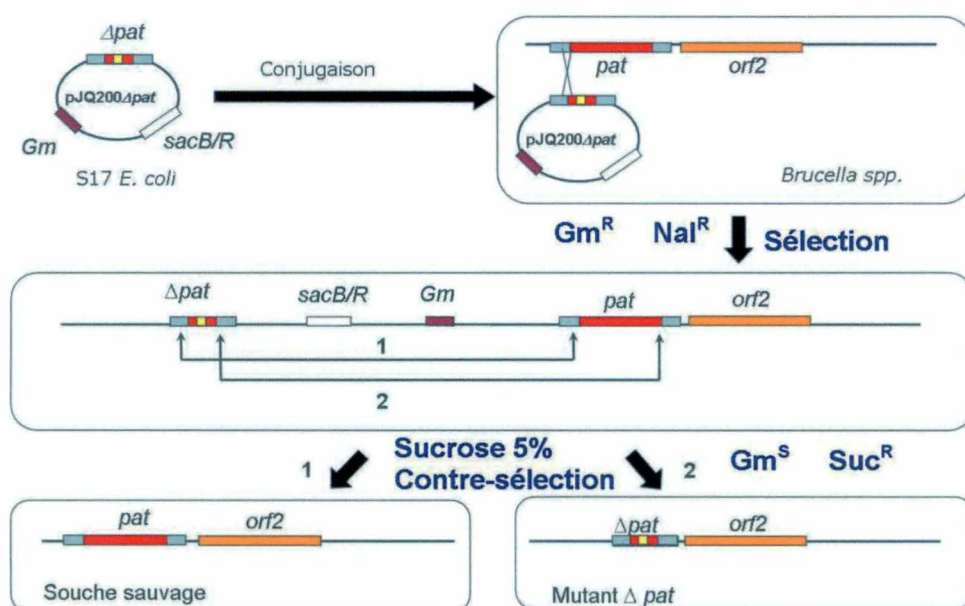


Figure 11 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour l'obtention de mutants par remplacement allélique.

Après la conjugaison entre la souche S17 d'*E. coli* contenant le plasmide pJQ200 Δpat et la souche sauvage de *Brucella*, les bactéries résistantes à la gentamycine (Gm) et à l'acide nalidixique (Nal) sont sélectionnées. L'intégration du plasmide d'intérêt a donc été sélectionnée en présence de gentamycine alors que la discrimination entre les souches de *Brucella* et d'*E. coli* s'est faite à l'aide de l'acide nalidixique. Les bactéries sont ensuite mises en culture liquide dans un milieu riche (2YT) afin de favoriser le deuxième évènement de recombinaison. Puis les bactéries sont déposées sur des boîtes sucrose 5% pour sélectionner la perte de *sacB*. Les colonies sélectionnées sont donc au final gentamycine sensibles et sucrose résistantes. Afin de discriminer la souche sauvage de la souche mutée, une PCR sur colonies a été réalisée. En effet, la sélection de la souche mutée se base sur la taille du produit PCR obtenu sur gel d'agarose, le gène muté est plus petit que le gène sauvage.

2.2. Construction des mutants $\Delta patA$, $\Delta patB$ et $\Delta patC$

Le mutant de délétion *patA* a déjà été réalisé au laboratoire suite à l'utilisation de la stratégie par remplacement allélique que nous venons d'expliquer. La discrimination entre la souche mutée et sauvage s'est réalisée par PCR sur colonies. En effet, la taille attendue du produit PCR pour les bactéries possédant le génotype sauvage (*patA* de *Brucella melitensis* 16M) est de 2400 pb alors que la taille attendue pour les bactéries possédant le génotype muté $\Delta patA$ est de 1566 pb (résultat non publié, A. Jamet, URBM Namur).

Nous avons aussi utilisé la méthode de remplacement allélique qui a déjà permis la construction du mutant de délétion *patA* pour construire les mutants $\Delta patB$ et $\Delta patC$. Contrairement au mutant $\Delta patA$, les plasmides pJQ200, portant la séquence nécessaire à l'échange allélique par recombinaison, ne sont pas encore disponibles. Une partie de ce mémoire a donc été consacré à la construction de ceux-ci. Pour obtenir les plasmides pJQ200 $\Delta patB$ et pJQ200 $\Delta patC$, trois PCR doivent être effectuées (**figure 12**). La méthode de construction étant la même pour ces deux mutants, prenons pour exemple la construction du plasmide pJQ200 $\Delta patB$. Pour cela, une première PCR avec les amorces *patB-A* et *patB-B* a été réalisée. L'amorce *patB-A* s'hybride en amont de *patB* et l'amorce *patB-B* s'hybride au début de la séquence codante du gène *patB*. En parallèle, une deuxième PCR avec les amorces *patB-C* et *patB-D* a été effectuée. L'amorce *patB-C* s'hybride à la fin de la séquence codante du gène *patB* et l'amorce *patB-D* s'hybride en aval de *patB*. Il convient de préciser que les portions 5' des amorces *patB-B* et *patB-C* sont complémentaires.

Afin de vérifier si les deux produits PCR ont la taille attendue, une électrophorèse en gel d'agarose a été effectuée. Sur la **figure 13 A**, nous pouvons remarquer que les produits PCR *patB* AB et *patB* CD présentent le profil attendu qui correspond à deux bandes de 826 pb et 716 pb respectivement. La **figure 13 C** indique que les profils obtenus correspondent effectivement aux profils attendus pour *patC* AB et *patC* CD à savoir des bandes de 820 pb et 822 pb respectivement.

Pour obtenir la construction finale du mutant $\Delta patB$ et $\Delta patC$, une dernière PCR doit être effectuée avec les amorces *patB-A* et *patB-D* (ou *patC-A* et *patC-D*) en utilisant comme matrice les deux premiers produits PCR. Nous pouvons remarquer que les produits PCR *patB-AD* et *patC-AD* migrent tous les deux aux tailles attendues de 1500 pb (**figure 13 B**) et 1600 pb (**figure 13 C**) respectivement. Ces produits PCR ont ensuite été purifiés.

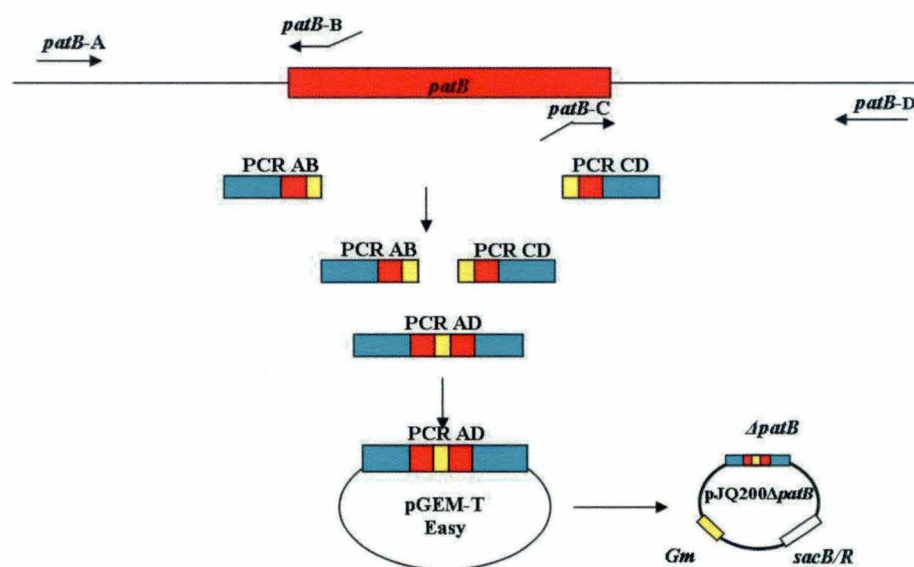


Figure 12 : Stratégie utilisée pour la construction du vecteur pJQ200 $\Delta patB$.

Une première PCR avec les amorces *patB-A* et *patB-B* et, en parallèle, une deuxième PCR avec les amorces *patB-C* et *patB-D* ont été réalisées. Les amorces *patB-B* et *patB-C* possèdent une séquence 5' complémentaire l'une à l'autre (en jaune sur le schéma). Afin d'obtenir la construction plasmidique finale du mutant $\Delta patB$, une dernière PCR a été faite avec les amorces *patB-A* et *patB-D* en utilisant comme matrice les deux premiers produits PCR. Le produit PCR obtenu sera ensuite ligé dans un vecteur de clonage intermédiaire (pGEM-T Easy) puis dans le vecteur suicide pJQ200.

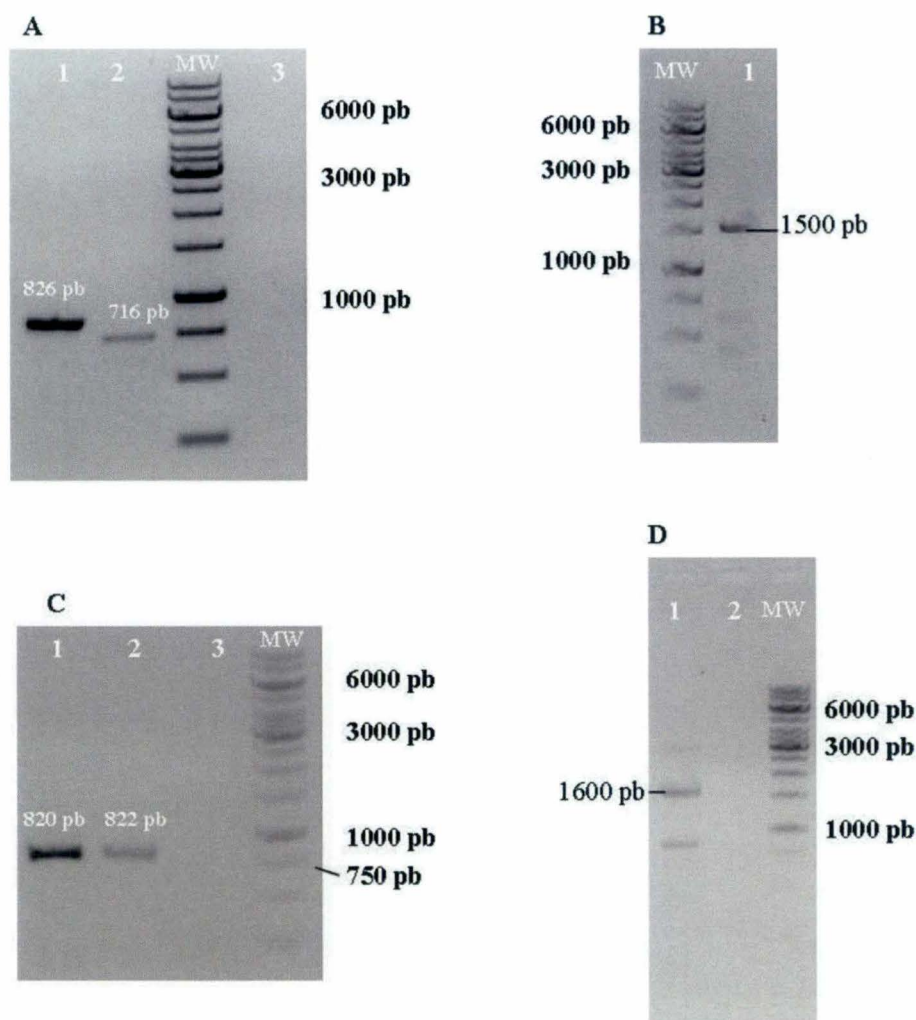


Figure 13 : Profils de migration d'un gel d'agarose 1% montrant la présence des produits PCR *patB* AB, *patB* CD, *patB* AD, *patC* AB, *patC* CD et *patC* AD.

A. Piste 1 : le produit PCR *patB* AB, piste 2 : le produit PCR *patB* CD, piste 3 : contrôle négatif (PCR sans matrice). Les tailles attendues sont indiquées à proximité de chaque bande. **B.** Piste 1 : le produit PCR *patB* AD. La taille attendue est indiquée à côté de la bande encadrée. **C.** Piste 1 : le produit PCR *patC* AB, Piste 2 : le produit PCR *patC* CD, piste 3 : contrôle négatif (PCR sans matrice). Les tailles attendues sont indiquées à proximité de chaque bande. **D.** Piste 1 : le produit PCR *patC* AD et piste 2 : contrôle négatif de la PCR. La taille attendue est indiquée à côté de la bande encadrée. Les tailles attendues sont indiquées à proximité de chaque bande. L'abréviation **MW** utilisée au cours de ce mémoire correspond au marqueur de poids moléculaire (Molecular Weight).

Ces produits PCR *patB*-AD et *patC*-AD purifiés sont ensuite clonés dans le vecteur de clonage pGEM-T Easy. Sur la **figure 14 A**, nous pouvons remarquer que le produit de ligation pGEM-T Easy $\Delta patB$ restreint par *EcoRI* présente le profil attendu qui correspond à 3 bandes de 2997 pb, 846 pb et 730 pb (clone 1). Sur la **figure 14 B**, nous pouvons observer que le produit de ligation pGEM-T Easy $\Delta patC$ restreint par *EcoRI* présente le profil attendu qui correspond à 3 bandes de 3015 pb, 822 pb et 820 pb.

La dernière étape de la construction des plasmides implique la ligation des inserts $\Delta patB$ ou $\Delta patC$ dans le pJQ200 qui est un vecteur suicide chez *Brucella*. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas encore des clones pJQ200 $\Delta patB$ et pJQ200 $\Delta patC$.

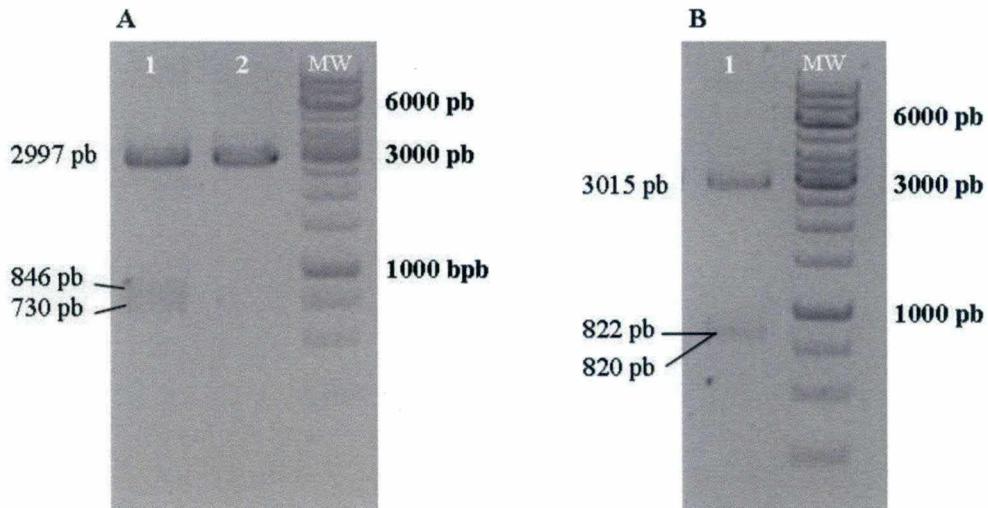


Figure 14 : Profils de migration des produits de la restriction par *EcoRI* de la construction pGEM-T Easy $\Delta patB$ et pGEM-T Easy $\Delta patC$ dans un gel d'agarose 1%.

A. Produit de ligation pGEM-T Easy $\Delta patB$ clivé par *EcoRI*. B. Produit de ligation pGEM-T Easy $\Delta patC$ clivé par *EcoRI*. Les tailles attendues sont indiquées à côté des photos face aux bandes correspondantes.

2.3. Infection de cellules HeLa par *Brucella melitensis* $\Delta patA$

Etant donné que nous avons à notre disposition le mutant de délétion *Brucella melitensis* $\Delta patA$, nous avons infecté des cellules HeLa avec la souche de *Brucella melitensis* 16M sauvage et avec la souche de *Brucella melitensis* $\Delta patA$, afin de déterminer si PatA a un rôle à jouer dans la virulence en cellules mammifères. Pour cela, des cellules HeLa ont été mises en culture dans une plaque 24 puits. Après avoir été préalablement mis en préculture (2YT), la souche sauvage (*Brucella melitensis* 16M) et la souche mutée (*Brucella melitensis* $\Delta patA$) sont mises en contact avec les cellules HeLa. Après avoir déposé les bactéries sur les cellules, la plaque multi-puits est centrifugée afin de permettre aux bactéries d'adhérer aux cellules et ainsi de permettre la synchronisation. Puis, les cellules sont traitées avec de la gentamycine dans le but de tuer les bactéries extracellulaires. Les cellules sont ensuite lysées avec du Triton X100 (détergent) à différents temps post-infection (2 h, 24 h et 48 h) et déposées sur boîtes 2YT (milieu riche) afin de pouvoir compter le nombre de bactéries intracellulaires viables.

Sur le graphique (**figure 15**), nous pouvons observer que le nombre de CFU/puits pour le mutant est plus important de manière hautement significative par rapport au sauvage (Test de Student, $P < 0,01$). Les bactéries mutées $\Delta patA$ semblent se répliquer plus rapidement que les bactéries non mutées. Cette différence entre le mutant et le sauvage sera discutée plus loin dans ce mémoire.

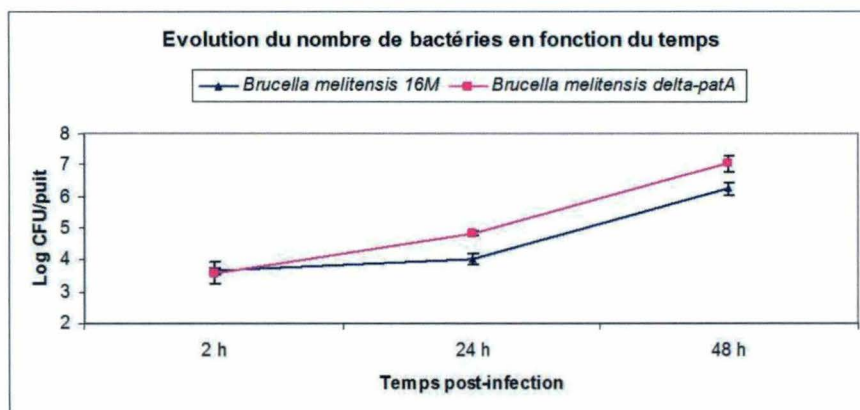


Figure 15 : Evolution du nombre de bactéries vivantes intracellulaires sauvages ou dont le gène *patA* a été délété, en fonction du temps lors d'une infection de cellules HeLa. Les résultats sont exprimés en logarithme du nombre de *Brucella melitensis* intracellulaires vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de triplicats et l'écart-type de ces trois valeurs est indiqué sur le graphe. Le temps post-infection de *Brucella melitensis* sauvage ou muté $\Delta patA$ est de 2 h, 24 h et 48 h.

2.4. Test de l'éventuelle fonction de stockage de PatA

Chez *Solanum tuberosum*, les patatines sont considérées comme des protéines jouant un rôle de stockage en constituant une source d'azote, de soufre ou de carbone qui permettent à la plante de survivre lors de conditions défavorables ou entre les périodes de pousse (Rosahl *et al.*, 1987). Afin de déterminer si PatA peut être considérée comme une protéine de stockage chez *Brucella*, nous avons réalisé un test de croissance du mutant de délétion *patA* et de la souche de *Brucella melitensis* sauvage sur milieu défini avec différentes concentrations d'azote et de carbone. Un rôle de stockage de PatA chez *Brucella* se traduirait par une reprise, après la phase stationnaire, de la croissance de la souche sauvage par rapport à la souche mutée $\Delta patA$.

Pour cela, nous avons utilisé un spectrophotomètre bioscreen (Bioscreen C, OM Growth Cuves AB ltd). Cet appareil permet de mesurer des valeurs de densité optique à différents temps de manière automatisée dans des conditions de température et d'agitation contrôlées. La mesure de l'absorbance se fait toutes les 15 minutes. Les cultures ont été réalisées dans le milieu défini. La source de carbone utilisée est soit de l'érythritol (polyol qui rentre au niveau de la voie des trioses phosphates dans le cycle de la glycolyse) soit le glutamate (acide aminé précurseur de l'alpha-cétoglutarate qui est un métabolite du cycle de Krebs) et la source d'azote provient du sulfate d'ammonium.

Les résultats obtenus (**figure 16 et 17**) indiquent qu'il n'y a pas de différence importante entre les différentes conditions testées quelle que soit la source de carbone. Par conséquent, dans ces conditions, PatA ne semble pas posséder une fonction de stockage étant donné qu'aucune reprise tardive de la croissance de la souche mutée comparée à la souche sauvage n'est observée.

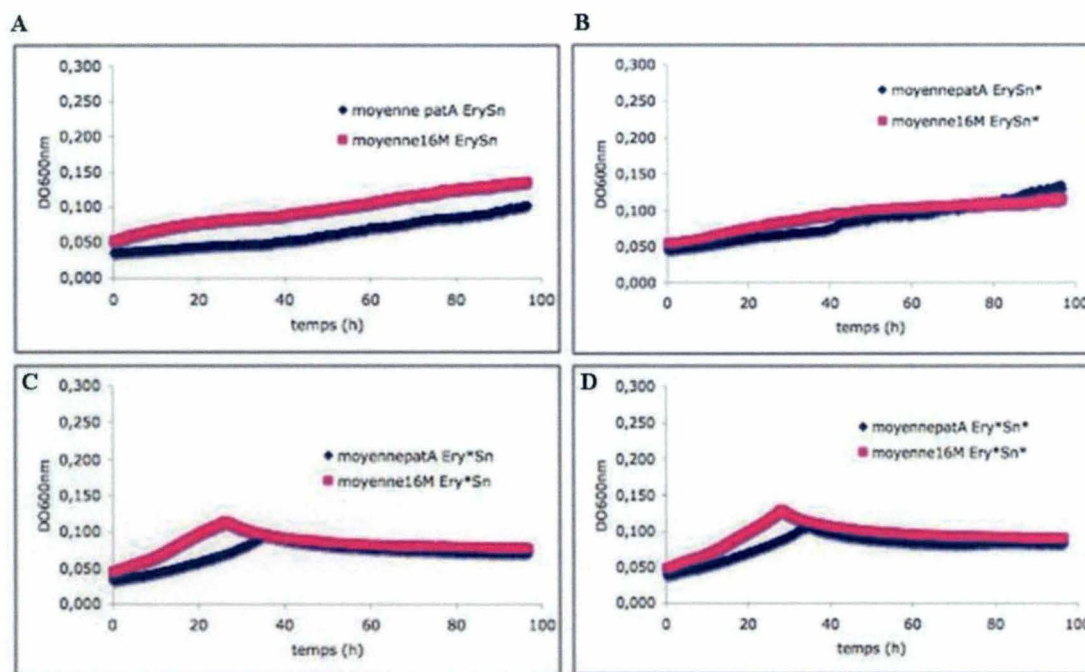


Figure 16 : Courbes de croissance de la souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M (rose) et de la souche mutée $\Delta patA$ (bleu) dans un milieu défini.
 Le milieu défini est complété par une source de carbone, l'érythritol et une source d'azote à différentes concentrations : (A) érythritol 2 g/L, sulfate d'ammonium 0,5 g/L, (B) érythritol 2 g/L, sulfate d'ammonium 0,1 g/L, (C) érythritol 0,5 g/L, sulfate d'ammonium 0,5 g/L, (D) érythritol 0,5 g/L, sulfate d'ammonium 0,1 g/L.

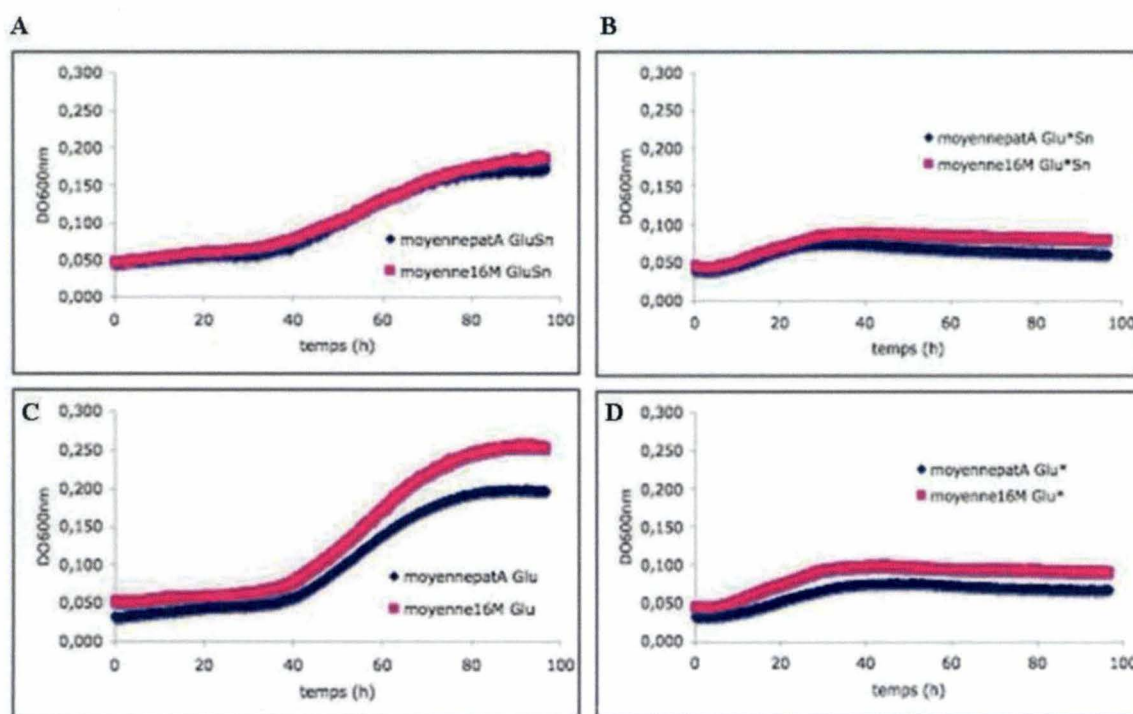


Figure 17 : Courbes de croissance de la souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M (rose) et de la souche mutée $\Delta patA$ (bleu) dans un milieu défini.
 Le milieu défini est complété par une autre source de carbone, le glutamate et par une source d'azote à différentes concentrations : (A) glutamate 2 g/L, sulfate d'ammonium 0,5 g/L, (B) glutamate 0,5 g/L, sulfate d'ammonium 0,5 g/L, (C) glutamate 2 g/L, (D) glutamate 0,5 g/L.

3. Construction des vecteurs d'expression pour la surproduction et la purification de PatA et PatAt

Dans le but de caractériser l'activité phospholipase supposée de PatA, des tests d'activité enzymatique seront réalisés pour PatA et PatAt (un variant de la protéine qui ne contient que le domaine patatine-like protéine). Ces tests enzymatiques seront effectués dans un laboratoire qui est spécialisé dans l'étude de l'activité phospholipase A2 (Edgardo Moreno, Costa Rica). Pour cela, nous devons construire des vecteurs d'expression pour PatA et PatAt afin de pouvoir surproduire et purifier ces deux protéines.

La séquence prédite de PatA chez *Brucella* comprend deux domaines : un domaine putatif patatine-like et un domaine sans fonction prédite. Une variante tronquée de la protéine PatA (PatAt) a été construite afin de déterminer si l'activité phospholipase est uniquement due au domaine patatine-like. Dans ce mémoire, PatAt correspond aux 199 premiers acides aminés de PatA c'est-à-dire qu'elle contient uniquement le domaine patatine-like.

Afin d'amplifier *patA*, une PCR avec les amorces *patA-5'* et *patA-3'* a été réalisée (les séquences sont disponibles dans la partie « Matériels et méthodes »). L'amorce *patA-5'* s'hybride au début de la séquence codante de *patA* et l'amorce *patA-3'* s'hybride à la fin de la séquence codante de *patA*. La séquence codante *patAt* a été obtenue en faisant une PCR avec les amorces *patA-5'* et *patAt-3'*. L'amorce *patAt-3'* s'hybride en aval de la séquence codante pour le domaine putatif patatine-like. L'étape suivante consiste à intégrer *patA* ou *patAt* dans un vecteur de surexpression tel que pET16b afin de surproduire la protéine PatA ou PatAt. Deux étapes intermédiaires sont requises pour faire ces constructions.

Premièrement, la séquence codante amplifiée de *patA* ou *patAt* est liguée dans le vecteur de clonage pGEM-T Easy puis une restriction par *EcoRI* est effectuée afin de vérifier la construction. Sur la **figure 18 A**, le profil de migration des clones 1 et 2 montre deux bandes qui représentent le vecteur pGEM-T Easy (taille attendue 3015 pb) et l'insert *patA* (taille attendue 895 pb). Sur la **figure 18 B**, le profil de migration des clones 1 et 3 montre une bande correspondant à la taille attendue de *patA* (616 pb). Après séquençage, il s'avère que la séquence de ces clones ne possède pas de mutation.

La deuxième étape consiste à liguer *patA* et *patAt* dans le pSK-oriT-kan (second vecteur intermédiaire) afin de faciliter le clonage. Une restriction par *BamHI* est réalisée afin de vérifier ces constructions (**figure 18 C**). Sur la partie gauche de cette figure, le profil de migration du clone 5 montre deux bandes qui représentent pSK-oriT-kan (taille attendue 4134 pb) et *patAt* (taille attendue 641 pb). Sur la partie droite de cette figure, le clone 3 montre le profil de migration attendu avec un fragment correspondant à 920 pb (*patA*). La dernière étape consistera à cloner la séquence codante *patA* ou *patAt* dans le vecteur de surexpression pET16b, elle n'a pas pu être réalisée lors de ce mémoire faute de temps.

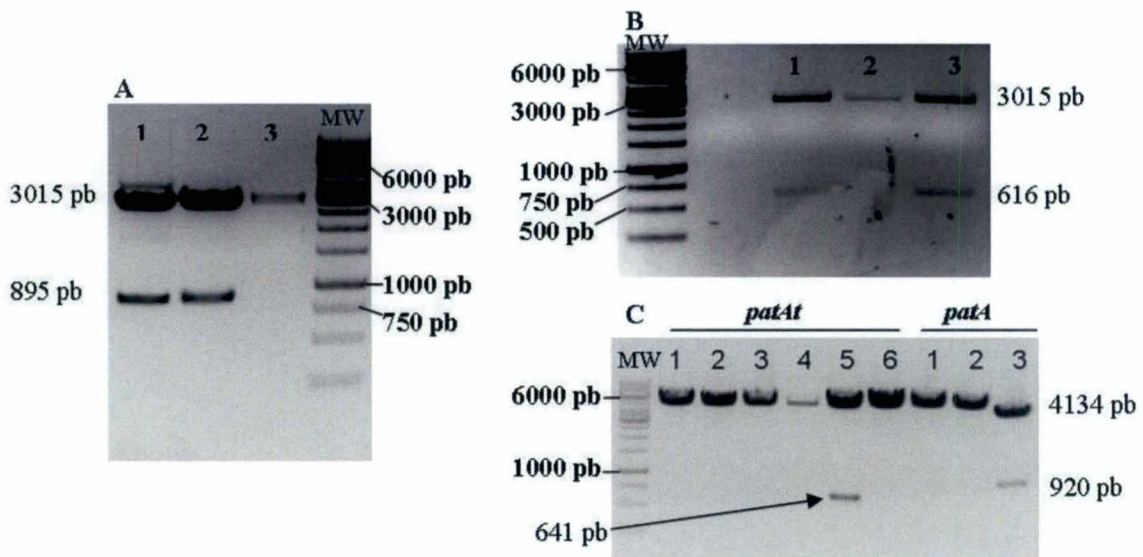


Figure 18 : Profils de migration de clones restreints de pGEM-T Easy *patA*, pGEM-T Easy *patAt*, pSK-oriT-kan *patA* et pSK-oriT-kan *patAt* en gel d'agarose 1%.

A. Trois clones issus de la ligation pGEM-T Easy *patA*, l'ADN plasmidique a été digéré par *EcoRI*. Les clones 1 et 2 présentent le profil attendu. **B.** Trois clones issus de la ligation pGEM-T Easy *patAt*, l'ADN plasmidique a été digéré par *EcoRI*. Les clones 1 et 3 présentent le profil attendu. **C.** Six clones issus de la ligation pSK-oriT-kan *patAt* et trois clones issus de la ligation pSK-oriT-kan *patA* dont l'ADN plasmidique a été digéré par *BamHI*. Les clones 5 et 3 (droite) présentent le profil attendu. Les tailles attendues sont indiquées à côté des photos.

4. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules mammifères

La stratégie suivie consiste à transférer des cellules HeLa de manière à leur faire produire les protéines d'intérêt. La toxicité de ces protéines sera ensuite évaluée par la mesure de la libération de lactate déshydrogénase par les cellules transfectées, en comparaison avec celle des cellules non transfectées. Préalablement à ces manipulations, nous avons construit les vecteurs de destination qui permettront de transférer des cellules HeLa et des cellules BHK-21.

4.1. Construction des vecteurs de destination

Une réaction LR du système de clonage GatewayTM (Invitrogen) a été réalisée afin d'effectuer une recombinaison entre les plasmides d'entrée pDONR201-*patA*, -*patB* ou -*patC* et un vecteur de destination pV1899 (qui permet la production en cellules mammifères de la protéine d'intérêt fusionnée avec un « tag » 3flag (ou tri-flag) en position N-terminale) ou pV1900 (qui permet la production en cellules mammifères de la protéine d'intérêt fusionnée avec un tag 3flag en position C-terminale). Les trois plasmides d'entrée ont été séquencés et un clone de séquence correcte a été sélectionné. Les plasmides issus des réactions de recombinaison visant à obtenir pV1899-*patA*, pV1899-*patB*, pV1900-*patA* et pV1900-*patB* ont été testés par restriction diagnostique avec l'enzyme de restriction *Cla*I. Nous observons sur gel d'agarose que les clones 1 et 2 de la recombinaison pV1900-*patA* et les clones 3 et 4 de la recombinaison pV1899-*patA* présentent les deux bandes attendues à 5261 pb et 369 pb ; à 4995 pb et 642 pb respectivement (**figure 19 A**). Les clones 1, 2 et 3 de la recombinaison pV1900-*patB* et les clones 5 et 6 de la recombinaison pV1899-*patB* montrent les quatre bandes attendues aux tailles respectivement de 4905 pb, 531 pb, 373 pb et 362 pb ; de 4983 pb, 531 pb, 362 pb et 286 pb (**figure 19 B**). Les clones recombinants (pV1899-*patC* et pV1900-*patC*) ont été clivés par l'enzyme de restriction *Nsi*I. Nous observons sur le gel d'agarose que les clones 1 et 2 de la recombinaison pV1899-*patC* présentent des bandes attendues aux tailles de 4618 pb, 596 pb et 391 pb et que les clones 3 et 4 de la recombinaison pV1900-*patC* présentent également un profil correct aux tailles attendues de 4552 pb, 665 pb et 391 pb (**figure 19 C**).

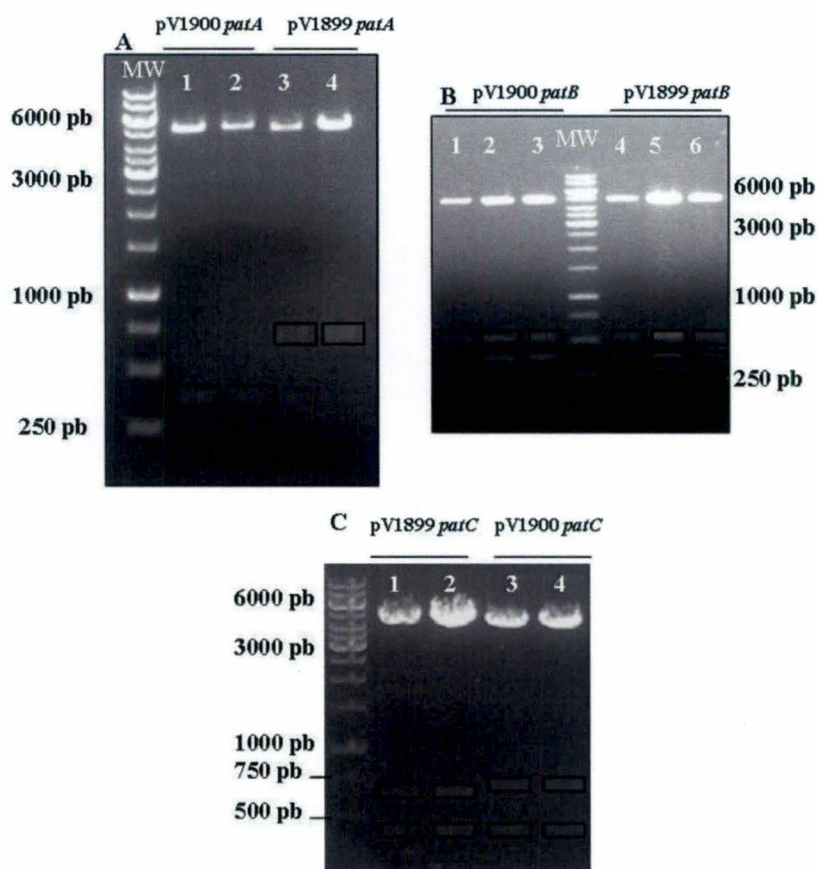


Figure 19 : Profils de migration de pV1900 -*patA*, -*patB*, -*patC* et pV1899-*patA*, -*patB*, -*patC* restreints, sur gel d'agarose 1%.

A. Piste 1 et 2 : les candidats pV1900-*patA* digérés par *ClaI* présentent les bandes aux tailles attendues (5261 pb et 369 pb). Piste 3 et 4 : les candidats pV1899-*patA* digérés par *ClaI* présentent les bandes aux tailles attendues (4995 pb et 642 pb). **B.** Piste 1, 2 et 3 : les candidats pV1900-*patB* digérés par *ClaI* présentent les bandes aux tailles attendues (4905 pb, 531 pb, 373 pb et 362 pb, ces deux derniers fragments migrent en une seule bande visible sur le gel). Piste 5 et 6 : les candidats pV1899-*patB* digérés par *ClaI* présentent les bandes aux tailles attendues (4983 pb, 531 pb, 362 pb et 286 pb). **C.** Piste 1 et 2 : les candidats pV1899-*patC* digérés par *NsiI* présentent les bandes aux tailles attendues (4618 pb, 596 pb et 391 pb). Piste 3 et 4 : les candidats pV1900-*patC* digérés par *NsiI* présentent les bandes aux tailles attendues (4552 pb, 665 pb et 391 pb). Les rectangles noirs permettent de mettre en évidence la présence de bandes de faible intensité sur le gel.

4.2. Transfection de cellules mammifères avec les plasmides de destination

Dans le but de tester la toxicité de PatA, PatB et PatC, nous avons transfecté des cellules mammifères (HeLa ou BHK-21 tel que spécifié plus bas) avec pV1899-*patA*, -*patB*, -*patC* et pV1900-*patA*, -*patB*, -*patC*. Nous avons utilisé les lignées cellulaires HeLa et BHK-21 car ce sont des types cellulaires bien décrits, souvent utilisés au laboratoire, qui sont faciles à cultiver et qui permettent généralement des transfections aisément détectables. Afin de déterminer si PatA, PatB et PatC ont un effet cytotoxique drastique comparable à celui d'ExoU en cellules mammifères, nous avons effectué un test préliminaire qui se base sur la visualisation au microscope du détachement cellulaire. L'observation des cellules transfectées comparées aux cellules non transfectées à différents temps post-transfection (1 h, 18 h et 32 h) ne montre pas de changements morphologiques (données non-montrées). La transfection de PatA, PatB et PatC ne semble donc pas affecter la survie des cellules HeLa et BHK-21 de

manière dramatique dans les conditions que nous avons testées. Avant de tirer des conclusions, il faut toutefois vérifier que la transfection des cellules HeLa et BHK-21 a permis de produire les protéines PatA, PatB et PatC. Pour cela, nous avons effectué des analyses par Western blot afin de détecter les protéines étiquetées (PatA, PatB et PatC fusionnées en N- ou en C-terminal avec le tri-flag) dans le lysat des cellules transfectées.

Pour les cellules BHK-21 et les cellules HeLa, nous pouvons observer que les protéines PatA et PatB, qu'elles soient fusionnées en N- ou en C-terminal au tri-flag, sont détectées sur Western blot. Cependant, PatC n'est jamais détectée dans les conditions testées (**figure 20**). Etant donné que la transfection du vecteur de production de PatC, qu'elle soit fusionnée en position N- ou C-terminale, n'est pas détectée, nous n'avons pas tenu en compte les résultats obtenus lors de la réalisation des tests de toxicité pour cette protéine.

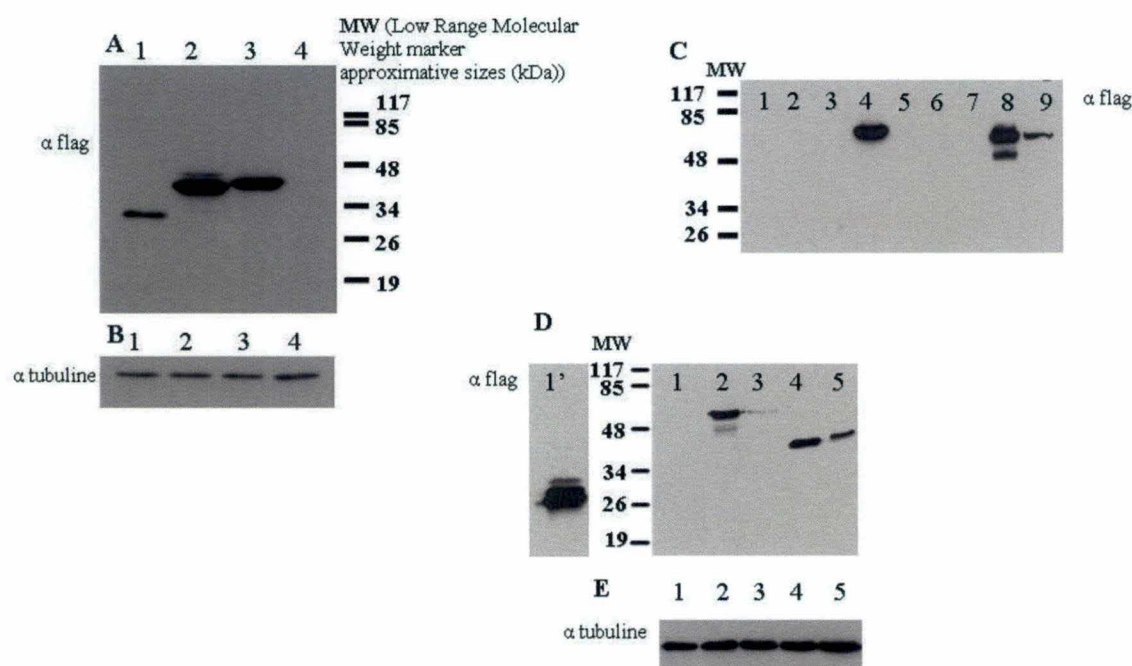


Figure 20 : Western blot visant la production de PatA, PatB et PatC (fusionnées en N- ou en C-terminal avec le tri-flag) en cellules BHK-21 et HeLa (Anticorps primaire anti-Flag). **A.** Lysat cellulaire BHK-21 transfecté avec : (1) pV1899-*rab2* (contrôle positif) correspond à une bande d'une taille attendue de 28 kDa, (2) pV1900-*pata* correspond à une bande d'une taille attendue de 38 KDa, (3) pV1899-*pata* correspond à une bande d'une taille attendue de 37 KDa. (4) Cellules BHK-21 non transfectées (contrôle négatif). **B.** Les contrôles de charge (détection de la tubuline) correspondent aux pistes 1 à 4 de la photo A. Ces contrôles indiquent que des quantités similaires de lysat ont été déposées dans chaque piste. **C.** Lysat cellulaire HeLa transfecté avec : (1) pV1900-*patC* (bande d'une taille attendue de 40 KDa), (2) pV1899-*patC* (bande d'une taille attendue de 39 KDa). (3) Cellules HeLa non transfectées (contrôle négatif). (4) Le contrôle positif (protéine de *Caulobacter* : CC0170) correspond à une bande d'une taille attendue de 57 KDa. (5) Cellules BHK-21 non transfectées (contrôle négatif). Lysat cellulaire BHK-21 transfecté avec : (6) pV1900-*patC* (une bande d'une taille attendue de 40 KDa), (7) pV1899-*patC* (bande d'une taille attendue de 39 KDa), (8) pV1900-*patB* correspond à une bande d'une taille attendue de 58 KDa, (9) pV1899-*patB* correspond à une bande d'une taille attendue de 57 KDa. Le contrôle de charge (détection de la tubuline) n'est pas présent suite à un problème technique. **D.** (1') Lysat bactérien de RicA-3flag (contrôle positif, taille attendue 21,6 KDa). (1) Cellules HeLa non transfectées. Lysat cellulaire HeLa transfecté avec : (2) pV1900-*patB* (58 KDa), (3) pV1899-*patB* (57 KDa), (4) pV1900-*pata* (38 KDa), (5) pV1899-*pata* (37 KDa). **E.** Les contrôles de charge (détection de la tubuline) correspondent aux pistes 1 à 5 de la photo E.

4.3. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules. Elle est rapidement libérée dans le surnageant des cellules quand la membrane plasmique est endommagée. Une simple mesure avec le kit de détection de cytotoxicité peut facilement déterminer l'activité LDH dans le surnageant de la culture ou dans l'entièreté de la culture cellulaire. L'augmentation d'activité LDH résulte en fait de l'augmentation dans le surnageant de culture de la quantité de cellules mortes ou de cellules dont la membrane plasmique a été endommagée. La première étape consiste à la transformation du lactate en pyruvate suite à l'action de la lactate déshydrogénase qui se trouve dans le surnageant de culture cellulaire, en plus ou moins grande quantité en fonction de la lyse des cellules. Ceci induit la réduction de NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$. Lors de la seconde étape, le NADH provoque la réduction d'un sel tétrazolium (composé jaune) en sel formazan (composé rouge). La valeur d'absorbance finale obtenue permet de déterminer le pourcentage de cytotoxicité en utilisant la formule mathématique fournie par le kit (**figure 21**).

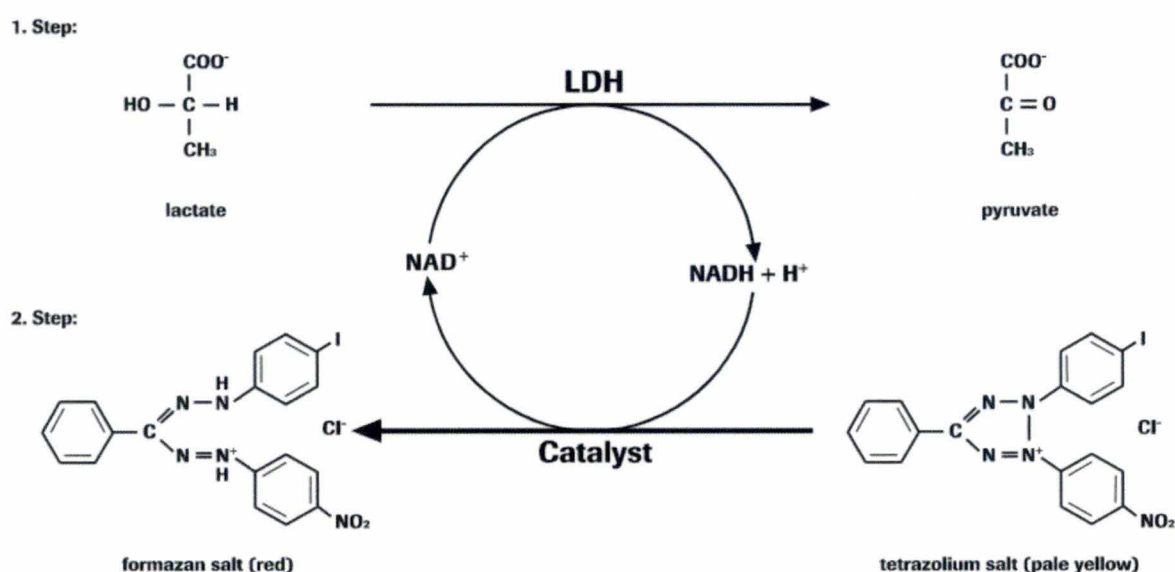


Figure 21 : Représentation schématique de la détection de toxicité via libération de la lactate déshydrogénase (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, Roche).

4.4. Résultats du test de toxicité

Afin de déterminer le pourcentage de cytotoxicité de la protéine d'intérêt, il faut calculer la moyenne des valeurs d'absorbance des triplicats des échantillons et des contrôles et leur soustraire à chacun la valeur d'absorbance obtenue par le contrôle « background » (déterminé par l'activité LDH contenue dans le milieu). Ensuite, il faut utiliser la formule reprise ci-dessous où « expected value » correspond à la valeur d'absorbance moyenne des triplicats moins la valeur du contrôle « background », le contrôle « low » correspond à l'activité LDH libérée par les cellules non-traitées (c'est-à-dire la libération spontanée de LDH) et le contrôle « high » correspond à l'activité LDH maximale dans les cellules. Ce contrôle high est obtenu en utilisant un tampon de lyse sur les cellules. Les cellules transfectées sont des HeLa.

Formule utilisée pour calculer le pourcentage de cytotoxicité :

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

Suite à l'utilisation de cette formule, nous avons obtenu un pourcentage de cytotoxicité nul pour PatA et PatB qu'elles soient fusionnées en position N- ou C- terminale avec le tri-flag. Afin de mieux visualiser les résultats d'absorbance obtenus lors du test de détection, nous avons réalisé un graphique qui montre les valeurs d'absorbance moyennes par échantillon. La production des protéines de fusion a été vérifiée par Western blot en parallèle, à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre l'étiquette tri-flag (**figure 20**).

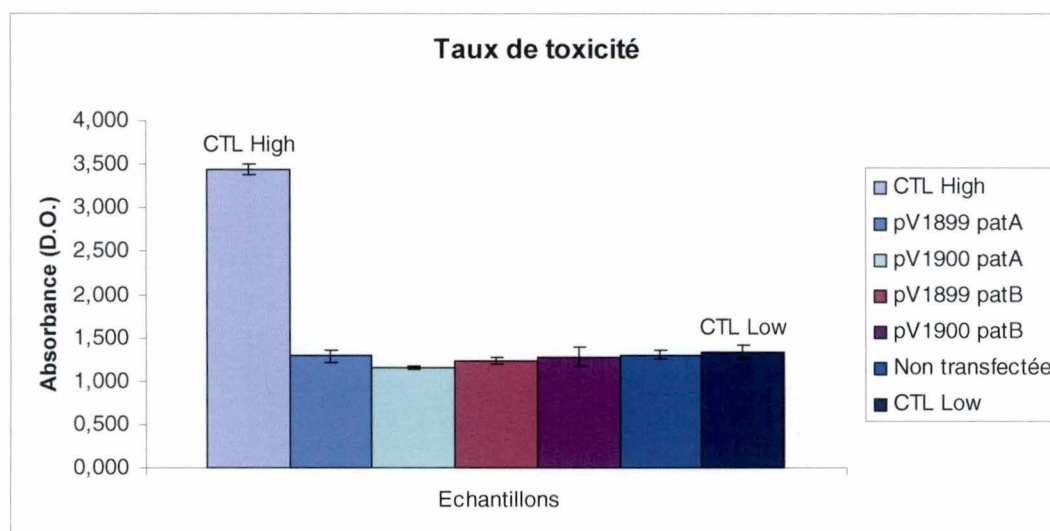


Figure 22 : Taux de toxicité de pV1899 patA, pV1900 patA, pV1899 patB et pV1900 patB peut être calculé en fonction des valeurs d'absorbance obtenues et en fonction du rapport avec les contrôles Low et High.

Sur le graphique (**figure 22**), nous pouvons observer que le contrôle high qui correspond à l'activité maximale de LDH qui peut être libérée, présente une absorbance beaucoup plus élevée que les autres. Ceci concorde bien avec ce qui était attendu étant donné que le contrôle high correspond aux cellules qui ont été lysées. Les membranes de ces cellules ont été endommagées et par conséquent on observe une grande quantité de LDH libérée. Le contrôle low quant à lui correspond au taux basal de LDH libéré par les cellules. Nous pouvons remarquer que les valeurs d'absorbance des cellules transfectées par *patA* ou *patB* (qu'il s'agisse des fusions en 5' ou 3' terminale) sont du même ordre que celle du contrôle low. Cette donnée ainsi que le pourcentage de toxicité que nous avons calculé précédemment, nous indiquent que PatA et PatB ne semblent pas être toxiques en cellules HeLa.

5. Test de toxicité de PatA, PatB et PatC en levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme souvent utilisé pour identifier et caractériser des facteurs de virulence bactériens (Siggers and Lesser, 2008). Au laboratoire, elle pousse facilement, elle est génétiquement malléable et est utilisée comme modèle pour étudier les processus cellulaires eucaryotes depuis plus de 50 ans. L'étude de la toxicité d'ExoU, protéine effectrice de *Pseudomonas aeruginosa*, a notamment été réalisée en levure. Pour cela, le gène codant cette protéine a été mis sous le contrôle d'un promoteur régulable (*GALI*). Son activité est régulée en fonction de la source de carbone fournie dans le milieu. Selon l'équipe de Sato, l'expression d'ExoU en levure est extrêmement cytotoxique et présente un phénotype de fragmentation vacuolaire (Sato *et al.*, 2003).

Dans le but de tester l'éventuelle toxicité de PatA, PatB et PatC dans *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons construit des vecteurs de destination capables d'exprimer sous le contrôle d'un promoteur régulable *patA*, *patB* et *patC* en levure. Dans la littérature, l'évaluation de la toxicité en levure se réalise par observation de la croissance des souches dans les conditions données. Ceci se réalise typiquement par : (1) la réalisation de stries de croissance et (2) la réalisation de gouttes de dilution. Nous avons utilisé ces deux approches pour tester la survie de levures produisant les protéines PatA, PatB ou PatC.

5.1. Construction des vecteurs de destination

Une réaction LR du système de clonage GatewayTM (Invitrogen) a été réalisée afin d'effectuer une recombinaison entre un pDONR201-*patA*, -*patB* ou -*patC* et un vecteur de destination pYES-DEST52. Ce plasmide, outre le fait qu'il permet l'expression d'un gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur régulable p*GALI*, est caractérisé par le marqueur URA3. Les souches de levure dont le fond génétique est *ura3⁻* pousseront sur milieu sans uracile uniquement si elles portent le plasmide pYES-DEST52. Les différents plasmides issus de la recombinaison ont été vérifiés par restriction diagnostique avec l'enzyme de restriction *NsiI*. Nous observons sur gel d'agarose que les clones 1, 2 et 3 de la recombinaison pYES-DEST52 *patA* présentent le profil attendu qui correspond à deux bandes de 4881 pb et 1932 pb. Le clone 4 de la recombinaison pYES-DEST52 *patB* présente le profil attendu qui correspond à cinq bandes de 2999 pb, 1932 pb, 1667 pb, 386 pb et 366 pb. Le clone 5 de la recombinaison pYES-DEST52 *patC* présente le profil attendu qui correspond à trois bandes de 2576 pb, 2366 pb et 1932 pb (**figure 23**).

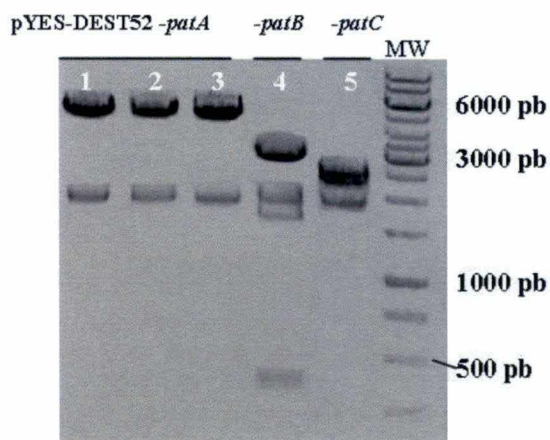


Figure 23 : Profil de migration des pYES-DEST52 *patA*, pYES-DEST52 *patB* et pYES-DEST52 *patC* restreints, sur gel d'agarose 1%.

Piste 1, 2 et 3 : pYES-DEST52 *patA* digéré par *NsiI* présente les bandes aux tailles attendues de 4881 pb et 1932 pb. Piste 4 : pYES-DEST52 *patB* digéré par *NsiI* présente les bandes aux des tailles attendues de 2999 pb, 1932 pb, 1667 pb, 386 pb et 366 pb. Remarque : les fragments de 386 pb et 366 pb migrent en une seule bande visible sur le gel. Piste 5 : pYES-DEST52 *patC* digéré par *NsiI* présente les bandes aux tailles attendues de 2576 pb, 2366 pb et 1932 pb. Remarque : les fragments de 2576 pb et 2366 pb migrent en une seule bande visible sur le gel.

5.2. Test de survie de PatA, PatB et PatC en levure

Afin de pouvoir tester la survie de PatA, PatB et PatC en levure, nous avons transformé la souche de *Saccharomyces cerevisiae* BF264-15 Dau (*MATa ade1his2 leu2 trp1 ura3*) avec le plasmide de destination pYES-DEST52 portant le gène *patA*, *patB* ou *patC* sous le contrôle d'un promoteur régulable au galactose, le *pGALI*. L'avantage d'un promoteur régulable consiste à induire l'expression de *patA*, *patB* ou *patC* en présence de galactose dans le milieu et de la réprimer en présence de glucose. Ceci est un avantage car il rend possible la comparaison entre une souche qui produit et une souche qui ne produit pas la protéine sur le même milieu. De plus, si la protéine est toxique, il est possible d'obtenir des transformants et d'induire la production de la protéine choisie au moment voulu et d'observer le phénotype donné dans cette fenêtre de temps. Du raffinose est ajouté au milieu galactose afin de fournir aux levures une source de carbone plus facilement métabolisable que le galactose.

Le contrôle positif utilisé correspond à la souche BF264-15 Dau (reçue de John C. Reed, Burnham Institute for Medical Research) transformée avec le plasmide pYES-DEST52-*bcl_{xl}*, déjà à notre disposition au laboratoire. Il s'agit du même vecteur de destination que celui utilisé pour l'expression des *pat* en levure. Des tests préalablement réalisés (URBM, Namur) ont montré que les levures transformées avec ce plasmide poussent sur milieu glucose et sur milieu galactose/raffinose. Les clones pYES-DEST52-*patA*, pYES-DEST52-*patB*, pYES-DEST52-*patC* et pYES-DEST52-*bcl_{xl}* peuvent par conséquent être sélectionnés pour leur capacité à croître en absence d'uracile.

Après quatre jours d'incubation dans une étuve à 30°C, nous pouvons observer la survie des levures produisant PatA, PatB et PatC au moyen de stries ou de gouttes de dilution sur milieu glucose d'une part et sur milieu galactose/raffinose d'autre part. En effet, la toxicité de PatA, PatB et PatC en levure peut être testée en réalisant soit des stries de croissance soit des gouttes de dilution. Généralement, les deux méthodes sont utilisées car elles sont complémentaires. Les stries de croissance permettent d'observer des effets plus marqués alors que les gouttes de dilution permettent une détection de différences de croissance plus subtiles.

Suite à l'observation des stries de croissance (**figure 24 A**), PatA, PatB et PatC ne semblent pas avoir d'effet toxique marqué en levure. Les levures transformées ont été incubées sur milieu glucose (répresseur) et sur milieu raffinose/galactose (inducteur). Le milieu glucose permet de déterminer si la transformation du vecteur dans la levure s'est réalisée. Afin d'analyser la toxicité de manière plus fine, nous avons également effectué des gouttes de dilution sur milieu glucose et galactose/raffinose. Les gouttes de dilution sont obtenues en déposant sur boîte des cultures de levures diluées de manière sériée. La **figure 24 B**, nous indiquent un retard de croissance pour pYES-DEST52-*patB* sur milieu inducteur (galactose 2%, raffinose 1%), par comparaison aux autres transformants. Ces autres transformants pYES-DEST52-*patA* et pYES-DEST52-*patC* ne présentent pas de retard de croissance sur milieu galactose/raffinose.

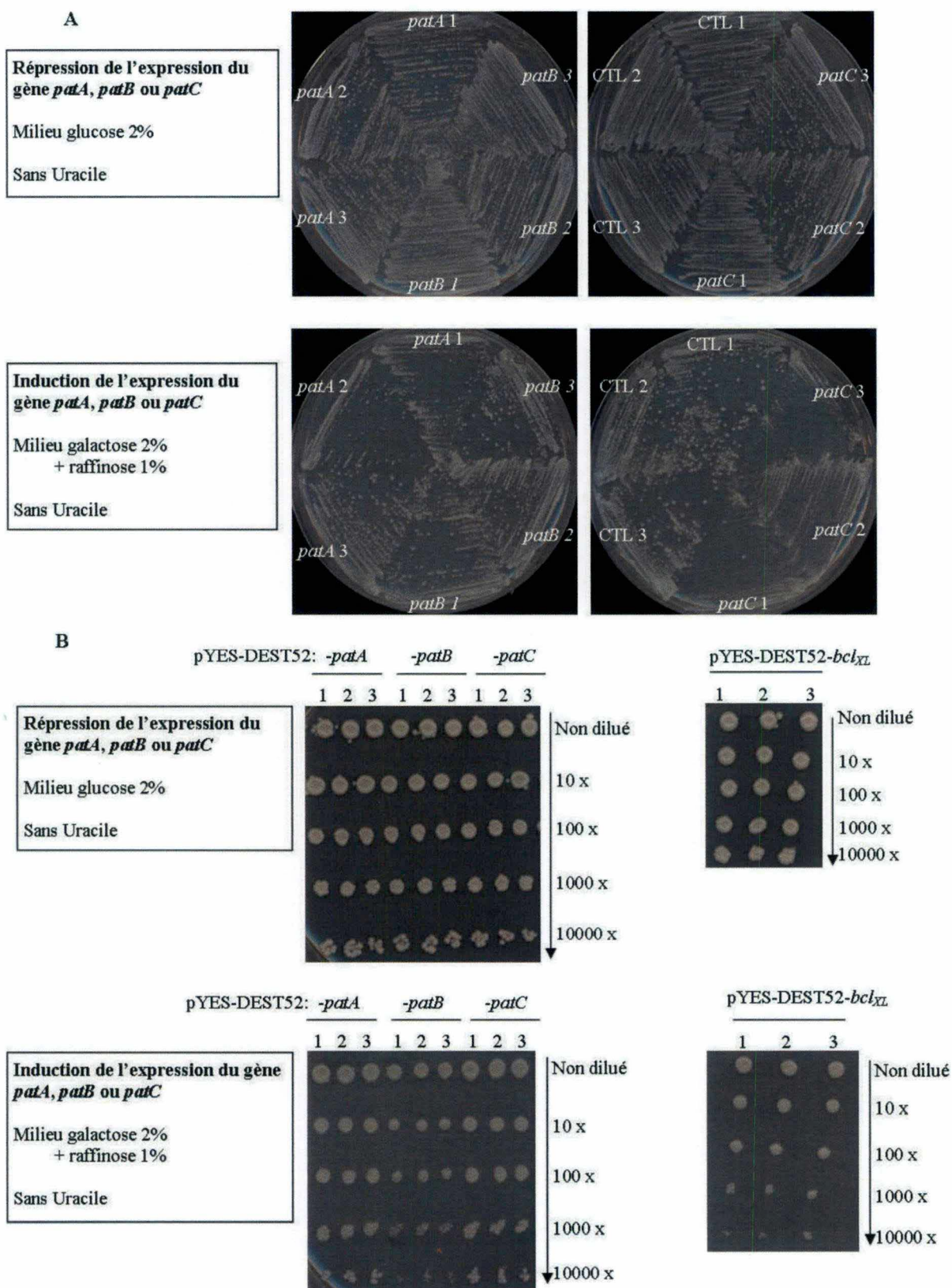


Figure 24 : Gouttes de dilution et stries de pYES-DEST52-*patA*, pYES-DEST52-*patB*, pYES-DEST52-*patC*. Stries de croissance (A) et gouttes de dilution (B) de trois clones de pYES-DEST52-*patA*, pYES-DEST52-*patB*, pYES-DEST52-*patC* sur milieu répresser (glucose 2%) ou inducteur (galactose 2%, raffinose 1%) de l'expression du gène *patA*, *patB* ou *patC*. Le contrôle positif utilisé est la souche BF264-15 Dau transformée avec le plasmide pYES-DEST52-*bclXL*.

Discussions et
perspectives

Discussions et perspectives

Les principaux objectifs de ce mémoire étaient (i) de caractériser le rôle de PatA (codée par la séquence codante BMEI1035), PatB (BMEI0401) et PatC (BMEI0908) dans la virulence de *Brucella* en utilisant un modèle d'infection cellulaire, (ii) de déterminer si ces patatine-like protéines possèdent ou non une fonction de stockage, (iii) de tester l'activité phospholipase de PatA et du domaine patatine (PatAt) et (iv) de déterminer l'éventuelle toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules mammifères et en levure.

1. Construction des mutants de délétion

Dans le but de tester le rôle de PatA, PatB et PatC dans la virulence de *Brucella* en cellules HeLa et de déterminer l'éventuelle fonction de stockage de PatA chez cette bactérie pathogène, nous avons construit des mutants de délétion. Le mutant de délétion *patA* était déjà disponible dans la souche *Brucella melitensis* 16M. Une des perspectives de ce mémoire serait d'obtenir ce mutant dans la souche *Brucella abortus* 2308. En effet, *Brucella abortus* est une souche mieux caractérisée, moins virulente pour l'homme et plus utilisée dans le milieu scientifique que *Brucella melitensis* 16M. Afin d'obtenir le mutant $\Delta patA$, une conjugaison entre le plasmide pJQ200 $\Delta patA$ et la souche de *Brucella abortus* 2308 sera réalisée. Suite à une stratégie de remplacement allélique se basant sur la sélection de deux évènements successifs de recombinaisons homologues, le gène sauvage *patA* sera délété.

La construction des deux autres mutants $\Delta patB$ et $\Delta patC$ est en cours. Nous disposons à l'heure actuelle des constructions dans le pGEM-T Easy (vecteur de sous-clonage). L'étape suivante consistera à insérer les inserts $\Delta patB$ et $\Delta patC$ dans le plasmide pJQ200. Une fois cette construction obtenue, nous pourrons (1) réaliser une conjugaison entre la souche d'*E. coli* qui contient soit le plasmide pJQ200 $\Delta patB$, soit le plasmide pJQ200 $\Delta patC$ avec la souche de *Brucella abortus* 2308 et (2) sélectionner les mutants $\Delta patB$ ou $\Delta patC$ à l'aide de la stratégie de remplacement allélique qui sera utilisée pour la construction du mutant $\Delta patA$.

Par la suite, il serait également intéressant de réaliser des triples mutants *patA*, *patB* et *patC*. Ils permettraient éventuellement d'obtenir un phénotype plus marqué et ainsi de mieux identifier le rôle des patatine-like protéines chez *Brucella* dans la virulence ou leur éventuelle fonction de stockage.

Enfin, afin d'être certain que les éventuels effets observés sont effectivement dus à la mutation en tant que telle, un test de complémentation devra être effectué en amenant le gène sauvage sur un plasmide dans la souche mutée. Ce test permettra de déterminer si le phénotype mutant n'est pas dû à une autre mutation.

2. Test d'infection de cellules HeLa par le mutant $\Delta patA$

Etant donné que le mutant de délétion *Brucella melitensis* $\Delta patA$ était à notre disposition, nous avons réalisé des tests préliminaires d'infection de cellules HeLa avec la souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M et la souche mutée $\Delta patA$. Cette expérience nous a permis de comparer l'évolution du nombre de bactéries intracellulaires en fonction du temps. Sur la **figure 15**, nous pouvons remarquer que le nombre de CFU obtenu lors de l'infection avec le mutant de délétion $\Delta patA$ est plus important d'environ un logarithme que le nombre de CFU obtenu pour les cellules infectées avec la souche sauvage (24 h et 48 h post-infection). Différentes hypothèses peuvent expliquer cette différence entre la souche sauvage et la souche mutée. Il est possible que PatA ait un rôle à jouer dans la mise en place du trafic intracellulaire de *Brucella*. En effet, PatA permet peut-être de faciliter le recrutement de certains effecteurs ou composants de la voie endocytaire. Ainsi, une mutation $\Delta patA$ empêche peut-être une maturation complète de certaines étapes de la voie endocytaire, mais permettrait à la BCV d'interagir et de fusionner plus rapidement avec les endosomes et le lysosome, et donc de permettre d'initier la réplication avant la souche sauvage. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi aux temps post-infection que nous avons observés le nombre de bactéries intracellulaires pour la souche mutée est plus important que celui de la souche sauvage.

Cependant, une observation de la souche sauvage et de la souche mutée à des temps plus tardifs post-infection nous permettrait peut-être d'observer une augmentation du nombre de CFU pour la souche sauvage. Il est en effet possible que la souche mutée n'ait pas acquis tous les marqueurs ou effecteurs nécessaires à sa maturation complète et qu'après un certain temps, la souche sauvage prenne avantage sur la souche mutée. Autrement dit, des marqueurs essentiels requis pour la réplication et la survie de la bactérie n'ont peut-être pas été acquis par le mutant $\Delta patA$. Un argument pour appuyer cette hypothèse est l'atténuation de la virulence en souris à quatre semaines post-infection du mutant Δpat par rapport au sauvage. Notons ici que le modèle murin est nettement plus complexe que le modèle cellulaire puisqu'il s'agit d'un organisme complet. Ceci implique des interactions entre les cellules infectées et d'autres cellules, ainsi qu'un rôle important du système immunitaire. Dès lors, il ne serait pas étonnant d'observer une atténuation de virulence dans un modèle et une augmentation dans l'autre. Toutefois, avant de tirer des conclusions, nous devons répéter cette expérience préliminaire afin de vérifier si les résultats obtenus sont reproductibles. Suite à des marquages en microscopie, nous pourrions vérifier si la BCV contenant le mutant $\Delta patA$ a acquis tous les marqueurs présents normalement dans la souche sauvage lors du trafic intracellulaire de *Brucella* tels que Rab5 et early endosome antigen-1 (endosome précoce), LAMP-1 (endosome intermédiaire), Rab7 et RILP (endosome tardif et lysosome).

Il serait également intéressant de déterminer s'il existe des différences au niveau de l'évolution du nombre de bactéries à différents temps post-infection lorsque que nous infectons des cellules HeLa avec les mutants de délétion $\Delta patB$ ou $\Delta patC$ et la souche sauvage. Nous pourrions aussi tester l'infection d'autres types cellulaires comme les cellules BHK-21 (cellules de type fibroblastique) ou des lignées de macrophages bovins par les trois mutants de délétion afin de vérifier si nous observons les mêmes résultats que pour les cellules HeLa. Il est en effet possible que les résultats obtenus soient différents en fonction du type cellulaire infecté.

Une autre perspective consisterait à infecter des souris par injection directe de bactéries sauvages et mutées ($\Delta patA$, $\Delta patB$ ou $\Delta patC$) dans la cavité péritonéale afin de quantifier et comparer leur survie et leur réplication dans la rate. En effet, il a été montré au laboratoire (A. Jamet, résultat non publié URBM Namur) que la virulence d'un mutant de délétion *patA* de *Brucella melitensis* 16M comparé à la souche sauvage (*Brucella melitensis* 16M) diminue en souris quatre semaines post-infection. Il serait donc intéressant de déterminer si les autres patatine-like protéines jouent un rôle similaire ou si la mutation *patA* est spécifique au regard de ce phénotype.

3. Détermination de l'éventuelle fonction de stockage de *patA*

Un test de croissance de la souche sauvage *patA* et de la souche mutée $\Delta patA$ sur milieu défini avec différentes concentrations d'azote et de carbone a été réalisé pour déterminer si PatA peut effectivement être considérée comme une protéine de stockage chez *Brucella*. En effet, chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), les patatines constituent une source de carbone et d'azote permettant à la plante de survivre entre les périodes de pousse ou lors de conditions défavorables (Rosahl *et al.*, 1987).

Les résultats obtenus (**Figure 16 et 17**) ne montrent pas de différence importante au niveau des valeurs d'absorbance observées en fonction du temps lorsque l'on compare la souche sauvage *patA* par rapport à la souche mutée $\Delta patA$ dans les conditions testées. Ils ne permettent donc pas de conclure à un rôle de stockage de PatA dans le sens où elle servirait elle-même directement de source de carbone ou d'azote. Néanmoins, il est possible que le rôle éventuel de PatA ne se présente pas sous forme de stockage comme chez les plantes mais plutôt grâce à l'action d'une activité phospholipase sur les membranes. Ce processus est notamment utilisé par *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie pathogène qui possède une activité phospholipase permettant la libération d'acides gras libres. Ces précurseurs de la synthèse de triacylglycérols peuvent être stockés et utilisés par la bactérie comme source de carbone durant sa période de dormance (Srinivas *et al.*, 2008). Dans ce cas, il s'agit d'une enzyme qui permet l'acquisition de nutriments. En faisant un parallèle entre *Mycobacterium tuberculosis* et les données dont nous disposons, nous pouvons supposer que *Brucella* puisse posséder une activité phospholipase qui lui permettrait peut-être de cliver les phospholipides des membranes afin d'acquérir des nutriments pouvant lui être utiles à la survie ou à différents stades de la virulence.

4. Construction de plasmides d'expression pour la surproduction et la purification de PatA et PatAt

Afin de pouvoir surproduire les protéines PatA et PatAt fusionnées à un tag 6His, nous devons insérer PatA et PatAt dans un vecteur de surexpression comme le pET16b. Une fois clonés dans le vecteur de surexpression, les gènes *patA* et *patAt* seront sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7. Ce promoteur permet la production de la protéine en présence de T7 RNA polymérase chez *E. coli*. La purification de la protéine se fera grâce au tag 6His qui possède une affinité pour les ions nickel. Le tag 6His des protéines permettra de les purifier après leur fixation sur des billes couvertes de nickel d'une colonne de chromatographie.

Une fois la protéine purifiée obtenue, l'activité phospholipase de PatA et de PatAt sera testée en collaboration avec Edgardo Moreno (Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica). Il existe différentes techniques pour déterminer l'activité phospholipase A2 d'une protéine. (1) Etant donné que les phospholipases sont capables d'infliger des dégâts aux membranes, il est possible de tester la perméabilité des cellules. Par exemple, ceci pourrait être mesuré en mettant en contact PatA et PatAt avec les cellules puis en réalisant un test qui permet de quantifier la libération de la LDH. (2) L'activité phospholipase A2 peut également être détectée en mesurant la quantité d'acide arachidonique libérée lors de l'action de cette enzyme. En effet, la libération d'acide arachidonique induit une acidification qui est visible suite à un indicateur de pH. (3) Enfin, il est possible de mesurer par spectrophotométrie l'activité PLA2. Ces tests utilisent un substrat qui lors du clivage par la phospholipase A2 permet la libération d'un composé qui sera détecté par test colorimétrique.

5. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en cellules HeLa et BHK-21

Des tests préliminaires de toxicité basés sur l'observation du détachement cellulaire avaient montré que la production de PatA ou PatB ne semblaient pas induire des signes de toxicité dramatique dans les conditions testées en cellules HeLa et BHK-21. Etant donné que les protéines PatA et PatB, qu'elles soient fusionnées en position N- ou C-terminale avec le tag tri-flag, sont détectées en Western blot dans les lysats de cellules préalablement transfectées, nous pouvons conclure que le tag 3flag ne semble pas poser de problème pour la production de ces protéines et par conséquent que l'absence de mortalité dramatique n'est pas due à l'absence de ces protéines. Contrairement à ce que nous avons observé pour PatA et PatB, il a été montré que la transfection de cellules mammifères par ExoU induit une mort rapide qui est détectée 3 h post-transfection avec seulement une petite quantité d'ADN engagé. En effet, ExoU est une toxine si puissante que la protéine n'est pas détectée par Western blot : une très faible production de la protéine est suffisante pour rapidement provoquer la mort des cellules. Nous ne sommes visiblement pas dans cette situation avec PatA et PatB. Toutefois, il aurait été intéressant de disposer d'ExoU comme contrôle positif de toxicité afin de pouvoir confirmer qu'il n'existe effectivement pas de cytotoxicité induite par PatA et PatB. Nous avons reçu très récemment une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, à partir de laquelle une amplification du gène codant ExoU pourra être réalisée en vue du clonage de ce gène dans nos vecteurs de transfection.

Afin de tester plus précisément l'éventuelle toxicité des patatine-like protéines chez *Brucella*, nous avons utilisé un kit de détection de cytotoxicité qui se base sur la mesure de la libération de LDH. Les résultats obtenus suite à ce test, qui a été réalisé deux fois, nous amènent à conclure que PatA et PatB ne sont pas cytotoxiques en cellules HeLa, dans les conditions que nous avons testées. Il serait étonnant dans un contexte *in vivo* d'observer une activité cytotoxique dramatique d'un effecteur, car *Brucella* semble être une bactérie pathogène intracellulaire connue pour favoriser la survie des cellules hôtes, par exemple en inhibant l'apoptose (Gross *et al.*, 2000). Une toxine aussi puissante qu'ExoU pourrait ainsi compromettre certaines étapes du cycle d'infection de *Brucella*. On ne pouvait pas écarter la possibilité d'une action cytotoxique de ces protéines à domaine patatine-like dans un contexte de surexpression en cellules cultivées. De plus, il est possible que ces phospholipases putatives aient un rôle plus discret à jouer comme par exemple perturber la composition membranaire, la signalisation ou le trafic cellulaire. Il serait tout de même intéressant de tester

la détection de la libération de LDH dans d'autres types cellulaires afin de s'assurer que PatA et PatB ne présentent effectivement pas de toxicité en cellules mammifères. L'utilisation d'un contrôle de toxicité est également nécessaire.

La protéine PatC qu'elle soit fusionnée en N- ou en C-terminal avec le tag tri-flag n'est pas détectée en Western blot (ni en cellules Hela ni en cellules BHK-21). Différentes hypothèses sont envisagées pour expliquer ceci : (1) soit la transfection de la cellule hôte ne s'est pas effectuée, (2) soit le tag 3flag pose un problème de production de PatC, par exemple parce qu'il empêche la protéine de se replier dans sa conformation habituelle, (3) soit la production de PatC est tellement faible que l'on ne la détecte pas en Western blot. Afin de pallier au problème lié à la production de PatC, nous pouvons envisager de fusionner PatC à d'autres tags. Toutefois, le choix du tag tri-flag était déjà lié à l'avantage de sa taille relativement petite par rapport à d'autres tags, ce qui nous permettait de supposer une influence moins importante pour la production et le repliement corrects des protéines de fusions.

6. Test de la toxicité de PatA, PatB et PatC en levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme souvent utilisé pour identifier et caractériser des facteurs de virulence bactériens. En effet, beaucoup de processus cellulaires sont conservés entre la levure et les cellules mammifères. Il existe de nombreux cas où les voies ciblées par les bactéries sont des voies qui ont leurs équivalents chez la levure. Le principal avantage d'étudier des effecteurs bactériens dans la levure est aussi lié à la simplicité d'utilisation de ce système (Valvidia, 2004 ; Siggers and Lesser, 2008). De plus, il est possible de contrôler aisément (souvent par simple changement d'un constituant du milieu) l'expression de gènes d'intérêt placés sous le contrôle de promoteurs inductibles. Ceci permet de contrôler le moment exact de la production d'une protéine toxique, autorisant ainsi l'analyse de son mécanisme d'action. Enfin, la toxicité et le mécanisme d'action d'ExoU, notre protéine effectrice modèle qui contient un domaine patatine-like, ont été testés en levure (Sato *et al.*, 2003). La production d'ExoU dans les cellules mammifères après transfection induit des dégâts irréversibles de la membrane cellulaire et une mort rapide (Finck-Barbançon *et al.*, 2001). Les expériences réalisées par l'équipe de Sato ont montré que l'expression d'ExoU dans *Saccharomyces cerevisiae* induit également une cytotoxicité dramatique en levure. Cette cytotoxicité est détectable 30 minutes après l'induction de l'expression du gène codant ExoU (Sato *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2003). Dans le but d'étudier le mécanisme d'action de cette protéine, les levures ont préalablement été marquées avec un composé qui s'accumule dans la membrane de la vacuole, puis mises sur milieu inducteur permettant l'expression d'*exoU*. Les levures ont ensuite été directement observées en microscopie à fluorescence. Ceci a permis de constater une fragmentation vacuolaire qui est à l'origine de la mort des levures.

Ainsi, pour les raisons que nous venons d'évoquer ci-dessus, nous avons testé l'éventuelle toxicité de PatA, PatB et PatC dans *Saccharomyces cerevisiae*, en parallèle des tests qui ont été effectués en cellules mammifères. Pour cela, nous avons construit des vecteurs de destination pYES-DEST52 permettant l'expression de *patA*, *patB* ou *patC* sous le contrôle d'un promoteur régulable *GALI*. La toxicité en levure est testée par observation de la croissance après induction de l'expression du gène d'intérêt et par comparaison à des souches contrôles. Cette croissance a été observée sur base des stries de croissance (méthode permettant une visualisation « de type noir-blanc » de la croissance ou de la non croissance, pour autant que le défaut de croissance soit important) ou des gouttes de dilution (méthode

plus fine d'observation de la croissance). Les stries sur boîtes à elles seules ne montrent pas d'effet important de PatA, PatB et PatC sur la croissance. Par contre, les gouttes de dilutions semblent indiquer une croissance retardée ou moins importante pour les souches produisant PatB. Ces données devront être confirmées dans un premier temps, et accompagnées de contrôles supplémentaires, tels que la détection par Western blot des protéines de fusion dans les différentes souches testées. Nous pourrions également déterminer si l'effet observé en gouttes de dilutions pour PatB est à mettre en relation avec une mortalité ou un retard de croissance.

Une perspective intéressante serait d'observer au microscope à fluorescence, en levure, PatA, PatB et PatC après induction de leur production en utilisant différentes sondes permettant, par exemple, le marquage de la vacuole. L'utilisation d'un marqueur de la membrane vacuolaire (MYD-64) a en effet permis de mettre en évidence qu'ExoU provoque un phénotype de fragmentation vacuolaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sato *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant de tester la fragmentation vacuolaire dans les levures qui produisent PatB étant donné l'effet observé lors des tests préliminaires de croissance réalisés.

7. Conclusion

Suite aux expériences réalisées au cours de ce mémoire, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une part que PatA ne possède pas de rôle de stockage tel que celui décrit pour les patatines végétales. Toutefois, une activité phospholipase putative pourrait notamment jouer un rôle dans l'acquisition de nutriments à différentes étapes de la virulence. D'autre part, au vu des tests permettant de mesurer la quantité de LDH libérée que nous avons réalisés, PatA et PatB ne semblent pas être des protéines toxiques en cellules mammifères, dans les conditions testées. Cependant, en levure, les souches produisant PatB indiquent une croissance retardée (contrairement à PatA et PatC). Enfin, le mutant *Brucella melitensis* $\Delta patA$ présente une virulence plus importante que celle de la souche sauvage, suggérant un rôle de PatA dans l'infection. Une fois les mutants $\Delta patA$, $\Delta patB$ et $\Delta patC$ obtenus dans la souche *Brucella abortus* 2308, leur virulence sera aussi évaluée dans les différents modèles d'infection.

Matériels et méthodes

1. Milieux de culture

1.1. Milieux de culture pour les bactéries

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

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

1.1.2. Milieu riche pour *Brucella spp.* : milieu 2YT

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

Après préparation, autoclaver les milieux (20' à 120°C, 1 bar) et ajouter le(s) antibiotique(s) nécessaire(s).

1.1.3. Milieu défini : composition de la base saline

Pour 1 L	Forme liquide
K ₂ HPO ₄	9,2 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,1 g
NaCl	5 g
Nicotinate	0,2 g
Thiamine	0,2 g
Panhotenate	0,07 g
MgSO ₄	0,01 g
Mn SO ₄	0,0001 g
Fe SO ₄	0,0001 g
Biotine	0,0001 g

1.1.4. Sources de carbone et d'azote utilisées dans le milieu défini

Les conditions testées sont les suivantes³ :

1. Milieu défini érythritol 2 g/L (Ery), source d'azote 0,5 g/L (Sn): ErySn
2. Milieu défini érythritol 0,5 g/L (Ery*), source d'azote 0,1 g/L (Sn*): Ery*Sn*

³ Chaque condition a été réalisée en triplicats.

Tableau 4 : Souches bactériennes, souche de levure et plasmides utilisés.

	Caractéristiques	Références ou sources
Souches bactériennes		
<i>E. coli</i> DH10B	(F ⁻ <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> .)	GibcoBRL (Invitrogen)
DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA1</i> (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5 - leu mtl1</i> .	Invitrogen
S-17.1 λ pir	λ pir [<i>recA thi pro hsdR</i> ⁻ M ⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenised with λ pir phage].	(Miller and Mekalanos, 1988)
<i>B. melitensis</i> <i>Bm</i> 16M biovar 1	Cette souche a été prélevée sur le terrain en 1955. Des mutants spontanés résistant à l'acide nalidixique ont été sélectionnés au laboratoire.	MacMillan (Central Veterinary Laboratory, UK)
<i>B.melitensis biovar abortus</i> <i>B. abortus</i> 2308	Souche sauvage virulente. Des mutants spontanés résistant à l'acide nalidixique ont été sélectionnés au laboratoire.	(Sangari, 1991)
Souche de levure		
BF264-15Dau	<i>MATa ade1his2 leu2 trp1 ura3</i>	Prof. John C. Reed, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, CA, USA
Plasmides		
pDONR-201	Vecteur donneur Kan ^R du système Gateway TM .	Invitrogen
pGEMT-Easy	Vecteur de clonage Amp ^R possédant des extrémités T cohésives.	Promega
pSKoriT-kan	Vecteur dérivé du pBluescript auquel a été ajouté une <i>oriT</i> et un gène de résistance à la kanamycine.	Dérivé du pBluescript SK (Stratagene)
pYES-DEST52	Vecteur de destination conçu pour le clonage Gateway TM . Il porte le promoteur <i>GAL1</i> permettant une expression régulée en levure des ORFs clonées, le marqueur de sélection <i>URA3</i> et le gène de résistance à l'ampicilline <i>bla</i> .	Invitrogen
pV1899	Vecteur de destination Amp ^R conçu pour le clonage Gateway TM . Vecteur de transfection (promoteur CMV) qui permet la production de la protéine d'intérêt fusionnée avec un tag 3flag en N-term.	Jean-Claude Twizere (Cellular and Molecular Biology Unit, FUSAGx)
pV1900	Vecteur de destination Amp ^R conçu pour le clonage Gateway TM . Vecteur de transfection (promoteur CMV) qui permet la production de la protéine d'intérêt fusionnée avec un tag 3flag en C-term.	Jean-Claude Twizere (Cellular and Molecular Biology Unit, FUSAGx)
pET16b	Vecteur de surexpression Amp ^R qui porte un tag 6his.	Novagen

3. Milieu défini érythritol 2 g/L, source d'azote 0,1 g/L : Ery Sn*
4. Milieu défini érythritol 0,5 g/L, source d'azote 0,5 g/L : Ery*Sn
5. Milieu défini glutamate 2 g/L (Glu), source d'azote 0,5 g/L : GluSn
6. Milieu défini glutamate 2 g/L : Glu
7. Milieu défini glutamate 0,5 g/L (Glu*), source d'azote 0,5 g/L : Glu*Sn
8. Milieu défini glutamate 0,5 g/L : Glu*

1.2. Milieux de culture pour les cellules eucaryotes

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Référence du milieu
Cellules BHK-21	Glasgow MEM 1x BH-K21 (GMEM) + 10% tryptose phosphate 29,5 g/L + 1% glutamine 200 mM + 5% Foetal Calf Serum	Gibco, Invitrogen
Cellules HeLa	RPMI 1640 (1x) + 1% glutamine 200 mM + 1% sodium pyruvate + Serum Bovine Foetal	Gibco, Invitrogen

1.3. Milieux de culture pour les levures

1.3.1. Milieux synthétiques complets (Sc) (milieux sélectifs)

Milieu Sc glucose 2% -U -L -W -H	Concentration
Glucose 2%	20 g/L
Yeast Nitrogen Base (YNB) sans acides aminés	10 g/L
Agar si requis	6,75 g/L
Mélange poudré d'acides aminés	1,3 g/L

Milieu Sc galactose 2% raffinose 1% -U -L -W -H	Concentration
Galactose 2%	20 g/L
Raffinose 1%	10 g/L
Yeast Nitrogen Base (YNB) sans acides aminés	10 g/L
Agar si requis	6,75 g/L
Mélange poudré d'acides aminés	1,3 g/L

Pour préparer un milieu synthétique complet :

1. Peser le YNB sans acides aminés et le mélange poudré d'acides aminés puis porter à 80% du volume final avec de l'eau désionisée et mettre à pH 5,6.
2. Ajouter l'agar et le(s) sucre(s) puis compléter au volume final avec de l'eau désionisée et ensuite autoclaver.
3. Après autoclave, ajouter au milieu le(s) acide(s) aminé(s) (8 g/L) requis en fonction de la sélection souhaitée.

pJQ200UC1	Vecteur suicide chez <i>Brucella</i> permettant le remplacement allélique.	(Quandt and Hynes, 1993)
-----------	--	--------------------------

Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées.

Lignées cellulaires	Caractéristiques	Références ou sources
BHK-21	Les BHK-21 sont des cellules de type fibroblastique dérivées de cellules rénales d'un jeune hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>).	Baby hamster kidney cells, clone 13, ECACC 85011433
HeLa	Les cellules HeLa proviennent d'une lignée humaine de cellules cancéreuses de type épithélial issues d'un adénocarcinome du col de l'utérus (Henrietta Lacks, femme de 31 ans).	

Tableau 6 : Préparation des stocks d'antibiotiques.

Nom et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock (1000x)	Concentration à l'utilisation
Acide nalidixique (Nal)	NaOH 0,2 N	25 mg/ml	25 µg/ml
Ampicilline (Amp)	dH ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphénicol (Cm)	éthanol absolu	20 mg/ml	20 µg/ml
Gentamicine (Gm)	dH ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycine (Kan)	dH ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml

Stériliser au moyen d'un filtre 0,22 µm (Millipore) avant d'aliqoter.

Tableau 7 : Composition des tampons et des solutions.

Tampons/solutions	Composants	Quantité
Tampon PBS 20X	Na ₂ HPO ₄	22,98 g/L
	KCl	4 g/L
	NaCl	160 g/L
	KH ₂ PO ₄	4 g/L
Tampon TAE 50X	Tris HCl pH 8	40 mM
	EDTA	50 mM
	Acide acétique glacial	57,1 mL
CaCl ₂ 60mM	CaCl ₂	8,82 g
Tampon ECL	ECL buffer	10 ml
	H ₂ O ₂ 30%	3 µl
	Acide coumarique	25 µl
	Solution luminol	50 µl
ECL Buffer	Tris 100 mM pH 8,5	12,2 g
	Eau désionisée	qsp 1L
Acide coumarique	Acide coumarique	0,148 g
Solution luminol	Diméthyl sulfoxyde	qsp 10 ml
	3-Aminophtaldiazide	0,886 g
	Diméthyl sulfoxyde	qsp 20 ml

Remarque : Préparation des solutions concentrées d'acides aminés : Histidine-HCl (100 mM), Uracile (20 mM), Tryptophane (40 mM, filtre 1,22 µm Millipore, conserver à 4°C et à l'abri de la lumière) et Leucine (100 mM).

1.3.2. Préparation du mélange poudré d'acides aminés

Le mélange poudré d'acides aminés contient 6 g de chacun des acides aminés suivants : alanine, arginine, acide asparatique, asparagine, cystéine, acide glutamique, glutamine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine. Ce mélange contient également 6 g d'adénine sulfate.

1.3.3. Milieu Yeast Extract bacto-Peptone D-glucose (YEPD) (milieu riche)

Milieu YEPD	Concentration
D-glucose 2%	20 g/L
Yeast Extract	10 g/L
Bacto-peptone	20 g/L
Agar si requis	20 g/L

2. Techniques relatives à l'ADN

2.1. Extraction d'ADN plasmidique « Miniprep »

Principe

Cette technique permet d'isoler et de purifier l'ADN plasmidique à partir de bactéries. La préparation d'ADN plasmidique se déroule en 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.

Mode opératoire

1. Inoculer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotique) avec une colonie puis incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous agitation.
2. Centrifuger 1,5 ml de la culture liquide dans un tube à 12500 rpm pendant 5' puis éliminer le surnageant. Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de tampon P1 (à 4°C) (**tableau 8**) et ensuite ajouter 300 µl de tampon P2 pour lyser les bactéries, mélanger par inversions et incuber 5' maximum à température ambiante.
3. Ajouter 300 µl de tampon P3, mélanger par inversion et incuber 10' sur glace.
4. Centrifuger 15' à 4°C à 12500 rpm et ensuite récupérer le surnageant.
5. Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol, vortexer puis centrifuger 15' à 4°C à 12500 rpm et ensuite éliminer le surnageant.
6. Ajouter 300 µl d'éthanol 70% froid puis centrifuger 5' à 4°C à 12500 rpm. Ensuite, éliminer prudemment le surnageant.
7. Sécher le culot puis resuspendre dans 20 µl d'eau désionisée.

2.2. Dosage au nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Isogen Life Science)

Principe

Le nanodrop est un spectrophotomètre qui permet de mesurer de manière précise et reproductible en 10 secondes la quantité d'ADN dans des échantillons.

Mode opératoire

Déposer 1 µl d'ADN sur le capteur de l'appareil afin d'obtenir la quantité d'ADN en ng/µl.

Tampon de lyse	Tris KCl EDTA Triton X-100 « Complet e » (Roche) (= inhibiteur de protéase) « Phosstop » (Roche) (= inhibiteur de phosphatase)	20 mM 150 mM 1 mM 1% 1/25 1/25
Rouge Ponceau	Rouge Ponceau Acide acétique Eau désionisée	0,5 g 1 ml qsp 100 ml
Gel de séparation (running gel) (15 ml) 12 % SDS PAGE	H ₂ O Acrylamide 38,5% 1,5 M Tris pH 8,8 10 % SDS 10 % APS TEMED	6,2 ml 4,7 ml 3,8 ml 0,15 ml 0,15 ml 0,012 ml
Gel de concentration (Stacking gel) (5 ml)	H ₂ O Acrylamide 38,5% 0,5 M Tris pH 6,8 10 % SDS 10 % APS TEMED	3,0 ml 0,65 ml 1,3 ml 0,05 ml 0,05 ml 0,005 ml
Laemmli buffer 2X	SDS Glycérol 2-mercaptoéthanol Bleu de bromophenol Tris HCL	4% 20% 10% 0,004% 0,125M

Tableau 8 : Composition des tampons P1, P2 et P3 utilisé pour l'extraction d'ADN plasmidique.

P1	P2	P3
RNAse A 100 µg/ml TrisHCl 50 mM EDTA 80 mM pH 8,0 et conserver à 4°C	NaOH 200 mM SDS 1 %	KAc 3,0 mM pH 5,5 après ajout d'acide acétique Conserver à 4°C

2.3. Restriction d'ADN

Principe

La restriction enzymatique peut être utilisée comme un outil diagnostique ou de clonage. Ces enzymes de restriction peuvent reconnaître un site spécifique qu'elles vont cliver en générant soit des extrémités franches (« blunt ») soit des extrémités protrudantes.

Mode opératoire

1. Maximum 5µl de minipréparation d'ADN plasmidique.
2. Ajouter 1 µl de tampon 10x (en fonction des enzymes).
3. Quantité d'enzyme à calculer en fonction de la formule suivante :

$$Q \text{ (unités)} = (48,5/tp) \cdot qp \cdot (np/n\lambda)$$

Si 1 unité d'enzyme = quantité pour hydrolyser 1 µg d'ADN du phage λ

tp : taille du plasmide en kb

qp : quantité du plasmide à restreindre (µg)

np : nombre de sites de restriction de l'enzyme dans le plasmide

nλ : nombre de sites de restriction de l'enzyme dans le génome du phage lambda

4. Amener au volume final de 10 µl avec de l'eau désionisée puis incubé le mélange pendant 1 à 2h à une température optimale pour l'activité enzymatique.
5. Déposer et faire migrer dans un gel d'agarose (1) 10 µl de la restriction + 1 µl de tampon de chargement 6x et (2) un contrôle non restreint contenant le même volume de plasmide que ce qui a été introduit dans la restriction + 1 µl de tampon de chargement 6x + eau désionisée pour obtenir un volume final de 10 µl.

2.4. Réaction de ligation

Principe

La ligation consiste à liquer des produits de restriction ou fragment d'ADN qui possèdent des extrémités compatibles pour par exemple cloner un insert d'intérêt dans un plasmide voulu. Pour ce faire, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4 qui permet la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Cette enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺ pour son activité.

Mode opératoire

- 2 µl de T4 DNA ligase buffer 5x (Invitrogen).
- 1 µl de T4 DNA ligase (Invitrogen).
- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/3 pour un clonage non directionnel et 1/1 pour un clonage directionnel.
- Compléter avec de l'eau désionisée jusqu'à un volume de 10 µl et incubé toute la nuit à 16°C.

2.5. Amplification par PCR

Principe

La réaction en chaîne par polymérase est une méthode d'amplification qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. Les limites des fragments à amplifier sont reconnues par deux amorces complémentaires à ces régions. L'hybridation des amorces se réalise après dénaturation de la structure double brin par chauffage à haute température. Les deux amorces sont alors allongées sous l'action d'une ADN polymérase active à température élevée. Cette réaction, effectuée dans un thermocycler, est répétée 20 à 40 fois, selon un programme définissant la durée et la température de chaque étape. Les conditions expérimentales de ces étapes sont déterminées par la séquence du

fragment d'ADN à amplifier (%GC) et du couple d'amorces choisi (**tableau 9**). La température d'hybridation (T_m) se calcule généralement de la façon suivante : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ (4°C sont comptabilisés pour les bases G et C tandis que 2°C sont comptabilisés pour les bases A et T des amorces).

Mode opératoire

- 10 µl de tampon 5x correspondant à l'enzyme.
- 4 µl de mix de dNTPs (5 mM chacun).
- 0,5 µl de primer forward (20 mM).
- 0,5 µl de primer reverse (20 mM).
- 0,5 µl de polymérase.
- Matrice (1-10 ng).
- Porter à 50 µl avec de l'eau désionisée.

Programme PCR

1. Dénaturation : 4 minutes à 95°C.
2. Amplification 25-30 cycles de 3 étapes :
 - a. Dénaturation : 30 secondes à 95°C.
 - b. Hybridation : 30 secondes à $T_m - 2$ à 5°C.
 - c. Elongation : 1'/kb à 72°C (change en fonction de l'enzyme).
3. Elongation finale : 10' à 72°C.

2.6. Purification de produit PCR (MSB spin PCRapace, Invitex)

Principe

Ce kit permet de purifier des produits PCR et des fragments d'ADN de leur mélange de réaction enzymatique. Cette technique se réalise en deux étapes qui consistent à lier l'ADN à la colonne puis à l'éluer.

Mode opératoire

1. Pour les produits PCR allant jusqu'à 50 µl, ajouter 250 µl de Binding Buffer au produit PCR puis vortexer.
2. Transférer l'échantillon complet sur une colonne *Spin Filter* dans un tube de 2 ml et centrifuger 3' à 12000 rpm.
3. Placer le *Spin Filter* dans un nouveau tube de 1,5 ml et ajouter au moins 10 µl d'eau désionisée directement au centre de la colonne.
4. Incuber 1' à température ambiante puis centrifuger 1' à 10000 rpm.

2.7. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN (chargés négativement) en fonction de leur taille (plus la taille des fragments est petite, plus ils migreront rapidement dans le gel sous l'effet du champ électrique). Leur taille est estimée par comparaison au profil de migration de fragments d'ADN de tailles connues (marqueurs de taille). Les fragments sont visualisés grâce au bromure d'éthidium, qui se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est ainsi visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment d'intérêt par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Tableau 9 : Liste des primers utilisés lors de ce mémoire. En gras : portions de la séquence qui sont complémentaires l'une de l'autre ; en souligné : site de restriction enzymatique (GAATTC pour *EcoRI* et AGATCT pour *BglII*).

Primer	Sequence
<i>patB-A</i>	5'-TGAAACCTTCCTGTGTCAGGAC -3'
<i>patB-B</i>	5'-GGAATTCTGCAGATCTTCAGATTTATGCATTTTGGCGTAAG -3'
<i>patB-C</i>	5'-GAAGATCTGCAGAATTCCTGGCAACCAAGTAGAGCGGG -3'
<i>patB-D</i>	5'-GGCCCAAGATTTTTCAGGTTC-3'
<i>patC-A</i>	5'-GTCGCCGTCATGATGGAG-3'
<i>patC-B</i>	5'-GGAATTCTGCAGATCTTCTCGAAGCACCACGTTGGACAC-3'
<i>patC-C</i>	5'-GAAGATCTGCAGAATTCCTGTGATGGGGTGACTCGGCCCG-3'
<i>patC-D</i>	5'-CCAGTGTGGGTTCTGAGG-3'
1035AM	5'-GCAAGTTTGCCGAAGTGCTT-3'
1035AV	5'-GCGGTGAATTCGTTTTCGTT-3'
<i>patA-5'</i>	5'-GCCTCGAGGATAAGGCCCTGTTCG-3'
<i>patA-3'</i>	5'-GCGGATCCTCAAAGATCAGGCAA-3'
<i>patAt-3'</i>	5'-GCGGATCCTCATCCCACCACATCGA-3'

Méthode

Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 0,8 g d'agarose (Molecular Biology Grade) dans 80 ml de tampon TAE 1X.

Porter à ébullition. Quand la solution est tiède, couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter le bromure d'éthidium (0,1 µg / ml) avant la polymérisation du gel.

1. Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1 X.
2. Déposer les échantillons additionnés de 1/10^{ème} de tampon de chargement 10X dans les puits.
3. La différence de potentiel appliquée est d'environ 100 V, l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive. Ensuite, visualiser l'ADN sous UV.

Marqueurs de tailles pour gel d'agarose

En parallèle des échantillons, on fait migrer 5 µl de marqueur de poids moléculaire (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) afin d'évaluer la taille du ou des fragments présents dans les échantillons (**figure 25**).

2.8. Extraction d'ADN d'un gel agarose (PurExtrem Kit, Fermentas)**Principe**

Le kit qui permet l'extraction d'ADN d'un gel d'agarose est basé sur la solubilisation du gel d'agarose et sur l'adsorption sélective des acides nucléiques qui sont séparés spécifiquement à l'aide de billes de silice. Ces billes de silice liées à l'ADN sont lavées pour éliminer les contaminants. L'ADN purifié peut ensuite être élué avec de l'eau stérile ou un tampon.

Mode opératoire

1. Découper le fragment d'intérêt sous UV à l'aide d'un scalpel.
2. Peser le morceau d'agar et ajouter 3 volumes de Binding solution pour un volume de gel.
3. Incuber 5' à 55°C pour dissoudre l'agarose puis vortexer la solution de silice du kit pour bien resuspendre les billes de silice.
4. Ajouter 5 µl de cette solution de silice pour 2,5 µg d'ADN et vortexer.
5. Incuber 5' à 55°C et vortexer après 2 minutes d'incubation.
6. Centrifuger 5'' à 12000 rpm, retirer le surnageant puis ajouter au culot 500 µl de solution de lavage (Ice cold wash buffer) et resuspendre au vortex.
7. Centrifuger 5'' à 12000 rpm, répéter 3 fois l'opération puis sécher 10 à 15'.
8. Eluer l'ADN dans 10 µl d'eau désionisée, incuber à 55°C pendant 5' et centrifuger 2' à 12000 rpm.
9. Récupérer 8 µl de surnageant dans un nouveau tube en évitant le culot puis répéter l'élué de l'ADN dans 8 µl d'eau désionisée.

2.9. Clonage Gateway™**Principe**

Le système de clonage Gateway™ est basé sur un processus de recombinaison du phage λ dans le génome d'*E. coli*. Cette méthode permet la recombinaison directionnelle d'un produit PCR, portant le gène d'intérêt et les sites *attB* flanquant celui-ci (ajoutés sur les amorces PCR), et d'un vecteur donneur portant les sites *attP*, par une réaction de recombinaison dite « BP ». Cette première réaction donne un vecteur d'entrée qui sert de matrice à une seconde réaction de recombinaison dite « LR », avec un vecteur de destination portant les sites *attR*, pour donner finalement un vecteur d'expression, sur lequel les sites *attP* sont reconstitués et

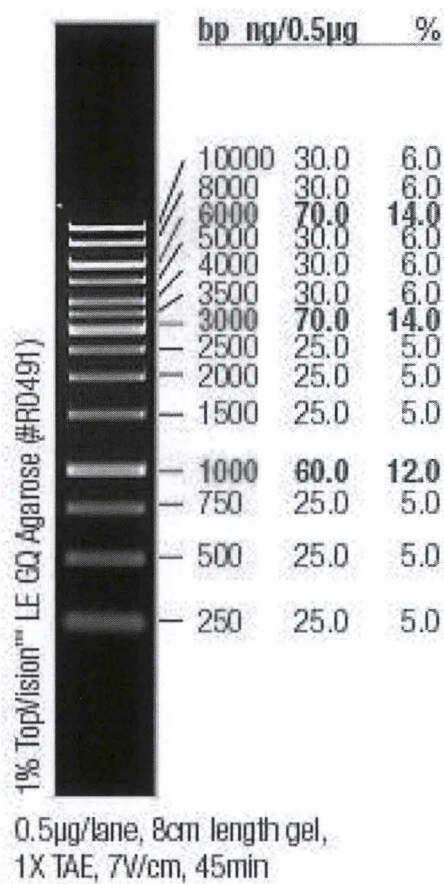


Figure 25 : Marqueur de taille moléculaire utilisé pour les gels d'agarose : « GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ».

Reproduit de <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm#100bp>

flanquent l'ORF d'intérêt. La sélection des recombinants se base d'une part sur une sélection par antibiotique et d'autre part sur la contre-sélection des vecteurs portant une cassette « toxique » avec laquelle l'ORF est échangée (**figure 26**).

L'ORFéome de *B. melitensis* est disponible au laboratoire. L'entièreté des ORFs prédites de *B. melitensis* est en effet clonée dans le pDONR-201 (vecteur donneur), qui après réaction LR avec un vecteur de destination permettra l'obtention d'un vecteur d'expression portant l'ORF d'intérêt. L'ORFéome de *B. melitensis* nous permet donc le clonage en une étape de n'importe quelle ORF dans divers vecteurs d'expression, et par conséquent de nombreux types d'expérimentations.

Mode opératoire

Réaction LR

- 150 ng de minipréparation de pDONR201-ORF.
- 150 ng de vecteur de destination.
- 1 µl de LR clonase.
- 2 µl de tampon 5x.
- Volume à compléter à 10 µl avec de l'eau désionisée.
- Transformation dans *E. coli* DH10B et sélection avec antibiotique approprié.

3. Techniques relatives aux protéines

3.1. Préparation d'extraits cellulaires

- Rincer les cellules sur glace au PBS froid puis racler dans 200 µl/T25 de tampon de lyse (volumes adaptés pour les divers contenants) et déposer 15' sur glace.
- Centrifuger 15' à 13000 rpm, récupérer le surnageant et ajouter un tampon de charge 2x puis mettre les tubes 5' à 100°C.
- Congeler les échantillons à -20°C ou utiliser.

3.2. Analyse par Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine parmi d'autres. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la reconnaissance spécifique par 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 12%).
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.

3.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le principe de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (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. Les chaînes de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par du TEMED (tétraméthylidamide). Suivant le pourcentage d'acrylamide choisi, on peut adapter la taille des pores du gel à la taille des protéines à séparer.

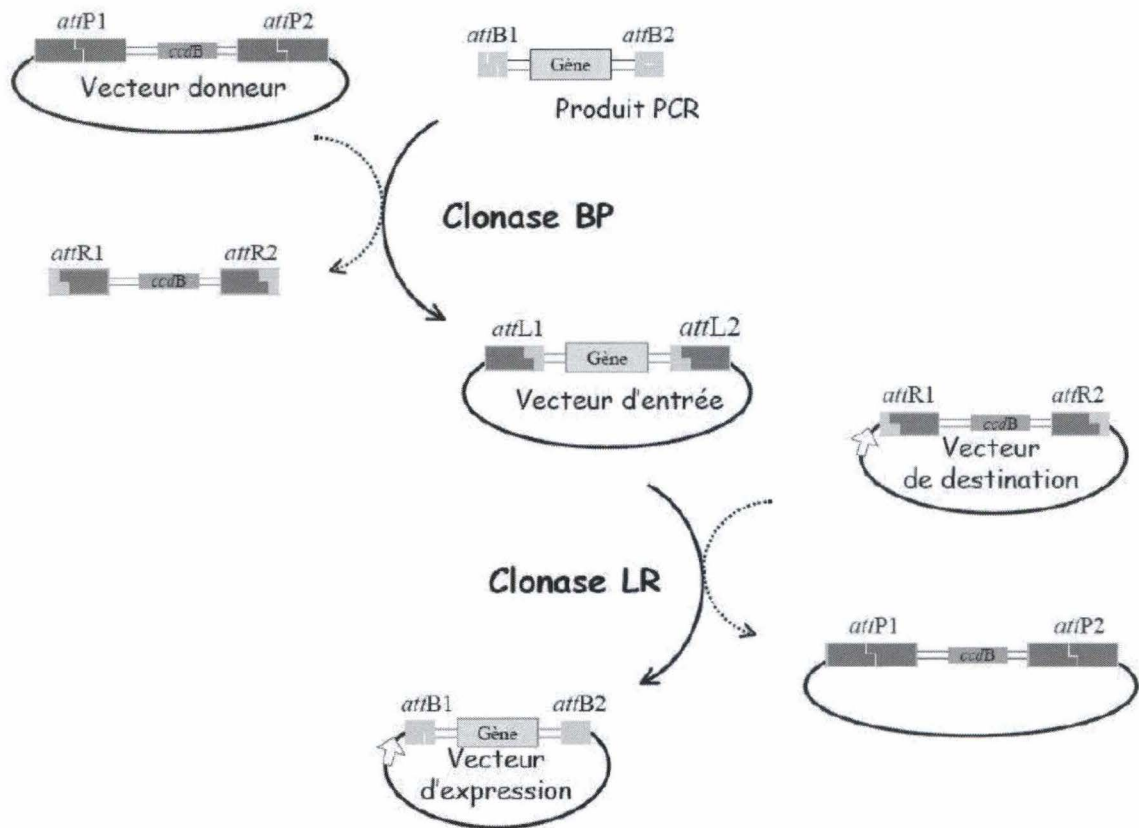


Figure 26: Représentation schématique du système Gateway™.

La séquence d'intérêt sera amplifiée avec des amorces portant à leurs extrémités 5' les sites *attB1* et *attB2*. Ces sites recombinent avec les sites *attP* d'un vecteur donneur lors d'une réaction de recombinaison dite « BP » médiée par la clonase « BP ». Une deuxième recombinaison dite « LR » aura lieu entre les sites *attL* sur le vecteur d'entrée et les sites *attR* sur le vecteur de destination, donnant un vecteur d'expression portant la séquence d'intérêt. Pour permettre le clonage et la sélection des clones d'entrée et d'expression, les vecteurs utilisés possèdent des sites *att* bordant une cassette portant : (1) le gène *ccdB* pour une sélection négative et (2) le gène de résistance au chloramphénicol (Cm^R) pour une contre sélection des non-recombinants. Lors de la réaction BP ou LR, cette cassette sera remplacée par la séquence d'intérêt pour donner, respectivement, un vecteur d'entrée ou un vecteur d'expression. Ainsi, seules survivent les bactéries « *ccdB* sensibles » qui ont été transformées et pour lesquelles la recombinaison a eu lieu.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à séparer permet la rupture des ponts disulfures, formant des chaînes polypeptidiques complètement dénaturées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stœchiométriquement 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. 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 qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation et le running gel qui permet la séparation des échantillons.

3.2.2. Préparation et chargement des échantillons

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. Ensuite, les échantillons sont bouillis 10' avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines. Enfin, les échantillons sont chargés sur le gel ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Low Range, Biorad). Ce dernier nous permettra de déterminer la taille des protéines détectées.

3.2.3. Migration

L'appareil est fixé sur 30 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel.

3.2.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-sec. 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.
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 doit varier entre 10 V et 14 V.
5. La durée du transfert varie quant à elle entre 30' et 2h, 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).

3.2.5. 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 la protéine d'intérêt.

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

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. La membrane est lavée 3x 10' avec du PBS-Tween 0,05%.

B) Incubation avec l'anticorps primaire : La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS-lait 1% contenant l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt à la dilution adéquate (M2 anti-flag 1/5000 (Roche), dans PBS-lait 1%), pendant 1 h sous agitation. La solution contenant les anticorps est conservée à -20°C. La membrane est lavée trois fois 10' avec du PBS-Tween 0,05%.

C) Incubation avec l'anticorps secondaire : L'anticorps secondaire (Polyclonal Goat anti-mouse-HRP 1/5000 (Dakocytomation), dans PBS-lait 1%) 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. La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par le fabricant dans du PBS-lait 1% sous agitation pendant 1 h puis elle est lavée 3x 10' avec du PBS-Tween 0,05%.

D) Révélation

1. La membrane est mise en présence du tampon ECL maison et incubée durant 1'.
2. La solution de détection est éliminée et la membrane recouverte d'un film plastique puis placée dans une cassette de révélation. Un film autoradiographique est alors exposé pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal obtenu.
3. Les bandes d'intérêt sont révélées par un bain de révélateur (Kodak): le film est plongé dans la cuve pendant quelques minutes.
4. Le film est placé 10'' dans le fixateur, puis rincer abondamment à l'eau de ville et séché.

4. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

4.1. Préparation de cellules CaCl₂ compétentes

Principe

Pour transformer les bactéries, il est nécessaire de les rendre compétentes afin de faciliter l'entrée de l'ADN. Pour la transformation bactérienne par choc thermique, la paroi bactérienne sont rendues perméables à l'ADN grâce à des passages dans une solution hypotonique de chlorure de calcium.

Mode opératoire

J-2 : - Réveiller la souche d'*E. coli* sur LB solide.

J-1 : - A partir d'une colonie de la souche *E.coli*, inoculer 4 ml de milieu LB. Incuber une nuit à 37°C sous forte agitation.

J :

- Transférer la préculture dans un erlen de 2 l contenant 400 ml de LB à 37°C.
- Incuber à 37°C jusqu'à obtention d'une D.O. à 590 nm de 0,375. Répartir la culture dans deux biberons de 200 ml et placer 10' sur glace.
- Centrifuger 7' à 3000 rpm et à 4°C.
- Resuspendre chaque culot dans 40 ml d'une solution de CaCl₂ 60 mM stérile et froide et transférer dans 2 Falcon de 50 ml.
- Centrifuger 5' à 2500 rpm et à 4°C.
- Resuspendre chaque culot dans 10 ml d'une solution de CaCl₂ 60 mM stérile et froide et laisser 30' sur glace.

- Centrifuger 5' à 2500 rpm et à 4°C.
- Resuspendre chaque culot dans 1 ml d'une solution de CaCl₂ 60 mM-15% de glycérol, regrouper les cellules dans un Falcon et échantillonner par 50 µl puis stocker à -80°C.

4.2. Transformation bactérienne par choc thermique

Principe

La transformation bactérienne par choc thermique est une technique basée sur une désorganisation de la paroi qui permet ainsi le passage de l'ADN suite à un changement brutal de température de 0°C à 42°C.

Mode opératoire

1. Dégeler les cellules chémo-compétentes (DH10B) sur glace. Ajouter 1 µl de plasmide ou 5 µl de produit LR aux 50 µl de cellules et resuspendre (veiller à ne pas dépasser 1/10^{ème} du volume de cellules pour la quantité de plasmide). Laisser 30' sur glace.
2. Procéder au choc thermique, en mettant les tubes dans le bain à 42°C 1' puis 2' sur glace. Ajouter 950 µl du milieu LB et placer les cellules à 37°C durant 30' avec agitation.
3. Centrifuger 10' à 2000 rpm. Reprendre 900 µl du surnageant, resuspendre dans les 100 µl restant et étaler sur milieu LB avec l'antibiotique de sélection.

4.3. Conjugaison bactérienne

Principe

La conjugaison est une méthode non sexuée utilisée par les bactéries pour s'échanger des informations génétiques. Elle consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Mode opératoire

1. Pipeter 1 ml de culture *Brucella spp.* en phase stationnaire de déposer la culture dans un tube eppendorf.
2. Ajouter 50 µl d'*E. coli* de la souche S17-1 contenant le plasmide d'intérêt dans le tube eppendorf.
3. Centrifuger les tubes 2' à 7000 rpm puis aspirer l'excès de milieu en faisant attention à ne pas détacher le culot.
4. Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu 2YT et centrifuger les tubes 2' à 7000 rpm.
5. Aspirer l'excès de milieu en laissant une petite quantité juste au dessus du culot, y resuspendre celui-ci et déposer sur une petite boîte de pétri 2YT sous forme de goutte.
6. Incuber toute la nuit à température ambiante.
7. Après incubation, utiliser une anse stérile pour strier la conjugaison sur un milieu sélectif.
8. Incuber les boîtes de pétri 3 à 4 jours à 37°C puis strier de nouveau une colonie isolée pour vérifier les clones.

5. Techniques relatives à l'utilisation de cellules mammifères

5.1. Préparation de cellules eucaryotes mammifères pour la transfection

Éliminer le milieu de la boîte et rincer au PBS froid.

1. Ajouter 3 ml de PBS-trypsine par boîte, laisser 5' à 37°C.
2. Récupérer les cellules avec 10 ml de milieu.
3. Centrifuger 5' à 1000 rpm puis vider le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de milieu.
4. Effectuer un comptage à l'aide d'une cellule de Thoma (cellules de comptage) de manière à estimer la concentration de cellules/ml de milieu.
5. Resuspendre les cellules à concentration désirée et ensemercer dans une boîte.

5.2. Transfection transitoire de cellules eucaryotes

L'agent de transfection FuGENE HD (Roche) est utilisé dans un ratio 5:2 (µl agent transfection/µg ADN) afin de réaliser la transfection de cellules eucaryotes avec le plasmide d'intérêt. Le protocole suivi est celui du fabriquant.

1. Préparer un tube par plasmide et mettre le volume d'ADN requis pour le nombre de puits concernés.
2. Ajouter du milieu sans sérum pour atteindre le volume de complexe requis pour les puits concernés.
3. Ajouter le FuGENE HD dans chaque tube.
4. Vortexer 2x pendant 1'' puis laisser 15' à RT.
5. Dispatcher le complexe sous la surface du milieu de chaque puits et agiter quelques fois la plaque pour mélanger.

5.3. Kit de détection de cytotoxicité en mesurant la libération de LDH (Roche)

Principe

Ce kit de détection de cytotoxicité est un test colorimétrique qui permet de quantifier les cellules mortes et les cellules lysées en mesurant la libération de lactate déshydrogénase (LDH). Ce test se réalise en plaque 96-puits et il nécessite la présence de 3 contrôles (1) high control (qui détermine l'activité maximale de libération du LDH dans les cellules), (2) background control (qui détermine l'activité de libération du LDH dans le milieu) et (3) low control (qui détermine l'activité minimale de libération du LDH dans les cellules) afin de pouvoir calculer le pourcentage de cytotoxicité.

Mode opératoire

1. Ajouter 5 µl de tampon de lyse dans les 3 puits de high control puis incubé 15' en agitant la plaque.
2. Ajouter 100 µl/puits de mix de réaction fraîchement préparé (voir protocole du fabriquant) à chaque puits et incubé 30' à + 20°C à l'obscurité
3. Ajouter 50 µl de solution stop puis agiter pendant 10' et mesurer l'absorbance à 492nm. Calculer ensuite le pourcentage de toxicité pour chaque échantillon.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

5.4. Infection de cellules HeLa par *Brucella melitensis* 16 M et $\Delta patA$

J-1 : - Mettre les cellules HeLa en plaques 24-puits (10^5 cellules/puits).

- Lancer les cultures liquides de *Brucella melitensis* 16M et 16M $\Delta patA$.

J : - Mettre les cultures à une DO de 1 afin de déposer $300 \cdot 10^5$ bactéries/puits. (DO1= $3 \cdot 10^9$ bactéries/ml).

- Déposer 500 μ l par puits de la dilution des bactéries, centrifuger 10' à 12 000 rpm puis incubé 1H à 37°C, 5% CO₂.

- Enlever le milieu des cellules et rajouter du milieu additionné de la gentamycine (50 μ g/ml) afin de tuer les bactéries extracellulaires.

- Etaler sur boîte l'inoculum.

- 2H, 6H, 24H, 48H post-infection : Rincer 2 fois les cellules avec 500 μ l PBS puis lyser avec 200 μ l de PBS-triton (0,1%) et ensuite étaler 100 μ l sur boîte.

- Comptage des CFU pour estimer la réplication bactérienne.

6. Transformation de levures

1. Lancer une préculture en Falcon dans 10 ml de YPD. Laisser incubé toute la nuit à 30°C.

2. Lancer la culture dans 50 ml de YPD en diluant la préculture pour obtenir une DO de 0,1. Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO comprise entre 0,5 et 0,6.

3. Effectuer 2 lavages à l'eau stérile avec 1/10^{ième} du volume de culture puis effectuer 1 lavage au TE (1x)/LiAc (1x) avec 1/10^{ième} du volume de culture. Le mélange TE/LiAc doit être préparé extemporanément.

4. Resuspendre le culot dans du TE/LiAc et concentrer les cellules 200x.

Remarque : Toutes les centrifugations pour les lavages se font à température ambiante pendant 8' à 4000 rpm.

5. Par transformation :

- 1 μ g d'ADN.

- 10 μ g/L d'ADN carrier (sperme de saumon) préalablement dénaturé pendant 5' dans de l'eau bouillante et déposé sur glace.

- 50 μ l de levures (en solution dans le TE-LiAc).

- 300 μ l PEG4000 40%/TE/LiAc (préparé extemporanément).

6. Homogénéiser et incubé pendant 30' à 30°C puis incubé 15' à 42°C.

7. Centrifuger 5' à 4000 rpm puis resuspendre le culot dans 100 μ l d'eau stérile.

8. Etaler sur milieu sélectif avec des billes et placer à 30°C pendant 2 à 3 jours.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- Abu Kwaik Y (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 2022-2028.
- Ackermann Mr, Cheville Nf, Deyoe Bl (1988) Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol*, **25**, 28-35.
- Allewelt M, Coleman Ft, Grout M, Priebe Gp, Pier Gb (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun*, **68**, 3998-4004.
- Alonso A, Garcia-Del Portillo F (2004) Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol*, **7**, 181-191.
- Andrews Dl, Beames B, Summers Md, Park Wd (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J*, **252**, 199-206.
- Backert S, Meyer Tf (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 207-217.
- Banerji S, Aurass P, Flieger A (2008) The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int J Med Microbiol*, **298**, 169-181.
- Bhavsar Ap, Guttman Ja, Finlay Bb (2007) Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*, **449**, 827-834.
- Boschiroli Ml, Foulongne V, O'callaghan D (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 58-64.
- Boschiroli Ml, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V *et al.* (2002) The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 1544-1549.
- Brumell Jh, Grinstein S (2004) *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 78-84.
- Bukata L, Altabe S, De Mendoza D, Ugalde Ra, Comerci Dj (2008) Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, **190**, 8197-8203.
- Celli J, De Chastellier C, Franchini Dm, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel Jp (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, **198**, 545-556.
- Celli J, Gorvel Jp (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 93-97.
- Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol*, **157**, 93-98.
- Cianciotto Np (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, **291**, 331-343.
- Corbel Mj, Stuart Fa, Brewer Ra (1984) Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand*, **56**, 341-348.
- Cotes K, Bakala N'goma J C, Dhouib R, Douchet I, Maurin D, Carriere F, Canaan S (2008) Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **78**, 741-749.

- De Jong Mf, Sun Yh, Den Hartigh Ab, Van Dijnl Jm, Tsohis Rm (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system. *Mol Microbiol*.
- De Maria L, Vind J, Oxenboll Km, Svendsen A, Patkar S (2007) Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **74**, 290-300.
- Fields Bs (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol*, **4**, 286-290.
- Finck-Barbancon V, Frank Dw (2001) Multiple domains are required for the toxic activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *J Bacteriol*, **183**, 4330-4344.
- Galan Je (1996) Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **209**, 43-60.
- Ghannoum Ma (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 122-143, table of contents.
- Graler Mh, Huang Mc, Watson S, Goetzl Ej (2005) Immunological effects of transgenic constitutive expression of the type 1 sphingosine 1-phosphate receptor by mouse lymphocytes. *J Immunol*, **174**, 1997-2003.
- Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S, Liautard Jp, Dornand J (2000) In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun*, **68**, 342-351.
- Hirschberg Hj, Simons Jw, Dekker N, Egmond Mr (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem*, **268**, 5037-5044.
- Istivan Ts, Coloe Pj (2006) Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*, **152**, 1263-1274.
- Jaffe Ab, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 247-269.
- Jimenez De Bagues Mp, Terraza A, Gross A, Dornand J (2004) Different responses of macrophages to smooth and rough Brucella spp.: relationship to virulence. *Infect Immun*, **72**, 2429-2433.
- Jimenez De Bagues Mp, Dudal S, Dornand J, Gross A (2005) Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immunol*, **114**, 227-238.
- Kagan Jc, Roy Cr (2002) Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol*, **4**, 945-954.
- Lambeau G, Gelb Mh (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem*, **77**, 495-520.
- Lavigne Jp, Botella E, O'callaghan D (2006) [Type IV secretion system and their effectors: an update]. *Pathol Biol (Paris)*, **54**, 296-303.
- Ly Kt, Casanova Je (2007) Mechanisms of Salmonella entry into host cells. *Cell Microbiol*, **9**, 2103-2111.
- Mattoo S, Lee Ym, Dixon Je (2007) Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr Opin Immunol*, **19**, 392-401.
- Maurin G, Llewellyn Pl, Bell Rg (2005) Adsorption mechanism of carbon dioxide in faujasites: grand canonical monte carlo simulations and microcalorimetry measurements. *J Phys Chem B*, **109**, 16084-16091.
- Miller Vl, Mekalanos Jj (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol*, **170**, 2575-2583.
- Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I (2002) Brucella evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, **90**, 209-227.

- Naroeni A, Porte F (2002) Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun*, **70**, 1640-1644.
- Ninio S, Roy Cr (2007) Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol*, **15**, 372-380.
- Phillips Rm, Six Da, Dennis Ea, Ghosh P (2003) In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem*, **278**, 41326-41332.
- Porte F, Liautard Jp, Kohler S (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun*, **67**, 4041-4047.
- Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard Jp (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun*, **71**, 1481-1490.
- Quandt J, Hynes Mf (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, **127**, 15-21.
- Rabin Sd, Hauser Ar (2005) Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun*, **73**, 573-582.
- Rosahl S, Schell J, Willmitzer L (1987) Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity. *EMBO J*, **6**, 1155-1159.
- Robinson Cg, Roy Cr (2006) Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, **8**, 793-805.
- Saalmuller A (2006) New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol*, **117**, 32-38.
- Saier Mh, Jr. (2006) Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol*, **214**, 75-90.
- Sallstrom B, Andersson Sg (2005) Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 579-585.
- Sangari F, Aguero J (1991) Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog*, **11**, 443-446.
- Sato H, Frank Dw, Hillard Cj *et al.* (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J*, **22**, 2959-2969.
- Sato H, Frank Dw (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol*, **53**, 1279-1290.
- Schlumberger Mc, Hardt Wd (2006) Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 46-54.
- Senda K, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (1996) A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol*, **37**, 347-353.
- Segal G, Purcell M, Shuman Ha (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1669-1674.
- Shewry Pr (2003) Tuber storage proteins. *Ann Bot (Lond)*, **91**, 755-769.
- Shohdy N, Efe Ja, Emr Sd, Shuman Ha (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4866-4871.
- Siggers Ka, Lesser Cf (2008) The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host Microbe*, **4**, 8-15.
- Sitkiewicz I, Stockbauer Ke, Musser Jm (2007) Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol*, **15**, 63-69.

- Smith Ld, Ficht Ta (1990) Pathogenesis of Brucella. *Crit Rev Microbiol*, **17**, 209-230.
- Srinivas M, Rajakumari S, Narayana Y, Joshi B, Katoch Vm, Rajasekharan R, Balaji Kn (2008) Functional characterization of the phospholipase C activity of Rv3487c and its localization on the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *J Biosci*, **33**, 221-230.
- Starr T, Ng Tw, Wehrly Td, Knodler La, Celli J (2008) Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, **9**, 678-694.
- Strickland Ja, Orr Gl, Walsh Ta (1995) Inhibition of Diabrotica Larval Growth by Patatin, the Lipid Acyl Hydrolase from Potato Tubers. *Plant Physiol*, **109**, 667-674.
- Tilney Lg, Harb Os, Connelly Ps, Robinson Cg, Roy Cr (2001) How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci*, **114**, 4637-4650.
- Valdivia Rh (2004) Modeling the function of bacterial virulence factors in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot Cell*, **3**, 827-834.
- Vancanneyt G, Sonnewald U, Hofgen R, Willmitzer L (1989) Expression of a Patatin-like Protein in the Anthers of Potato and Sweet Pepper Flowers. *Plant Cell*, **1**, 533-540.
- Vanrheenen Sm, Luo Zq, O'connor T, Isberg Rr (2006) Members of a Legionella pneumophila family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect Immun*, **74**, 3597-3606.
- Vogel Jp, Andrews Hl, Wong Sk, Isberg Rr (1998) Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science*, **279**, 873-876.
- Vogel Jp, Isberg Rr (1999) Cell biology of Legionella pneumophila. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 30-34.
- Young Ej (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, **21**, 283-289; quiz 290.
- Zhou D, Galan J (2001) Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect*, **3**, 1293-1298.