



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation fonctionnelle des protéines à domaine TIR (Toll interleukine-1 receptor) chez *Brucella melitensis*

Gheldof, Céline

Award date:
2009

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**Caractérisation fonctionnelle des protéines à domaine TIR (*Toll interleukine-1
receptor*) chez *Brucella melitensis***

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

Céline GHELDOF

Août 2009

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

Caractérisation fonctionnelle des protéines à domaine TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) chez *Brucella melitensis*

GHELDOLF Céline

Résumé

Les bactéries intracellulaires pathogènes ont évolué avec leur hôte ce qui a permis l'établissement de stratégies détournant les processus cellulaires de celui-ci. Les mécanismes moléculaires de ces stratégies sont précis afin de cibler un des nombreux processus cellulaires et de le détourner à leur avantage. Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature ce qui permet une meilleure compréhension de la pathogénie de ces bactéries.

Lors d'une infection bactérienne chez l'Homme, différents récepteurs tels que les TLRs (*Toll like receptors*) permettent l'activation du système immunitaire inné. Les TLRs sont composés d'un domaine TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) intracellulaire ainsi que des protéines adaptatrices intracellulaires. Ces domaines spécifiques interagissent entre eux pour activer les voies de signalisation et permettre une réponse adéquate de la cellule face aux pathogènes.

Suite à des études *in silico* sur le génome de *Brucella melitensis*, une bactérie intracellulaire causant la brucellose, deux protéines contenant un domaine TIR ont été découvertes. Ces protéines nommées Btp (*Brucella TIR protein*) sont décrites comme des protéines modulant la réponse immunitaire de l'hôte. Btp1 est en effet capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques en interférant avec la voie TLR2 (*Toll like receptor 2*).

Au cours de ce mémoire, une interaction entre un fragment de la protéine TAO2 α et la protéine Btp1 a été identifiée par un crible double hybride. L'interaction observée est dépendante du domaine coiled coil de TAO2 α et indépendante du domaine TIR de Btp. Dans le but de réaliser une confirmation de cette interaction, des vecteurs ont été formés afin de réaliser un GST pull down et une Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes.

Je voudrais remercier le Professeur Letesson de m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa patience et ses conseils au cours de mon mémoire.

Je tiens également à remercier mon tuteur pour toutes ses explications, sa patience et son aide pour la réalisation de ce mémoire.

Je remercie d'avance les membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Je remercie toutes les personnes qui font que l'URBM est un laboratoire agréable et convivial, en remerciant tout particulièrement Marie dB avec qui les conversations m'ont toujours permis d'aller de l'avant et évidemment les corrections qu'elle a accepté de faire.

Merci aux mémorants de l'URBM sans qui ce mémoire n'aurait pas eu le même sens : Céline (pour sa zen attitude et pour ces milliers de corrections bien utiles pour mon mémoire), Aurélie (pour les petits mots laissés lorsqu'on restait tard, les longues conversations, pour sa motivation contagieuse et les corrections apportées à ce mémoire), Mike (pour son sourire, ses chansons et sa bonne humeur quotidienne), Caroline (pour sa présence 'sans un gros mot' ;-), pour aussi tous les moments de longue rédaction toutes les deux aux fac's et encore beaucoup d'autres choses). Je remercie également tous les autres mémorants de notre année, pour les délires en soirée, les temps de midi passé ensemble, ...

Merci à Guillaume, à Pépite et à Sophie qui étaient toujours présents pour les soirées, les petits souper au kot de Sophie et autres. Sans vous ces années d'études n'aurait pas été aussi agréables.

J'ai également une pensée pour ma meilleure amie, Céline, avec qui je n'ai jamais eu besoin de tout expliquer pour arriver à se comprendre et également Mélissa qui m'a énormément écouté même si pour elle la bio est un peu loin et qui m'a toujours soutenue.

J'en profite pour remercier des personnes qui m'ont soutenu pendant toutes mes années d'études. Mes parents qui m'ont toujours écouté, soutenu, aidé à devenir ce que je suis. Mes frères avec qui je devais vraiment être chia... pendant les blocus, surtout Ludovic qui depuis la rhéto m'a donné le goût à la science en commençant par la correction de mon travail de fin d'études en rhéto, le petit coup de pouce en chimie organique en 1^o candi, et les longues conversations sur énormément de sujets. David qui m'a permis de m'apercevoir que sur la terre, la science n'est pas la préoccupation de tous (non aller tu m'a toujours soutenu dans tout ce que j'ai fait). Damien qui m'a permis de voir si je connaissais encore mes cours des années antérieurs pour que je lui explique, ... Chacun d'entre vous m'a aidé à devenir ce que je suis.

Et une personne qui me tient vraiment à cœur, c'est toi Raphaël qui a du subir mes blocus, mes longues années d'études et mes conversations de sciences. Merci d'avoir toujours été là pour moi depuis bien longtemps et j'espère que tu seras toujours à mes côtés.

MERCI A TOUS

Table des matières

Introduction	2
1. Le genre <i>Brucella</i>	2
1.1. Généralités	2
1.2. Pathogénie.....	2
2. L'adaptation à son mode de vie.....	2
3. Adaptation de bactéries à la vie intracellulaire	5
3.1. Modulation du cycle cellulaire	5
3.2. Modulation des voies d'apoptose	9
4. Manipulation des voies de signalisation pro-inflammatoire	12
4.1. Les PRRs cytoplasmiques	13
4.2. Les PRRs membranaires.....	14
4.3. Le détournement des voies de signalisation par des bactéries.....	14
Objectif du mémoire.....	17
Résultats	18
1. Recherche de partenaires protéiques eucaryotes d'interaction des Btp de <i>Brucella melitensis</i> 16M	18
1.1. Le principe du double hybride en levure	18
1.2. Le crible double hybride en levure d'une banque de protéines proies de foie humain par Btp1 et Btp2	20
2. La protéine 4-15, un faux positif intrigant	23
2.1. Comparaison de la protéine 4-15 et du candidat provenant du crible d'une banque d'ADNc de leucocyte humain	24
2.2. Détection de la protéine 4-15 par western blot.....	25
2.3. La protéine 4-15 n'interagit pas aspécifiquement avec les domaines TIR.....	25
3. Le fragment Cterm de TAO2 α fusionné en phase avec Gal4AD.....	26
3.1. Construction du vecteur permettant l'expression du fragment C-term de TAO2 α en phase avec Gal4AD.....	27
3.2. Détection des protéines TAO2 α Cterm fgmt et Btp des levures et test d'interaction entre elles.....	27
3.3. Tentative de coimmunoprécipitation de TAO2 α Cterm fgmt et Btp en levures	29
3.4. TAO2 α et ses différents domaines.....	33
4. Construction d'outils pour confirmer les interactions obtenues lors du crible double hybride.....	35
4.1. Confirmation de l'interaction TAO2-Btp 1 par GST pull-down	35
4.2. Confirmation de l'interaction TAO2 α -Btp par Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes	41
Discussions et perspectives	42
1. Discussion générale des résultats	42
2. Un partenaire d'interaction avec Btp1 _{TIR} pas comme les autres	43
2.1. Ce partenaire n'interagit pas avec les domaines TIR des TLRs.....	43
2.2. Tentative de vérification de l'interaction entre TAO2 α Cterm fgmt et Btp1 ...	44
2.3. Le fragment C-term de la protéine TAO2 α interagit avec Btp1 et Btp1 _{TIR}	44

3.	Une confirmation de l'interaction	44
3.1.	Le GST pull down	45
4.	Conclusion et perspectives	45
Matériels et méthodes.....		47
1.	Souches et plasmides.....	47
1.1.	Les souches de bactéries.....	47
1.2.	Les souches de levures.....	47
1.3.	Les plasmides.....	48
2.	Milieux, tampons et solution.....	49
2.1.	Milieux pour les levures	49
2.2.	Milieux pour les bactéries.....	51
3.	Techniques relatives à l'ADN	51
3.1.	Polymerase chain reaction (PCR).....	51
3.2.	Purification et concentration de produit PCR après une réaction PCR	52
3.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose	52
3.4.	Clonage Gateway TM	53
3.5.	Restriction enzymatique	53
3.6.	Ligation.....	54
4.	Techniques relatives à l'utilisation des levures.....	54
4.1.	Transformation de levures : LiAc/ss carrier DNA/PEG method.....	54
4.2.	Test d'activité β -gal	55
4.3.	Extraction d'ADN plasmidique	55
4.4.	Extraction des protéines solubles des levures.....	56
4.5.	Extraction des protéines totales des levures	56
4.6.	Croisements de deux souches de levure, mating	57
4.7.	Coimmunoprécipitation des protéines	57
5.	Techniques relatives à l'utilisation des bactéries	58
5.1.	Extraction d'ADN plasmidique des bactéries.....	58
5.2.	Préparation de bactéries chémo-compétentes (DH10B).....	58
5.3.	Transformation de bactéries chémo-compétentes	59
6.	Techniques relatives à l'utilisation des protéines.....	60
6.1.	Western blot.....	60
6.2.	Stripping d'une membrane de nitrocellulose portant des protéines	61
Bibliographie.....		62

INTRODUCTION

Espèces de <i>Brucella</i>	Hôte préférentiel
<i>B. abortus</i>	Les bovins
<i>B. canis</i>	Les canidés
<i>B. ceti</i>	Les cétacés
<i>B. microti</i>	Les renards
<i>B. melitensis</i>	Les chèvres et les moutons
<i>B. neotome</i>	Les rats du désert
<i>B. ovis</i>	Les moutons
<i>B. pinnipeliadis</i>	Les phoques
<i>B. suis</i>	Les porcs

Tableau 1-1: le nom des neuf espèces de *Brucella* identifié à ce jour et leur hôte préférentiel. Seules les espèces *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* et rarement *B. canis* infectent l'homme.

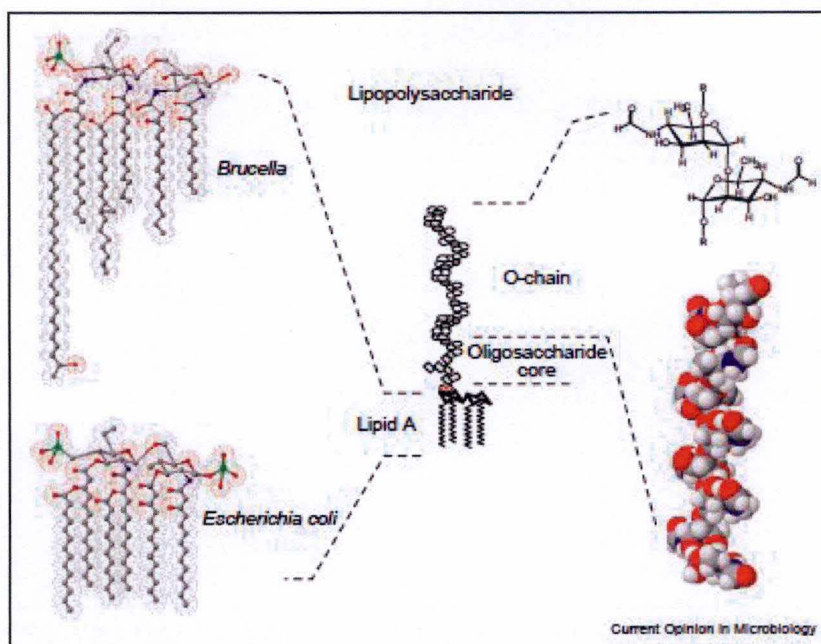


Figure 1-1 : **comparaison de la structure du LPS de *Brucella* spp. et du LPS d'*E. coli*.** Le LPS de *Brucella* spp. n'est pas conventionnel par rapport au LPS d'*E. coli* car le lipide A est composé de diaminoglucose comme base, les groupes acyls sont plus long jusqu'à 28 carbones et les liaisons avec le core est un lien amine. (Lapaque et al., 2005).

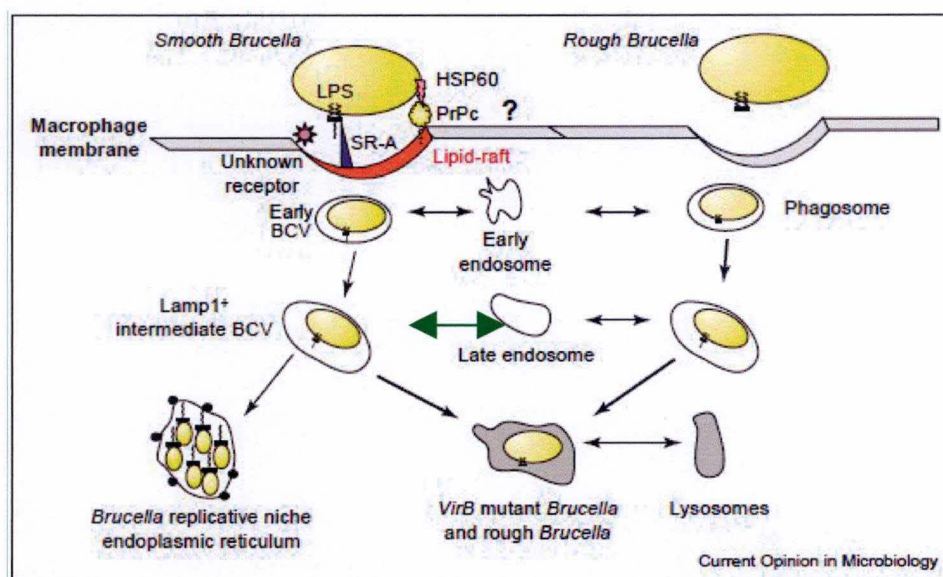


Figure 1-2 : **schéma représentant l'entrée des souches lisse et rugueuse de *Brucella* spp.** La souche lisse entre par les « lipids rafts » et évite la dégradation par le lysosome. La souche rugueuse n'entre pas par les « lipids raft » et est dégradée par le lysosome. Malgré cette entrée atypique, les mutants de délétion du système de sécrétion de type IV sont incapables d'éviter la dégradation par le lysosome. (Lapaque et al., 2005). Une correction est apportée par la flèche verte sur le schéma car une interaction transitoire entre la BCV et l'endosome tardif a lieu.

Introduction

1. Le genre *Brucella*

1.1. Généralités

Brucella spp. sont des bactéries à Gram négatives pathogènes intracellulaires facultatives. Le genre *Brucella* compte neuf espèces classées en fonction de leur préférence d'hôte (Tableau 1-1) (Maquart et al., 2008). *Brucella* spp. font partie de la famille des alpha-protéobactéries et sont phylogénétiquement reliées aux bactéries pathogènes et symbiontes de plantes et d'animaux tels que *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Ochrobactrum* spp., *Bartonella* spp. (Cloeckart et al. 1999).

Brucella spp. sont les agents responsables de la Brucellose, une zoonose mondialement répartie. Cette maladie cause des avortements et des problèmes de stérilité chez les animaux (Boschioli et al., 2001). Seules quatre espèces de *Brucella*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus* et rarement *B. canis* sont capables d'infecter l'homme. La brucellose humaine est communément nommée fièvre de Malte et est caractérisée par des fièvres intermittentes et de l'asthénie. Dans 30% des cas, la phase aiguë évolue en phase chronique caractérisée par des poussées de fièvre et des foyers d'infections localisés. Des cas d'endocardites, d'encéphalites ou encore de spondylites ont été rapportés (Young, 1983).

1.2. Pathogénie

Brucella spp. sont capables d'infecter différents types cellulaires incluant les macrophages et les cellules trophoblastiques (Gorvel et Moreno, 2002). *Brucella* spp. sont décrites comme des bactéries pathogènes ne possédant pas de facteurs de virulence classiques tels que les exotoxines, les cytolysines, la capsule, les protéases sécrétées, un plasmide de virulence (Moreno et Moryion, 2001). Sa virulence est corrélée avec sa capacité à entrer, à survivre au sein des cellules phagocytaires et à moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Pizarro et Cerda, 1999).

2. L'adaptation à son mode de vie

2.1.1. Son entrée dans les cellules et le détournement du trafic intracellulaire

Brucella spp. entrent dans les macrophages par des domaines riches en cholestérol de la membrane plasmique appelés « lipid rafts ». Le LPS lisse (*smooth*-LPS) est à la base de cette entrée atypique dans les cellules et la survie de la bactérie se trouve affectée lorsque l'entrée par les « lipid rafts » ne se fait pas ou est modifiée (Watarai et al., 2002). La structure du LPS de *Brucella* est différente du LPS des autres bactéries à Gram-négatives comme *E. coli*. Ainsi le lipide A possède des diaminoglucoses comme base au lieu de glucosamines, les groupes acyls sont plus longs (de C18-19-28 par rapport à C12 et C14) et la liaison avec le

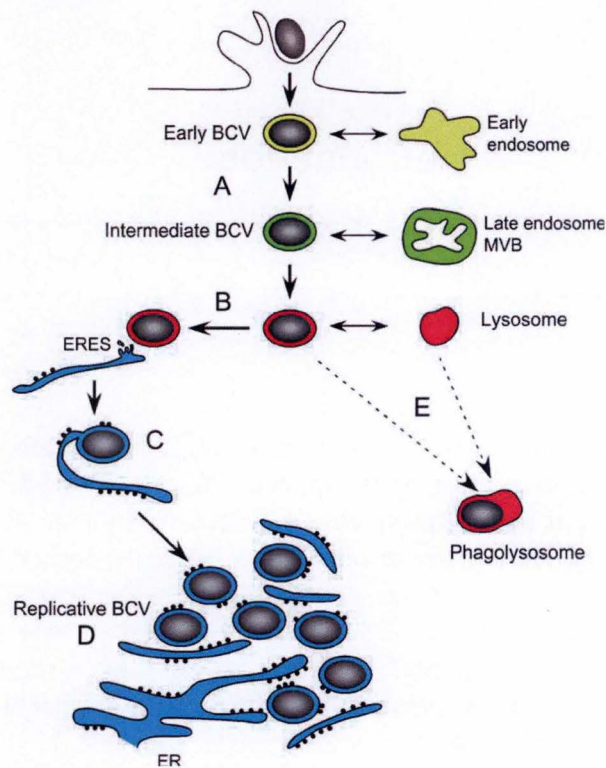


Figure 1-3 : le trafic intracellulaire de *Brucella* spp..

Brucella spp. une fois internalisée, se retrouve dans une vacuole nommée BCV (*Brucella containing vacuole*) qui fusionne successivement et de manière transitoire avec l'endosome précoce, l'endosome tardif et le lysosome. *Brucella* spp. évite néanmoins la transformation de cette vacuole en phagolysosome qui induirait la destruction de la bactérie, pour fusionner avec le réticulum endoplasmique qui devient sa niche de réplication (Celli et al., 2008).

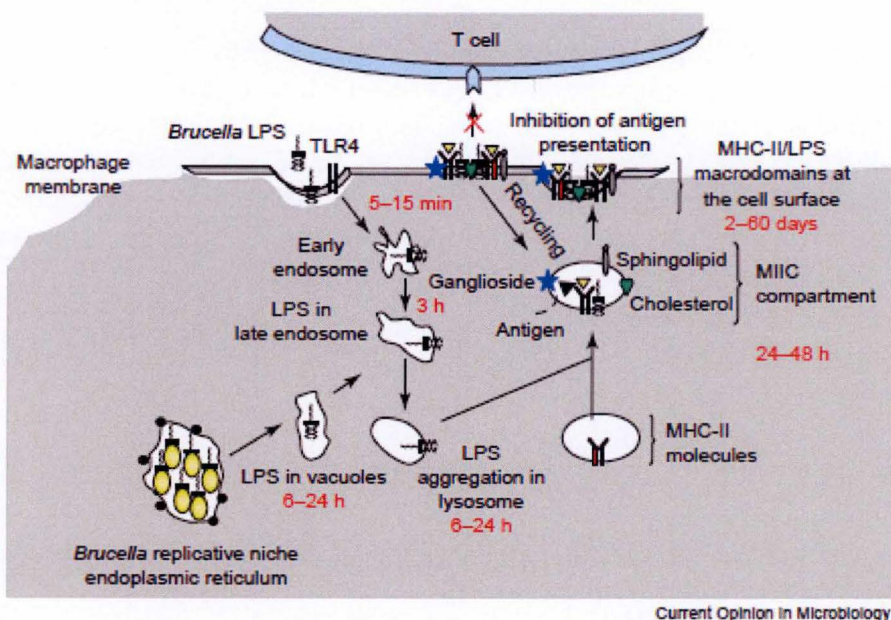


Figure 1-4 : schéma représentatif du trafic intracellulaire du LPS de *B. abortus* permettant l'altération de la présentation en MHC-II aux cellules T CD4⁺.

Le LPS non conventionnel de *Brucella* n'est pas dégradé lors de l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte. Celui-ci s'agrège et forme un complexe avec le MHC-II qui se trouve dans un compartiment nommé MIIC (MHC-II enriched compartment). Ce compartiment est alors recyclé à la membrane cellulaire et présenté aux cellules T. Ici la présentation est altérée et la reconnaissance ne se fait pas (Lapaque et al., 2008).

core est un lien amide plutôt que des liens esters et amides (Moriyon, 2003) (Figure 1-1). Les bactéries à Gram-négative n'ayant pas de chaîne O ont un LPS dit rugueux (*rough*-LPS). Les souches rugueuses de *Brucella* spp. n'entrent pas par les « lipids rafts » ce qui mène à la dégradation par le lysosome de la bactérie (figure 1-2). Son LPS a été dès lors considéré comme faisant partie des facteurs de virulence de *Brucella*. Un autre facteur de virulence est impliqué dans l'entrée par les « lipids rafts », le cyclique β 1-2 glucan. Le cyclique β 1-2 glucan agit sur les « lipids rafts » des cellules. Les mutants de délétion de la voie de biosynthèse du cyclique β 1-2 glucan n'évitent pas la fusion du phagosome avec le lysosome et sont incapables de se répliquer (Arenallo-Reynoso et al., 2005).

Une fois internalisée, la bactérie réside dans une vacuole nommée *Brucella containing vacuole* (BCV), un phagosome modifié, dans laquelle la bactérie peut survivre (Celli, 2005). La BCV interagit avec l'endosome précoce qui mature en vacuole acide intermédiaire. Récemment, il a été montré que la BCV interagit avec l'endosome tardif et de manière transitoire avec le lysosome, ces interactions seraient requises pour l'expression du système de sécrétion de type IV, VirB¹. En effet, un mutant de délétion Δ VirB de *Brucella* spp. emprunte la voie phagolysosomale qui mène à la mort des bactéries. La BCV interagit ensuite avec les sites de sortie du réticulum endoplasmique (RE) et fusionne par la suite avec celui-ci pour générer une vacuole dérivée du RE. Cette vacuole constitue la niche de réplication de *Brucella* spp. (Figure 1-3) (Celli et al., 2008).

2.1.2. Diminution de la réponse inflammatoire

Brucella spp. ont développé des stratégies afin d'atteindre sa niche de réplication avant l'activation de mécanismes antimicrobiens par le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, *Brucella* spp. n'induisent pas de réponses pro-inflammatoires par l'absence de recrutement des leucocytes qui permettent une réponse immunitaire. Elle a également mis au point des mécanismes afin de gêner la fonction des cellules de l'immunité tels que les macrophages (Moreno et al., 2007).

La structure non conventionnelle du LPS des *Brucella* spp. leur confère un avantage en altérant la reconnaissance par le système immunitaire inné. (Medzhitov, 2007) ce qui explique sa faible endotoxicité. Cette caractéristique est partagée par d'autres bactéries telles que *Bartonella* spp. et *Legionella* spp. (Moreno et al., 1981). Le LPS de la plupart des bactéries à Gram négatives est connu pour induire l'expression de dérivés réactifs de l'azote, de dérivés réactifs de l'oxygène impliqués dans l'explosion respiratoire et la production de cytokines. Le LPS purifié de *B. abortus* a montré un effet peu inducteur de l'explosion respiratoire, de l'expression de dérivés réactifs de l'azote et de la sécrétion de lysozyme (Rasool et al., 1992).

Le LPS constitue également un modulateur de la réponse immunitaire de l'hôte. Le LPS de *B. abortus* internalisé dans les macrophages résiste à la dégradation intracellulaire et s'associe au complexe MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II altérant sa fonction. La présentation de complexes MHC-II permet à la cellule infectée d'être reconnue par les cellules du système immunitaire qui activeront une cascade de signaux permettant la dégradation du pathogène. L'altération de la présentation en MHC-II pourrait empêcher la reconnaissance par les récepteurs des cellules T par encombrement stérique du complexe MHC-II et LPS (Figure 1-4) (Forestier et al., 2000).

¹ Le système de sécrétion de type IV de *Brucella* spp. est un homologue du système de VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* (O' Callaghan et al., 1999). Son implication dans le détournement de la voie phagolysosomale est bien établie. Récemment, il a été montré que deux protéines VceA et VceC sont transloqués dans les macrophages par le système de sécrétion de type IV, ces deux protéines seraient des protéines effectrices qui joueraient un rôle dans la virulence de la bactérie (de Jong et al., 2008).

Table 1. TLR Recognition of Microbial Components

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mucin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Tableau 1-2 : Les composés de microorganismes de différents espèces et les TLRs qui les reconnaissent (Akira et al., 2006).

Par ailleurs, il a été montré que l'Omp25 de *B. suis* (*Outer Membrane Protein*), une protéine de la membrane externe, module la fonction du macrophage infecté. L'Omp25 a été montré comme étant un régulateur négatif de la production de TNF- α (*Tumour Necrosis Factor- α*). L'inhibition de la production de TNF- α peut favoriser le développement intracellulaire de *Brucella* spp. à différents niveaux, puisque cette cytokine pro-inflammatoire active le mécanisme antibactérien des macrophages infectés, stimule la présentation d'antigènes et participe à l'initialisation de la réponse immunitaire spécifique (Jubier-Maurin et al., 2001).

2.1.3. La présence de deux protéines à domaine TIR

Un travail de recherche mené au laboratoire a permis d'identifier chez *Brucella melitensis*, deux protéines présentant un domaine homologue au domaine TIR (*Toll-IL-1 Receptor/ Resistance*) porté notamment par les TLRs (*Toll-like receptors*). Ces protéines sont nommées Btp1 (*Brucella TIR Protein*) et Btp2. Alors que cette dernière est constituée uniquement d'un domaine TIR, Btp1 possède également un domaine Coiled-Coil N-terminal.

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui permettent l'activation de voies de signalisation inflammatoires. Cette famille de récepteurs compte 10 membres chez l'homme tous impliqués dans la reconnaissance de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) (Rock et al., 1998) (Tableau 1-2). Les PAMPs sont des motifs moléculaires hautement conservés et essentiels pour le pathogène (Akira et al., 2006). Les TLRs ont un domaine intracellulaire TIR caractérisé par des motifs hautement conservés (noté box 1, 2 et 3). Ce domaine TIR interagit de manière homotypique avec des protéines adaptatrices comme TRIF (*TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β*), TRAM (*TRIF- Related Adaptor Molecule*), MyD88 (*Myeloid differentiation Primary response Protein*) et MAL (*MyD88 adaptor-like protein*). Cette interaction permet d'induire l'expression de gènes cibles tels que les gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires (O' Neill et Bowie, 2007).

D'autres études révèlent des caractéristiques importantes des Btp. Salcedo et al. (2008) ont mis en évidence que Btp1 de *B. abortus* contrôle la maturation des cellules dendritiques en interférant avec la voie TLR2. Le TLR2 reconnaît les lipoprotéines des bactéries (Lien et al., 1999). La transduction du signal par les voies TLR est essentielle pour l'induction de la maturation des cellules dendritiques ainsi que pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires. L'étude conclut par la possible implication de Btp1 dans l'établissement d'une maladie chronique en contrôlant la réponse immunitaire de l'hôte. Cette expérience apporte une piste sur l'intérêt de la présence de protéines à domaine TIR chez *Brucella* spp. mais les mécanismes moléculaires d'action ne sont pas encore connus à ce jour.

Par ailleurs, Cirl et al. (2008) ont mis en évidence *in vitro* l'interaction de Btp1 avec la protéine adaptatrice MyD88. Celle-ci est recrutée lors de l'activation de tous les TLR excepté le TLR3. Elle permet la transmission du signal suite à la reconnaissance d'un pathogène. Cette équipe confirme l'inhibition de l'expression de gènes induits par NF- κ B médié par la voie TLR2 et observe qu'aucune interaction entre Btp1 et TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β*), une autre protéine adaptatrice, existe *in vitro*.

Ces descriptions ne permettent pas de relier l'interférence de la voie TLR2 par Btp et l'interaction entre MyD88 et Btp. Car MyD88 n'est pas spécifique à la voie TLR2, il est activé par tous les TLRs sauf le TLR3. Une fonction est décrite pour Btp1 mais son mécanisme d'action n'est pas encore connu dans les détails.

Récemment, une étude menée au Wisconsin a identifié la protéine Btp1 comme mimant les propriétés des protéines adaptatrices TIRAP des récepteurs TLR. TIRAP est une protéine

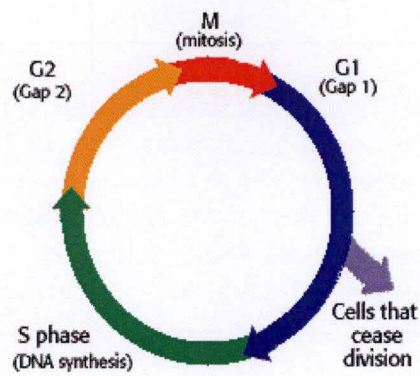


Figure 1-5 : **Représentation schématique des différentes phases du cycle cellulaire** : le cycle cellulaire est divisé en quatre phases, appelées la phase Gap1 (G1), Synthèse (S), Gap 2 G (2) et la Mitose (M). La croissance cellulaire a lieu au cours de la phase G1. L'ADN est répliqué lors de la phase S. La cellule termine sa croissance et se prépare à la mitose durant la phase G2. Ces trois premières phases sont regroupées sous le nom de l'interphase. Durant la phase de mitose la répartition de l'ADN pour chaque future cellule fille se réalise. Ensuite une enveloppe se reconstitue autour de l'ADN qui deviendra la membrane nucléaire et la dernière étape est la division physique des deux cellules filles par la cytokinèse. (http://www.bio.espci.fr/scolarité/c_BIO/cell/cell14.htm)

adaptatrice des voies dépendantes de MyD88 à partir des récepteurs TLR2 et TLR4. Ils ont montré que Btp1 interagit avec le phosphoinositide par le domaine N-term et colocalise avec la membrane plasmique et les composés du cytosquelette. Ce qui empêche la voie de signalisation TLR. L'étude en souris *in vivo*, indique que les *Brucella* mutée pour Btp1 ont un retard dans l'invasion de l'organisme lors des premières étapes de l'infection (Radhakrishnan, et al., 2009).

Brucella spp. ont acquis plusieurs stratégies leur permettant de se maintenir, survivre et se répliquer dans les cellules et d'être peu reconnu par le système immunitaire, ce qui lui a valu le surnom de 'pathogène furtif'. La compréhension des mécanismes n'est pas encore totalement acquise. Les bactéries pathogènes ont développé des stratégies afin de moduler les fonctions de l'hôte à leur avantage pour augmenter leur propagation ou leur survie dans l'hôte. Chaque bactérie a développé des stratégies différentes en fonction de son hôte préférentiel, de sa localisation intra- ou extra-cellulaire ou en fonction des tissus qu'elle infecte. Beaucoup d'exemples sont connus à ce jour, mais il est impossible ici de décrire toutes les stratégies mises en place. C'est la raison pour laquelle ce mémoire ne s'est consacré qu'aux bactéries pathogènes intracellulaires et à la modulation de trois processus cellulaires : le cycle cellulaire, l'apoptose et les voies de signalisation pro-inflammatoires.

3. Adaptation de bactéries à la vie intracellulaire

Les bactéries pathogènes intracellulaires ont développé des stratégies importantes modifiant les processus cellulaires de leur hôte afin de survivre et se répliquer dans celui-ci. Nous nous focalisons sur trois mécanismes dont le contrôle donne un avantage de taille pour la bactérie pathogène : (1) l'arrêt du cycle cellulaire augmente la propagation et le temps de survie de la bactérie dans les cellules, (2) l'induction de l'apoptose permet une propagation tissulaire, (3) l'inhibition de l'apoptose permet une survie plus longue dans la cellule et enfin (4) l'extinction des voies pro-inflammatoires empêche une destruction des bactéries pathogènes.

3.1. Modulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est décrit comme le programme permettant la réplication cellulaire. Certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella* spp., *Shigella* spp. entrent dans l'organisme par le tractus digestif. L'épithélium digestif subit un renouvellement cellulaire très important ce qui permet une meilleure défense contre les pathogènes entrant par le tractus digestif. Les bactéries ont mis au point des stratégies afin d'empêcher ce perpétuel renouvellement, en bloquant le cycle cellulaire pour augmenter leur propagation ou leur maintien dans le tractus digestif.

3.1.1. Le cycle cellulaire eucaryote

Le cycle cellulaire eucaryote peut être divisé en 4 phases : la phase Gap 1 (G1), la phase de synthèse (S), la phase Gap 2 (G2) et la phase de mitose (M) (Figure 1-5). Les trois premières phases sont rassemblées sous le nom de l'interphase. La phase de mitose comprend 5 étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase comprenant la cytokinèse. La cellule croît afin de se préparer à la division pendant la phase G1. Ensuite, lors de la phase S, l'ADN génomique se réplique. La phase G2 quant à elle comprend la fin de la croissance et la préparation à la phase

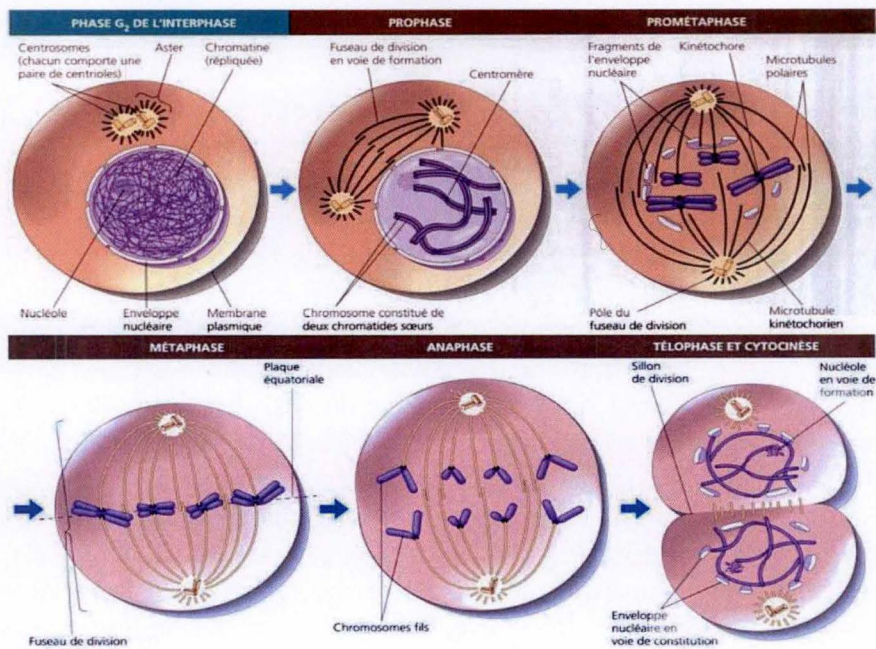


Figure 1-6 : **Représentation schématique de la phase G2 et la phase mitose.** Les chromosomes sont représentés en bleu, les microtubules en noir, les microtubules kinétochoriens en jaunes, l'enveloppe nucléaire en blanc. Lors de la prophase, l'enveloppe nucléaire est dégradée libérant l'ADN dans le cytoplasmique. Des asters et des microtubules se forment pour donner lors de la prométaphase des microtubules capables d'interagir avec le centromère de chaque chromatide sœur, les microtubules kinétochoriens. Les chromatides sœurs s'alignent au centre de la cellule qui est nommée plaque équatoriale. Les microtubules kinétochoriens rétrécissent par dépolymérisation afin d'amener chaque chromatide sœur dans un pôle de la cellule lors de l'anaphase. Au cours de la télophase, l'enveloppe nucléaire se forme et la cytokinèse est la division de la cellule en deux cellules filles (Campbell, 2^e édition, 2006).

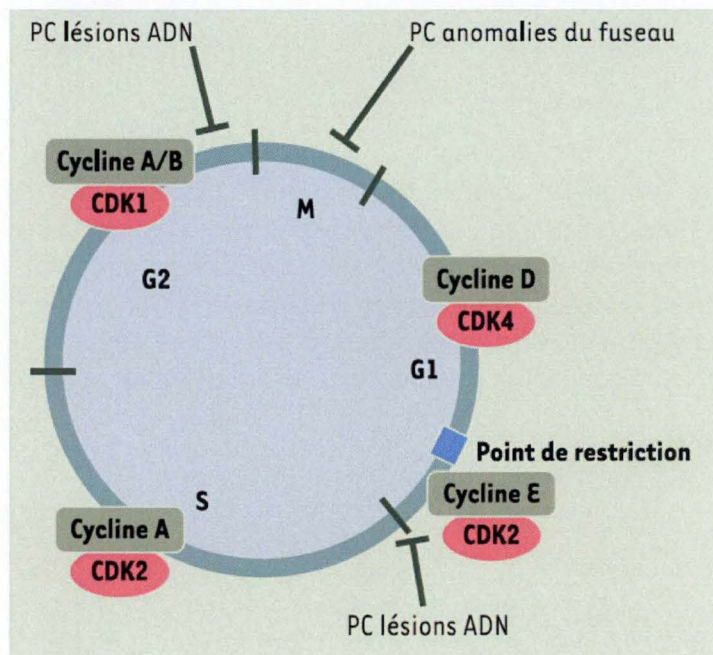


Figure 1-7 : **Représentation schématique du cycle cellulaire et de la présence temporelle de cyclines impliquées dans la régulation du cycle.** Trois points de contrôle (PC) permettent la vérification du bon déroulement de la division en vérifiant l'intégrité de l'ADN et du fuseau. La présence de chaque acteur moléculaire tel que les facteurs de croissance, les cyclines et les protéines kinases dépendantes des cyclines, CDK est vérifiée lors du point de restriction (De Rycke et Ducommun, 2003).

suivante. Et enfin, au cours de la mitose, les deux exemplaires de l'ADN génomique sont séparés pour donner deux cellules identiques (Figure 1-6).

Différents acteurs moléculaires et différentes voies de signalisation sont impliqués tout au long de la division cellulaire, permettant un contrôle des différentes phases et ainsi de mener à bien le déroulement du cycle cellulaire.

3.1.2. La régulation du cycle cellulaire eucaryote

Chaque phase du cycle cellulaire est soumise à des points de contrôle permettant d'assurer la réalisation complète de la phase (Figure 1-7) (De Rycke et Ducommun, 2003). Ainsi, les cyclines jouent un rôle important dans le cycle cellulaire. Leur concentration augmente au cours de l'interphase et elles interagissent avec les kinases cyclines-dépendantes (Cdk) afin de les activer. La dégradation des cyclines permettra le passage de la cellule à la phase de mitose.

Deux points de contrôle vérifient l'intégrité de l'ADN, le premier est situé à la transition de la phase G1 à la phase S et le second entre les phases G2 et M. Ces points de contrôle activent une réponse cellulaire face à des dommages à l'ADN. Dans un premier temps, le cycle cellulaire est arrêté et, dans un second temps, la cellule répare les dommages. Si les dommages à l'ADN sont trop importants la cellule activera le mécanisme d'apoptose qui induira sa mort. Les dommages à l'ADN induisent l'activité de la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), une protéine suppresseur de tumeur phosphorylant Chk 2 (*Check Point Kinase*) qui phosphoryle à son tour Cdc25 (*cell division cycle*). La phosphorylation de Cdc25 empêche son activité de phosphorylation du complexe cyclineB/Cdk1, augmentant la concentration de la cycline B lors de la phase G2. La phosphorylation du complexe cyclineB/Cdk1 est indispensable à la dégradation de la cycline B et à l'entrée de la cellule dans la phase M. En cas de dommages à l'ADN, la cycline B n'est pas dégradée et la transition de la phase G2 à la phase M est impossible (Figure 1-8) (Alby et al., 2001).

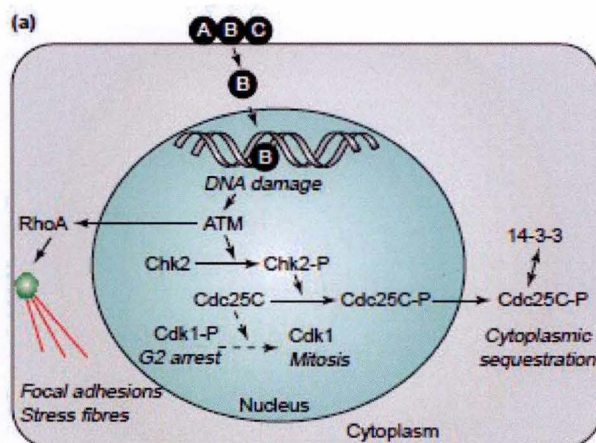


Figure 1-8 : **Mécanisme d'action du complexe CDT sur la cellule hôte.** La sous-unité B de CDT entre dans la cellule par l'aide des sous unités A et C. La sous unité B entre dans le noyau et génère des dommages à l'ADN qui activent le complexe ATM qui phosphoryle Chk-2 qui phosphoryle à son tour Cdc25, qui est séquestré dans le cytoplasme en interagissant avec la protéine 14-3-3. Ceci empêche la déphosphorylation de Cdk-1 et arrête le cycle cellulaire en phase G2 (Nougayrède et al., 2005).

Un point de contrôle vérifiant l'intégrité du fuseau mitotique a lieu lors de la phase M. Si le fuseau mitotique est altéré, le cycle cellulaire est arrêté pendant la mitose. La vérification de la présence des différents acteurs indispensables pour la division cellulaire tels que les Cdk, les

cyclines et les facteurs de croissance dans le milieu externe est réalisée entre les phases G1 et S et est nommée le point de restriction (De Rycke et Ducommun, 2003).

3.1.3. La modulation du cycle cellulaire par des bactéries

Le cycle cellulaire implique différents acteurs qui peuvent être la cible de toxines bactériennes permettant de le modulation. Le maintien de la barrière épithéliale intestinale dépend du bon déroulement du cycle cellulaire et d'un renouvellement cellulaire rapide. *Salmonella spp.* (Spano et al., 2007) et *Shigella spp.* (Iwai et al., 2007) par leur toxine appelée respectivement CdtB et IpaB, sont capables d'arrêter le cycle cellulaire (1) en phase G2 pour la toxine CdtB et (2) avant l'anaphase pour la toxine IpaB. La capacité à arrêter le cycle cellulaire empêcherait le renouvellement des cellules hôtes et permettrait une meilleure propagation bactérienne (Oswald et al., 2005).

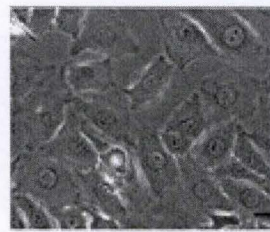
La famille des CDT, cytolethal distending toxin

La première toxine bloquant le cycle cellulaire a été identifiée dans les surnageants de cultures provenant d'échantillons de patients atteints de diarrhées hémorragiques. Cette toxine, nommée *Cytolethal distending toxin* (CDT), a été découverte comme sécrétée par *Escherichia coli* (Johnson et Lior, 1988a) et *Campylobacter spp.* (Johnson et Lior, 1988b). Elle provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 qui peut éventuellement entraîner la mort de la cellule. L'arrêt en phase G2 induit par CDT a été mis en évidence par l'observation de la distension cellulaire. Des protéines homologues ont été identifiées chez d'autres bactéries telles que *Haemophilus ducrey* (Cope et al., 1997), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Sugai et al., 1998) et *Helicobacter hepaticus* (Young et al., 2000) et l'effet de ces toxines est semblable à celui de la CDT d'*E. coli* sur différentes cultures cellulaires. L'importance de cette toxine pour les bactéries entéropathogènes extracellulaires citées plus haut est de casser la barrière épithéliale, rendant ainsi la propagation des bactéries dans les tissus sous jacents possibles. Le mécanisme d'action de CDT a été identifié sur base des modèles de bactéries extracellulaires.

Les CDTs sont composées de trois sous-unités, CdtA, CdtB et CdtC, et les gènes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* qui les encodent sont disposés en opéron. Les gènes *cdt* ne sont pas sur des plasmides de virulence (Lara-Tejero et al., 2001)². Les trois sous-unités, constitutivement exprimées et assemblées en un complexe, sont transloquées dans le périplasma des bactéries (Hickey et al., 2000 ; Ueno et al., 2006). Les sous-unités CdtA et CdtC fonctionnent comme un récepteur liant CdtB et permettent l'entrée de la sous-unité CdtB dans la cellule. La sous-unité CdtB est la plus conservée parmi les différentes espèces et elle porte un site actif, DNase de type I, et un domaine similaire à un domaine de liaison à l'ADN. CdtB est transloqué dans le noyau par un signal de localisation nucléaire atypique. Une fois dans le noyau, CdtB provoque des cassures des double brins de l'ADN (Nesic et al., 2004). Les dommages provoqués à l'ADN par la toxine sont ressentis par la cellule hôte, qui va bloquer le cycle cellulaire en phase G2 par l'activation d'ATM (Hassane et al., 2003).

Certaines bactéries comme *Salmonella* et *Shigella* utilisent le système de points de contrôle mis en place dans les cellules à leurs avantages.

² Le cluster de gènes *cdt* d'*E. coli* est flanqué de séquence bactériophages P2 et de séquence lambda-like. Ceci laisse penser que ces gènes sont dans le génome de ces bactéries suite à un transfert horizontal (Asakura et al., 2007).



S. Typhi



Non infected

Figure 1-9 : Effets de *Salmonella typhi* lors d'infection de cellules Henle-407. L'observation au microscope à contraste de phase montre une augmentation de la taille des cellules infectées par *S. typhi* (*S. Typhi*) par rapport aux cellules non infectées (non infected) (Spano et al., 2008).

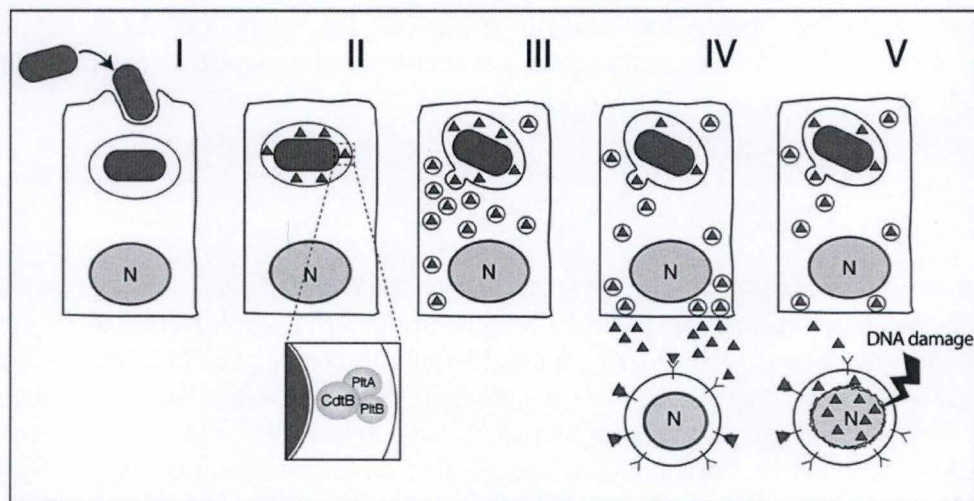


Figure 1-10 : Représentation schématique du trafic de la toxine T dans une cellule infectée. PltA et PltB médie la translocation de CdtB dans le cytoplasme (II). Le complexe CdtB/PltA/PltB se dirige vers la membrane basale de la cellule (III). Le complexe sort de la cellule et atteint les cellules voisines (IV et V). CdtB induit des dommages à l'ADN qui sont perçus par la cellule. L'arrêt du cycle cellulaire est enclenché (V). (Spano et al., 2008)

Salmonella enterica serovar *typhi*, une bactérie intracellulaire possède un gène codant pour la sous unité CdtB (Haghjoo and Galan, 2004).

Dans le cas d'une infection par ce pathogène, la présence des sous-unités CdtA et CdtC semblerait *a priori* ne pas être nécessaire de par la présence de la bactérie dans une vacuole de la cellule hôte. La toxine produite par *S. typhi* est nommé 'toxine typhoïde'. Le gène de *cdtB* chez *S. typhi* se trouve dans un îlot de pathogénicité où deux gènes codant des sous-unités de toxines pertussiques sont présents et ne sont pas organisés en opéron. Ces gènes sont nommés *pltA* et *pltB* (*Pertussis-Like Toxine A et B*). Leur rôle serait identique au rôle de CdtA et CdtC d'*E. coli* (Haghjoo and Galan, 2004). L'expression de *cdtB*, de *pltA* et de *pltB* est dépendant de l'internalisation de la bactérie. La sécrétion de CdtB par la bactérie ne dépend pas de la présence de PltA et PltB. Par contre, la translocation dans la vacuole et dans le cytoplasme est médiée par PltA et PltB. La formation d'un complexe composé de CdtB, PltA et PltB est requise pour l'action toxique sur la cellule infectée. En effet, CdtB est sécrétée de manière autocrine induisant un arrêt du cycle cellulaire de la cellule infectée. De manière surprenante, le complexe CdtB/PltA/PltB se retrouve dans le milieu de culture et devient cytotoxique pour les cellules environnantes non infectées ce qui suggère que CdtB est aussi sécrété de manière paracrine. Deux activités de la toxine chez *S. typhi* ont été identifiées, l'activité DNase de type I associée à CdtB et l'activité ADP-rybosylante associée à PltA. L'activité DNase I induit des lésions à l'ADN enclenchant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 par l'activation du complexe ATM. L'activité ADP-rybosylante n'a pas de cible connue à ce jour. L'activité de CdtB couplés aux mécanismes de libération paracrine et autocrine pourrait jouer un rôle dans l'établissement d'une infection persistante dans l'hôte et dans l'échappement aux défenses immunitaires. (figure 1-9 et 1-10) (Spano et al., 2008).

Shigella dysenteriae, une bactérie intracellulaire a également dans son génome les gènes codant une protéine homologue à la CDT d'*E. coli* (De Rycke and Oswald, 2001).

IpaB (invasive plasmid antigen B) module le cycle cellulaire

Shigella spp. sont des bactéries intracellulaires, entéropathogènes, à Gram négatives, causant des diarrhées aiguës chez l'homme. Cette bactérie rentre par les cellules M de l'épithélium associées aux follicules au niveau des plaques de Peyers. Il a été montré qu'un effecteur, IpaB joue un rôle important dans l'infection par *Shigella* spp. Cet effecteur est connu pour différentes actions telles que son implication dans l'adhésion à la cellule hôte afin d'injecter des effecteurs ou encore dans l'activation de l'apoptose (Ogawa et al., 2006). IpaB est sécrété par le système de sécrétion de type III³ dans les cellules épithéliales intestinales où il lie spécifiquement Mad2L2. Ce dernier est un inhibiteur de l'APC (*Anaphase Promoting Complex or cyclosome*) qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire en métaphase (Iwai et al., 2008). La prolifération des cellules eucaryotes dépend strictement de l'activité ubiquitine ligase de l'enzyme E3 de l'APC.

L'interaction entre IpaB et Mad2L2 permet donc une activation précoce de l'APC lors de la phase M.

L'interaction d'IpaB et de Mad2L2 permet l'activation de l'APC dans deux situations. L'APC peut lier Cdc20 qui active l'APC et ce complexe peut également être activé par une interaction avec Cdh1 (figure 1-11 et 12).

³ Le système de sécrétion de type III ressemble à une seringue produite par la bactérie permettant de traverser la membrane cellulaire de l'hôte et d'injecter des protéines effectrices qui influencent la virulence de la bactérie pathogène. Les effecteurs peuvent avoir différents rôles comme induire l'arrêt du cycle cellulaire ou encore dévier les voies de signalisation, etc.

1. L'APC, *anaphase promoting complex*

L'APC est un complexe protéique localisé dans le noyau des cellules en interphase, qui diffuse dans le cytoplasme durant la mitose où il s'associe avec des parties de l'appareil du fuseau mitotique. L'APC est une ubiquitine ligase composée d'une douzaine de sous-unités ayant une activité essentielle pour la dégradation des cyclines lors de l'interphase et pour la ségrégation des chromosomes à la transition métaphase-anaphase. Il agit de concert avec les enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1), les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et des protéines co-activatrices comme Cdc20 et Cdh1 pour catalyser le transfert d'ubiquitine sur le substrat nécessaire à la dégradation par le protéasome. Sans l'APC, la séparation des chromatides ne s'effectue pas lors de l'anaphase, le cycle cellulaire est arrêté en mitose, la division des deux cellules filles ne se réalise pas et les étapes d'initiation nécessaires à la réplication de l'ADN lors de la phase S n'ont pas lieu lorsque la nouvelle cellule va se diviser. (Iwai et al., 2008)

2. L'APC interagit avec Cdc20

La fin de la mitose et de l'anaphase est dépendante du complexe APC/Cdc20. Les protéines du point de contrôle de l'intégrité du fuseau telles que Mad2 et BubR1 sont activées par le kinétochore qui n'est pas entièrement attaché aux microtubules. Mad2 et BubR1 inhibent le complexe APC/Cdc20 qui ubiquitine la sécurine, un inhibiteur de séparase protéase et la cycline B ce qui empêche la sortie de l'anaphase et de la mitose. La dégradation de l'inhibiteur de séparase ubiquitiné active les séparases qui permettent la séparation des chromatides sœurs. L'inactivation de Cdk1 mène à la déphosphorylation de son substrat et à sa dégradation, ce qui permet la sortie de la mitose (figure 12) (Jeffrey et al., 1995).

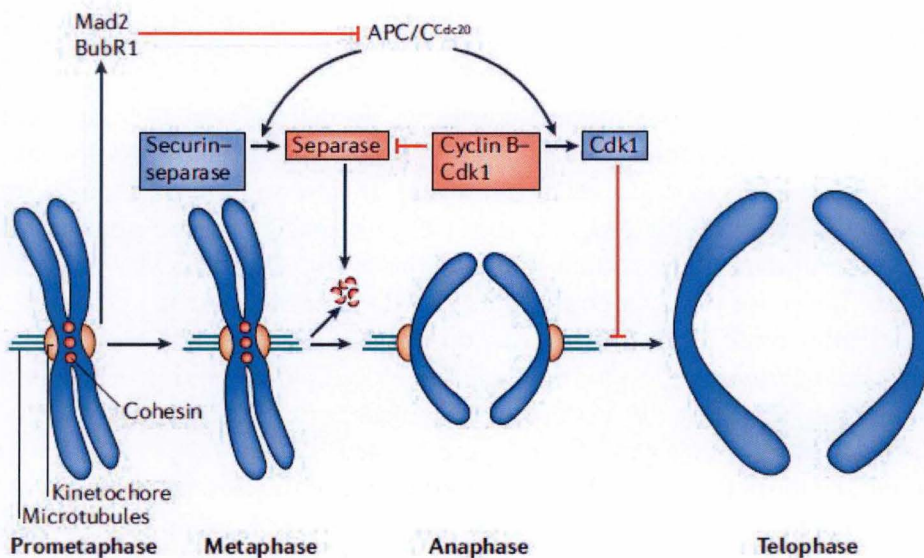


Figure 1-11 : **mécanisme d'action d'APC durant la phase mitose.** L'APC est inhibé par Mad2 ou BubR1 qui sans eux, APC peut se lié à Cdc20 qui active APC qui permet la dégradation de la cycline B ce qui engendre une accumulation de Cdk1 non actif et l'arrêt du cycle cellulaire. APC activé par Cdc20 agit aussi sur l'activation de la séparase qui permet la séparation des chromatides sœurs. (Peters, 2006)

3. L'APC interagit avec Cdh1

Lors de la transition des phases G1 et S, APC est inhibé par Emi1 (*Early Mitotic Inhibitor-1*). Pendant la phase G1, l'enzyme E2, ici UBCH10 interagit avec le complexe APC/Cdh1 entraînant l'ubiquitination des substrats telles que la cycline A (figure 13, point 1). La cycline A active Cdk2 qui phosphoryle à son tour Cdh1 (Cdc20 homolog 1) et déclenche la dissociation du complexe APC/Cdh1 qui va permettre la dégradation de Cdh1 et le passage à la phase S (figure 13, point 3). Le facteur de transcription E2F est alors activé ce qui active Mad2L2, qui entraîne l'inhibition du complexe APC/Cdh1 et de Cdh1 (figure 13, point 4) (Hsu, et al., 2002)

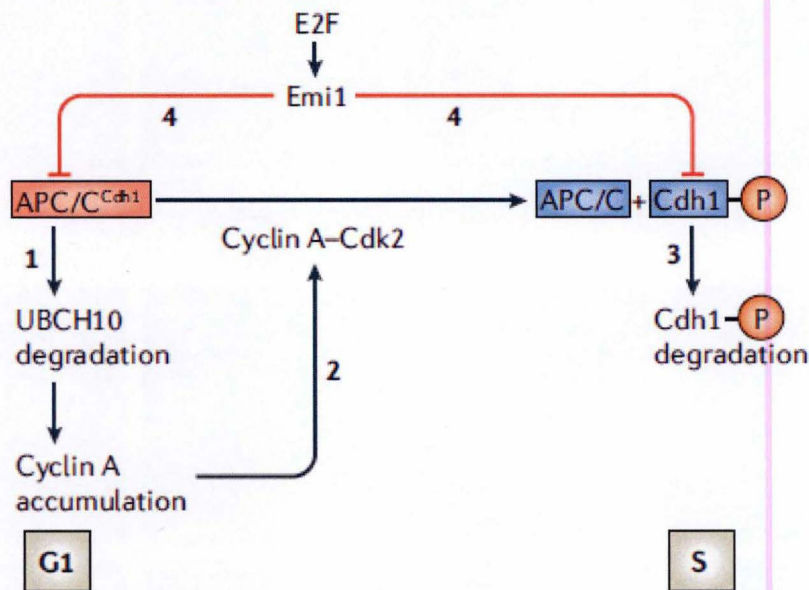


Figure 1-12 : **mécanisme d'action d'Emi1 sur APC.** L'APC peut être activé par Cdh1 qui permet la dégradation de la cycline A ce qui permet le passage de la phase G1 à la phase S. E2F active Emi1 qui est un inhibiteur de l'APC ce qui empêche son action en permanence sur la dégradation de la cycline A. (Peters, 2006).

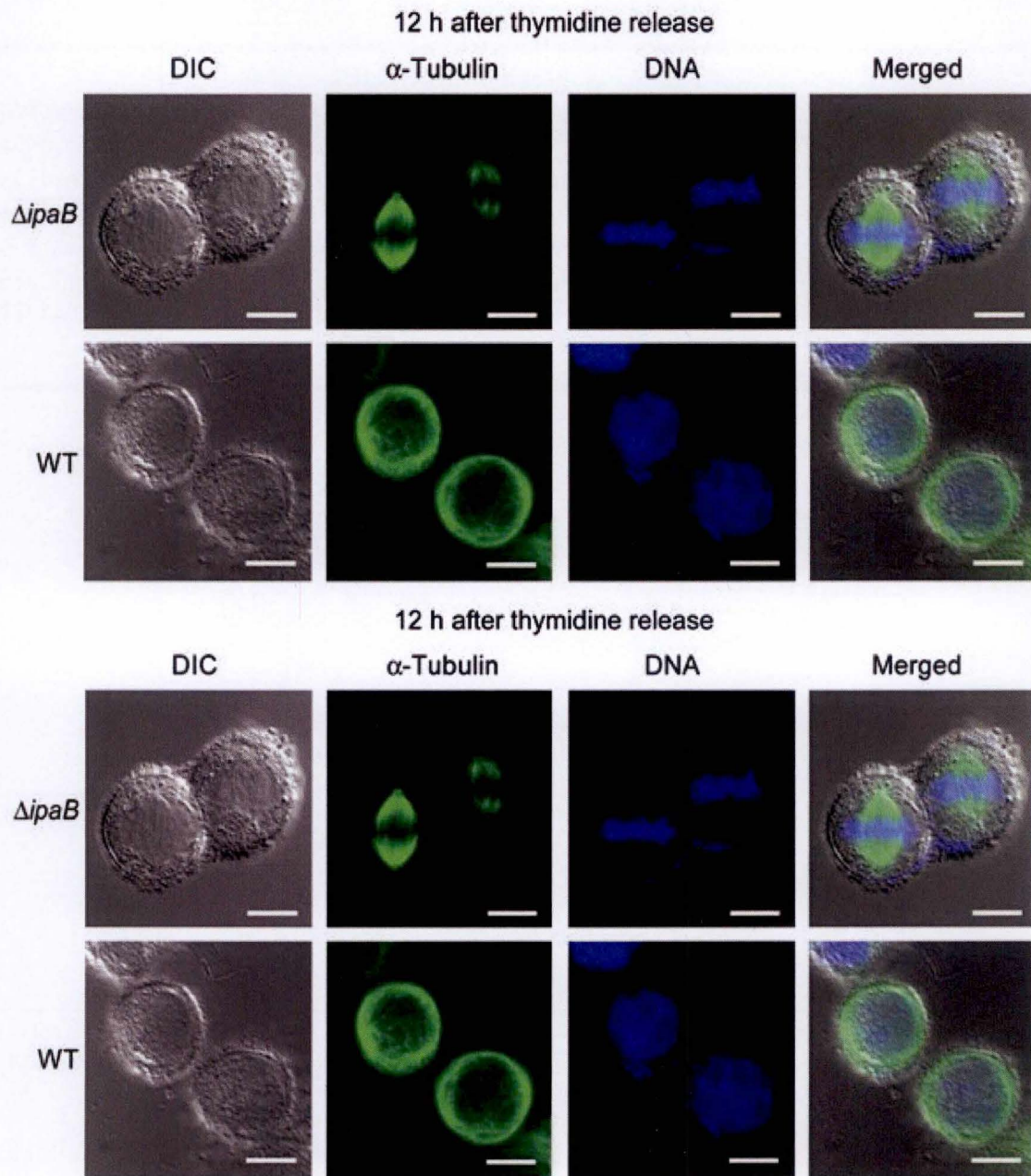


Figure 1-13 : Observation de cellules HeLa synchronisées infectées soit par *Shigella* wt ou *Shigella* muté pour *ipaB*. La forme sphérique des cellules est observée en DIC dans les deux cas. Les cellules infectées par la souche wt ne présentent pas de fuseau de division bien visible, l' α -tubuline est en vert et aucune localisation spécifique de l'ADN, (en bleu) n'est visible. Dans les cellules infectées par la souche mutée pour *ipaB*, le fuseau de division est bien visible et l'ADN est localisé au niveau de la plaque équatoriale (Iwai et al., 2007).

Premièrement, l'activation imprévue de l'APC par Cdc20 provoque la poly-ubiquitination de la cycline B lors de la mitose. Cette étape est obligatoire pour la dégradation de la cycline B. Cdk1 non liée à la cycline B change de conformation, ce qui empêche l'hydrolyse de l'ATP et des substrats. Les protéines peuvent alors se lier au site actif ce qui inactive complètement Cdk1. Dans les cellules saines, les complexes cyclines/Cdk permettent la phosphorylation des substrats. Cette situation permet à des phosphatases de déphosphoryler les substrats de Cdk1 qui sont essentiels pour l'assemblage du fuseau mitotique, de la condensation des chromosomes, la reformation de l'enveloppe nucléaire et la formation du sillon de division (Jeffrey et al., 1995).

Deuxièmement, l'APC est activé en interagissant avec cdk1 qui lors de la phase G₂, permet la dégradation précoce de la cycline A et le passage à la phase M n'est plus possible. La cycline A doit en effet atteindre une forte concentration pour permettre le passage à la phase M. Le faible taux de cycline A entraîne un arrêt du cycle cellulaire. Des observations au microscope confocal ont pu montrer que l'arrêt du cycle cellulaire a lieu avant la métaphase. Les cellules infectées sont sphériques, leur ADN est fortement condensé et la formation du fuseau de division n'est pas visible (Figure 1-13). L'arrêt du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales empêche le renouvellement des cellules durant l'infection par *Shigella* ce qui prolonge la colonisation bactérienne (figure 1-14) (Iwai et al., 2008).

3.1. Modulation des voies d'apoptose

La mort des cellules eucaryotes peut être le résultat de la nécrose ou de l'apoptose. Le premier cas consiste en l'activation d'un mécanisme contrôlé de mort suite à la perception de signaux. La nécrose quant à elle, ne fait pas partie d'un mécanisme cellulaire, c'est une destruction de la cellule non programmée. La nécrose détruit la cellule en relarguant dans les espaces intercellulaires les déchets de la cellule morte. Les bactéries intracellulaires capables de moduler les voies d'apoptose permettent la propagation bactérienne à des couches de tissus inférieurs ou de manière locale à des moments précis du stade de l'infection.

3.1.1. L'apoptose : la mort programmée des cellules

L'apoptose, la mort cellulaire programmée, est un programme génétique et biochimique, évolutivement conservé, strictement régulé qui joue un rôle très important pour éliminer les cellules excédentaires, endommagées ou nocives. Ce programme cellulaire est aussi crucial lors du développement de l'organisme. Ce processus inclut la contraction cellulaire, la compression de la chromatine, le relargage des débris cellulaires entourés par une membrane et la préservation de l'intégrité ultra-structurale des organelles (Ashkenazi et Dixit, 1999). Chez les mammifères, on retrouve deux voies de signalisation majeures impliquées dans l'initiation de l'apoptose : la voie extrinsèque via les récepteurs de mort et la voie intrinsèque via la mitochondrie.

La voie d'initiation extrinsèque de l'apoptose par les récepteurs de mort

La voie extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand, une cytokine, sur des récepteurs (par exemple : TNFR, FasL, TRAIL) faisant partie de la famille des récepteurs TNF- α , qui sont communément appelés les récepteurs de mort. Le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle produite par les macrophages (Figure 1-15) (Joza et al., 2002).

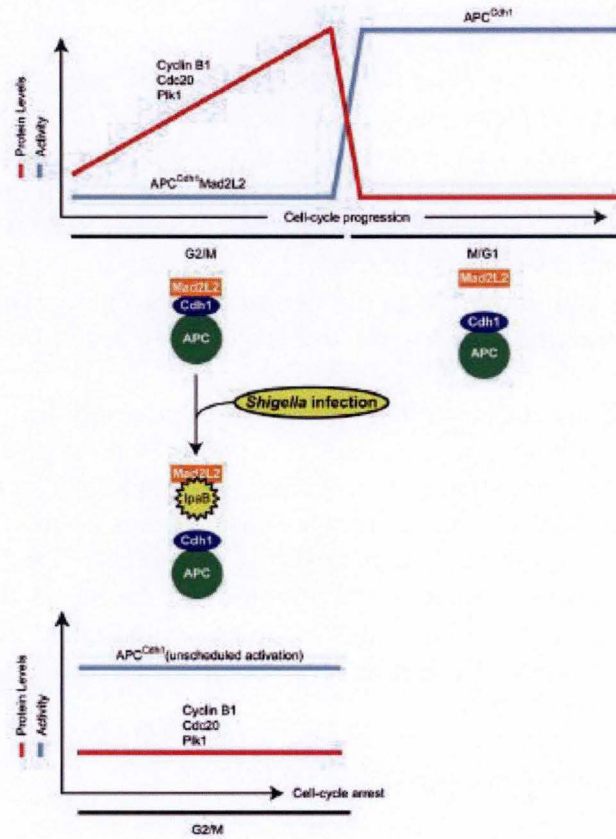


Figure 1-14 : **modèle proposé du rôle d'IpaB interférant sur la progression du cycle cellulaire.** Les cellules non infectées ont une activation de l'APC à un moment précis du cycle cellulaire ce qui permet le passage de la phase G2 à la phase M ou de la phase M à la phase G1. Si l'APC est activé précocement, l'accumulation de la cycline B ne se fait pas car la cycline B se fait dégrader en permanence. Ce qui déclenche un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 ou M. (Iwai et al., 2008).

Différents acteurs interviennent afin d'activer par auto protéolyse la caspase-8, activant à son tour d'autres caspases telles que la caspase-3, qui est une caspase effectrice capable de cliver différents substrats et de mener ainsi à l'apoptose (Khosravi-Far et Espoti, 2004). Ce mécanisme permet donc l'induction de l'apoptose de la cellule sans la contribution de la mitochondrie.

La voie d'initiation intrinsèque de l'apoptose par la mitochondrie

La cellule est capable de ressentir (1) les stress environnementaux comprenant les radiations UV, les irradiations γ , la chaleur, les agents chimiothérapeutiques, et (2) les stress intracellulaires comme les dommages à l'ADN, l'action d'oncoprotéines, des dommages aux gènes suppresseurs de tumeur, par de multiples molécules cytosoliques ou intra-organellaires, qui vont par la suite transmettre le signal à la mitochondrie (Kroemer, 2003). La mitochondrie enclenche à son tour l'activation d'enzymes impliquées dans l'apoptose de la cellule.

La clé de ce processus réside dans la membrane externe mitochondriale, dont l'altération par les molécules délivrées lors d'un stress est associée à une augmentation de la perméabilité de la membrane. Les protéines initialement piégées entre la membrane externe et la membrane interne mitochondriale vont se retrouver dans le cytosol de la cellule (Neymer et al., 2003). L'augmentation de la perméabilité serait expliquée par l'ouverture d'un pore transitoire nommé PTP (*permeability transition pore*) qui est un complexe multimérique. Ce changement de perméabilité engendre également une variation du potentiel membranaire qui est la source même des oxphos, oxydative phosphorylation, qui permet la production d'ATP cellulaire (Green et Kroemer, 2004).

La perte de l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie et le relargage des protéines mitochondriales constitue la première étape de la voie intrinsèque

Parmi les protéines s'échappant de la mitochondrie, le cytochrome c (cyt c) un composé de la chaîne de transport d'électrons permettant la respiration mitochondriale est un acteur principal de l'activation de caspases enclenchant la dégradation des structures cellulaires (Kluck et al., 1997 et Yang et al., 1997). Une fois dans le cytosol de la cellule, cyt c stimule l'assemblage de l'apoptosome, un complexe multi-protéique qui comprend également l'apaf-1 et la pro-caspase-9. L'apoptosome est capable de cliver les caspases afin de les activer. La caspase-9 activée déclenche à son tour l'activation de la caspase-3. Cette caspase-3 permet l'altération des surfaces cellulaires, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Arnoult et al., 2002).

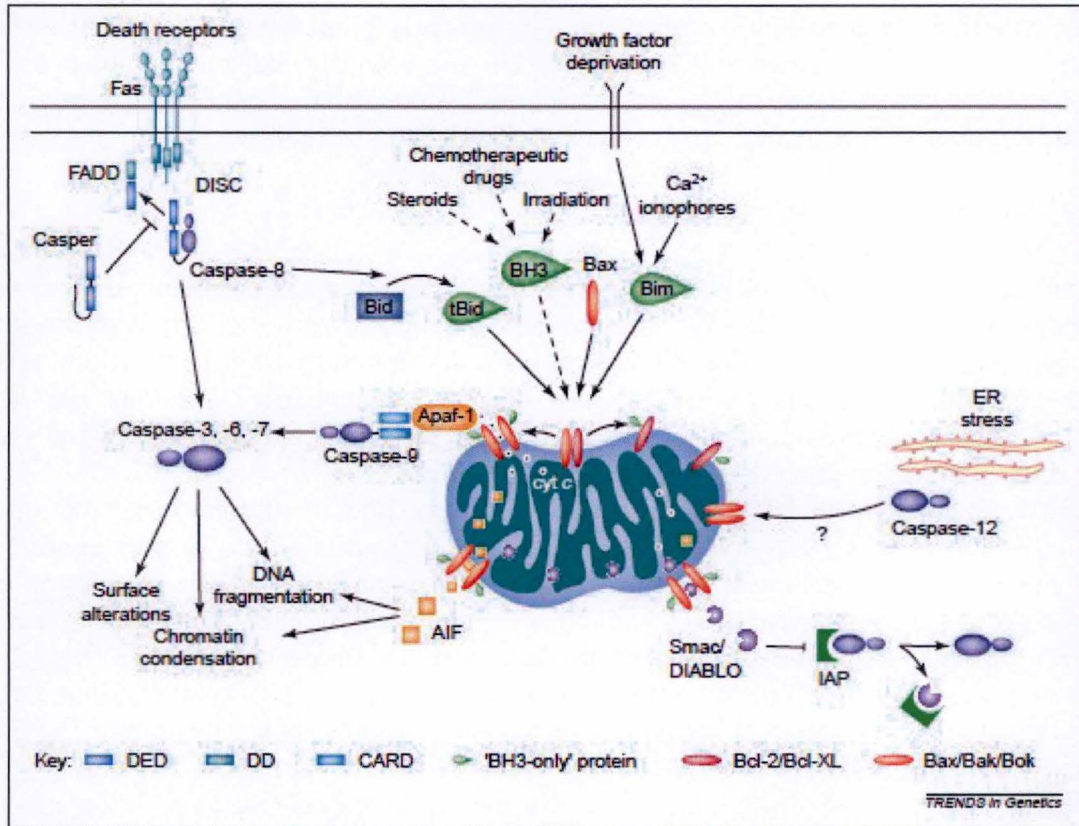


Figure 1-15 : Schéma de la voie de signalisation de l'apoptose. A gauche, la voie extrinsèque qui est activée par les récepteurs de mort et à droite la voie intrinsèque qui implique la mitochondrie. Les deux voies active des caspases qui permettent la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine et l'altération des surfaces. (Joza et al., 2002)

3.1.1. Le contrôle de l'apoptose par des bactéries

L'apoptose entraînant la mort des cellules, elle n'a lieu que lors de dommages importants. Les bactéries ont développé des mécanismes inducteurs ou inhibiteurs de l'apoptose afin d'améliorer leur propagation ou leur temps de survie intracellulaire. Plusieurs bactéries intracellulaires comme *Listeria* ou *Staphylococcus* secrètent des toxines induisant l'apoptose des cellules infectées. Et d'autres bactéries comme *Mycobacterium* spp. ont développé des stratégies pour inhiber l'apoptose des cellules infectées.

Utilisation des voies d'apoptose pour détruire les cellules infectées

Listeria monocytogenes, une bactérie à Gram positive pathogène opportuniste infecte l'Homme et les animaux via des aliments contaminés. A l'aide d'une toxine formant un pore, LlyO (*listeriolysine* O) la bactérie s'évade du phagosome dans le cytoplasme (Gao et Abu Kwaik, 2000). Des mutants de délétion de LlyO montre une incapacité à induire l'apoptose. La présence et la mobilité de la bactérie dans le cytoplasme de la cellule infectée déclenchent l'activation de la caspase-1, qui est impliquée dans la maturation de précurseurs de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18, permettant une activation de l'apoptose (Mariot et al., 1999). Bien qu'une partie du mécanisme d'induction d'apoptose soit comprise, l'apoptose pourrait être induite par une perforation par LlyO de la membrane externe mitochondriale et un relargage du cytochrome c (Cervantes et al., 2008).

Staphylococcus aureus, une bactérie à Gram positive causant de multiples maladies chez l'Homme, telles que l'ostéomyélite, l'embolie, le syndrome du choc toxique, envahit et survit dans les cellules épithéliales et endothéliales. Dès que la bactérie est entrée dans la cellule hôte, elle quitte le phagosome en lysant la membrane de celui-ci. Ce processus est dû à la toxine α , qui comme la LlyO de *Listeria monocytogenes* forme un pore dans la membrane du phagosome. La toxine α induit également l'apoptose des cellules endothéliales et épithéliales. L'échappement bactérien dans le cytoplasme est requis pour l'action de la toxine (Bayles et al., 1998). Des études *in vitro* ont montré que l'induction de l'apoptose par la toxine α de *Staphylococcus aureus* dans les cellules épithéliales impliquait l'activité des caspase-3, 8 et 9 (Haslinger et Kwaik, 2003). La caspase-8 est activée par les récepteurs de mort et active la caspase-3. La caspase-9 est activée par des voies dépendantes de la présence cytoplasmique du cytochrome c (Engels et al., 2000).

Shigella spp. quittent les cellules M et les macrophages sous jacents qui phagocytent les bactéries. Dans le macrophage, elles quittent le phagosome et se retrouvent dans le cytosol, *Shigella* transloquent par un système de sécrétion de type III, IpaB, qui lie directement et active la caspase-1 (Chen et al., 1996). Cela induit l'apoptose et le relargage de la forme mature de la cytokine pro inflammatoire IL-1 β (Zychlinski et al., 1994). L'apoptose des macrophages pourrait aussi être déclenchée par des dommages membranaires mitochondriaux (Koterski et al., 2005).

Salmonella spp. sont des bactéries à Gram négatif causant des gastroentérites chez l'Homme. Tout comme *Shigella*, *Salmonella* envahissent les cellules M afin d'atteindre les macrophages. Mais, contrairement à *Shigella*, elles résident et se répliquent dans le phagosome qui ne fusionne pas avec le lysosome. Une protéine homologue à IpaB, SipB (*Salmonella Invasive Protein*) est sécrétée par un système de sécrétion de type III dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elle agit comme IpaB en se liant et en activant la caspase-1 (Hersch et al., 1999). *Salmonella* évitent sa destruction par

l'induction de l'apoptose des macrophages ce qui permet l'invasion des plaques de Peyer. (Monak et al., 2000).

Shigella spp. et *Salmonella* spp. montrent une spécificité de tissu pour l'induction de l'apoptose. Par exemple, *S. flexneri* n'induit pas l'apoptose des cellules épithéliales par contre, les autres espèces de *Shigella* induisent la mort cellulaire des macrophages (Mantis et al., 1996). Dans le cas de *Salmonella*, chaque espèce induit l'apoptose de types cellulaires différents, *S. dublin* contrairement à *S. Typhimurium* qui induit l'apoptose des cellules épithéliales du colon (Rogers et al., 1996, Lundberg et al., 1999).

Utilisation des voies d'apoptose pour maintenir les cellules infectées vivantes

Mycobacterium tuberculosis est l'agent causal de la tuberculose qui, sans traitement, est fatale. Cette bactérie intracellulaire facultative se réplique dans les macrophages. Elle contient deux systèmes permettant, dans un cas, d'activer l'apoptose, et dans l'autre, de l'inhiber.

M. tuberculosis induit l'apoptose des macrophages par l'activation de la voie TLR-2, un récepteur de l'immunité innée. L'activation de cette voie permet l'expression de TNF- α qui induit l'activation extrinsèque de l'apoptose (Underhill et al., 1999). De plus, la bactérie va réguler négativement l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Rojas et al., 1999) en augmentant l'expression de la protéine Bax, une protéine pro-apoptotique (Perskvist et al., 2006). Malgré cette induction de l'apoptose, *M. tuberculosis* a un mécanisme de protection contre l'apoptose des cellules hôtes, qui est médié par deux voies de signalisation clé. La première est l'augmentation de la production de sTNF- α qui forme un complexe TNF- α et TNFR2 inactif, ceci va neutraliser la voie pro-apoptotique de TNF- α . La seconde voie de signalisation est l'activation de la voie de survie cellulaire NF- κ B TLR-2 dépendante permettrait la surexpression de l'IL-10, ce qui provoque la production de sTNFR2, le régulateur négatif de l'apoptose (Balcewicz-Sablinska et al., 1998). Ces mécanismes pro et anti-apoptotiques développés par *Mycobacterium* permettent l'établissement d'une infection persistante.

En plus de moduler la voie du cycle cellulaire et de l'apoptose, les bactéries sont également capables de manipuler les voies de signalisation pro inflammatoire.

4. Manipulation des voies de signalisation pro-inflammatoire

Le système de défense est divisé en deux systèmes ; le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Le système immunitaire inné est activé au début de l'infection, par la reconnaissance des PAMPs du pathogène, sa réponse n'est pas spécifique. Aucune mémorisation n'est réalisée par le système immunitaire inné (Medzhitov et al., 1997). Celui-ci peut conduire à l'élimination du pathogène, à une réaction inflammatoire et surtout est relié à l'immunité adaptative. Le système immunitaire adaptatif engendre une réponse plus tardive, la réponse est médiée par des lymphocyte T et B qui agissent de manière spécifique face à un pathogène. La réponse permet aussi l'établissement d'une mémoire qui permettra une réponse plus rapide lors d'une seconde infection (Akira et al., 2006). Nous allons nous centrer sur la reconnaissance du système immunitaire inné et plus particulièrement des récepteurs déclenchant des signaux pro-inflammatoires.

La reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire inné dépend des *pattern-recognition receptors* (PRRs). Les PRRs reconnaissent des structures essentielles à la survie du pathogène, donc difficilement altérables, nommés les *pathogen-associated molecular patterns*

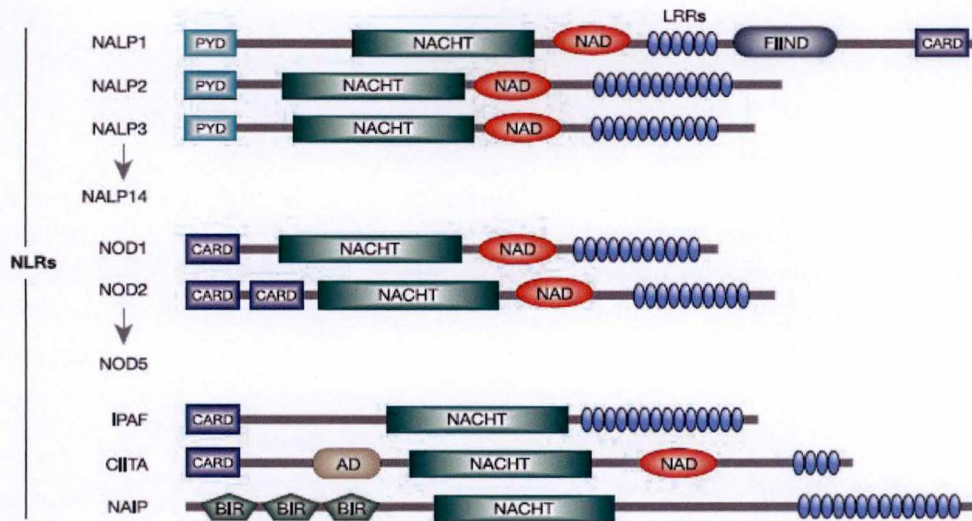


Figure 1-16 : **Représentation de la famille NLRs.** AD, activation domain, NAD : NACHT associated domain, LRRs: leucine rich repeats, FIIND domain with function to find, CARD: caspase recruitment domain, BIR : baculovirus IAP repeat, PYD: pyrin domain (Meylan et al., 2006)

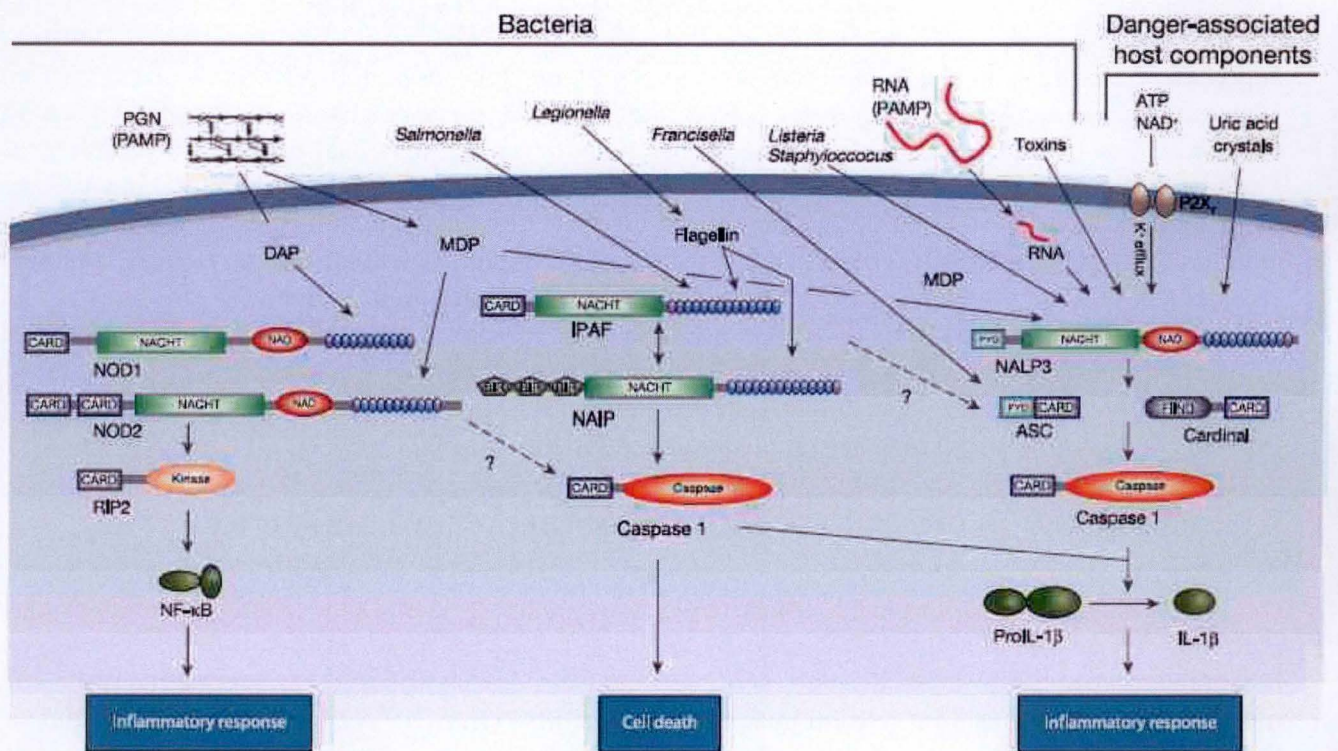


Figure 1-17 : **Voie de signalisation des NLRs.** Les NLRs sont activés par des composants des bactéries ou par des toxines. Les NLRs activent la caspase-1 ou induisent l'expression de NF-κB qui génère une réponse inflammatoire. La caspase-1 induit soit la mort cellulaire soit une réponse inflammatoire (Martinon et al., 2005).

(PAMPs) (Janeway, 1989). Tous les groupes de PRRs ont comme caractéristique commune d'être constitués d'au-moins deux domaines ; un domaine senseur et un domaine activateur. Les PRRs sont généralement classés en fonction de leur localisation qui peut être extracellulaire, membranaire ou cytoplasmique.

Seuls les récepteurs cytoplasmiques et les récepteurs membranaires sont directement impliqués dans l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires.

4.1. Les PRRs cytoplasmiques

Les PRRs cytoplasmiques comprennent les NOD (*Nucleotide binding and Oligomerization Domain*) like receptors ou appelés NLRs et les RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene 1*) like receptors ou appelés RLRs.

La famille NLRs regroupe 23 protéines (Figure 1-16).

Les NLRs agissent en synergie avec les TLRs activant l'expression de facteurs pro-inflammatoires comprenant des chémokines comme l'IL-8, des cytokines comme IL-1 β , IL-6, IL-18 (Fritz et al., 2006).

Les NLRs sont composés de trois domaines :

- le domaine C-terminal, LRR (*Leucine Rich Repeats*) liant les ligands,
- le domaine central, NBS (*Nucleotide-Binding Site*),
- le domaine N-terminal d'interaction protéine-protéine ou un domaine effecteur qui est composé de CARD (*Caspase Recruitment Domain*) ou de PYD (*Pyrin Domain*) ou BIR (*Baculovirus IAP Repeat*).

Les membres NOD1 et NOD2 de la famille NLRs portant également le nom de CARD4 et CARD15 détectent des structures particulières du peptidoglycan activant NF- κ B. L'activation de NF- κ B se fait par IKK qui est lui-même activé par RIP2 (*Receptor-Interacting Protein*) qui est recruté par un récepteur oligomérisé suite à l'interaction avec son ligand.

Les membres NALPs (*NACHT/LRR/PYD-Containing Proteins*) de la famille NLRs incluant Nalp2, Nalp3 sont des composants importants de l'inflammasome contenant la caspase-1, forme un complexe multi-protéique. Ce complexe sert de structure pour le recrutement et le repliement de la caspase-1, qui contribue à la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18 comme lors de l'apoptose (Figure 1-17) (Mariathasan et Monack, 2007). Deux récepteurs IPAF et NAIP reconnaissent la flagelline des bactéries pathogènes et permettent l'activation de la caspase 1 qui induit l'apoptose de la cellule (Vinzing et al., 2008).

Les RLRs sont exclusivement des senseurs viraux qui complètent la reconnaissance virale des TLRs impliquant les TLR3, TLR7, TLR8 et le TLR9. Un domaine hélicase détecte la présence d'ARN double brin dans le cytoplasme de la cellule. Le domaine activateur des RLRs est constitué de CARD. La reconnaissance de l'ARN double brin par RLR induit une augmentation de la production d'interférons de type I (Rothenfusser et al., 2005). L'expression de NF- κ B induit à son tour l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-12 (Chu et al., 2000).

Table 1. TLR Recognition of Microbial Components

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Tableau 1-2 : Les composés de microorganismes de différents espèces et les TLRs qui les reconnaissent (Akira et al., 2006).

4.2. Les PRRs membranaires

A ce jour, les PRRs membranaires regroupent les CLR (C-type Lectin Receptor) et les TLRs (Toll Like Receptors).

Bien que la majorité des CLR joue un rôle lors de l'endocytose, la phagocytose, la présentation d'antigène et dans le maintien d'un taux constant de glycoprotéines endogènes, la sous-famille V des CLR chez les vertébrés altère l'expression de gènes en réponse à un PAMPs.

Un des membres de la sous famille V, la dectine-1 reconnaît un composé de la paroi cellulaire de champignon, le zymosan, via le domaine CTLD (C-Type Lectin-Like Domain) donnant un soutien à la réponse médiée par le système TLR (Gantner et al., 2003).

Les TLRs sont composés de deux domaines : un domaine LRR qui permet la liaison à un PAMP et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL Interleukine-1 Receptor) qui permet la transduction du signal. Le domaine LRR est composé de 24-29 répétitions de motifs riches en leucine (Choe et al., 2005). La distinction entre chaque TLRs peut se faire sur base du PAMP qu'il reconnaît par exemples : les TLR1, -2, -3, -6 reconnaissent les lipides, les TLR7, TLR8, -9 reconnaissent des acides nucléiques, le TLR4 reconnaît les protéines et le TLR 5 reconnaît la flagelline (Tableau 1-2). Les TLRs sont exprimés par différentes cellules du système immunitaire, comprenant les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B, les cellules T spécifiques et des cellules non immunitaires telles que les fibroblastes et les cellules épithéliales. Les TLRs activent les mêmes molécules que la voie utilisée par le récepteur de l'IL-1, IL-1R, ce qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires, d'IFN- β et de gènes induits par l'INF (Figure 1-18) (Akira and Takeda, 2004).

4.3. Le détournement des voies de signalisation par des bactéries

Les bactéries pathogènes intracellulaires ont développé des stratégies afin de détourner la réponse pro-inflammatoire provoquée par leur présence dans l'organisme hôte. Différentes étapes de la voie pro-inflammatoire sont des cibles potentielles. Les bactéries pathogènes peuvent agir à différents niveaux de la transmission du signal ; soit à la reconnaissance du pathogène, soit au niveau de la voie de signalisation, soit sur l'expression de gènes. Par exemple, *Coxiella burnetii* empêche l'activation des voies dépendantes de la reconnaissance par TLR4 et *Mycobacterium tuberculosis* et *Shigella flexneri* inhibent la production de cytokines.

Le TLR4 détecte le LPS des bactéries à Gram-négatif. Plus précisément, les lipides A hexa-acétylés portant des chaînes d'acides gras de 12 à 16 carbones sont détectés par le complexe TLR4-MD2 qui permet l'induction de l'expression des gènes IFN- β et des cytokines pro-inflammatoires. Des bactéries comme *Legionella* spp., *Rhizobium* spp. et *Brucella* spp. ont des chaînes d'acides gras de 20 carbones composant leur lipide A ce qui empêche la détection par le TLR4 (Girard et al., 2003).

La bactérie intracellulaire obligatoire, *Coxiella burnetii* infecte un grand nombre de vertébrés. L'infection aigue chez l'Homme est appelée la fièvre Q. Elle est caractérisée par des symptômes non spécifiques ressemblant à la grippe tels que de fortes fièvres et des maux de tête pré-orbitaux. Il a été montré que *C. burnetii* abolit la détection par les TLRs en exprimant un lipide A non stimulateur du TLR4 (Zamboni et al., 2004).

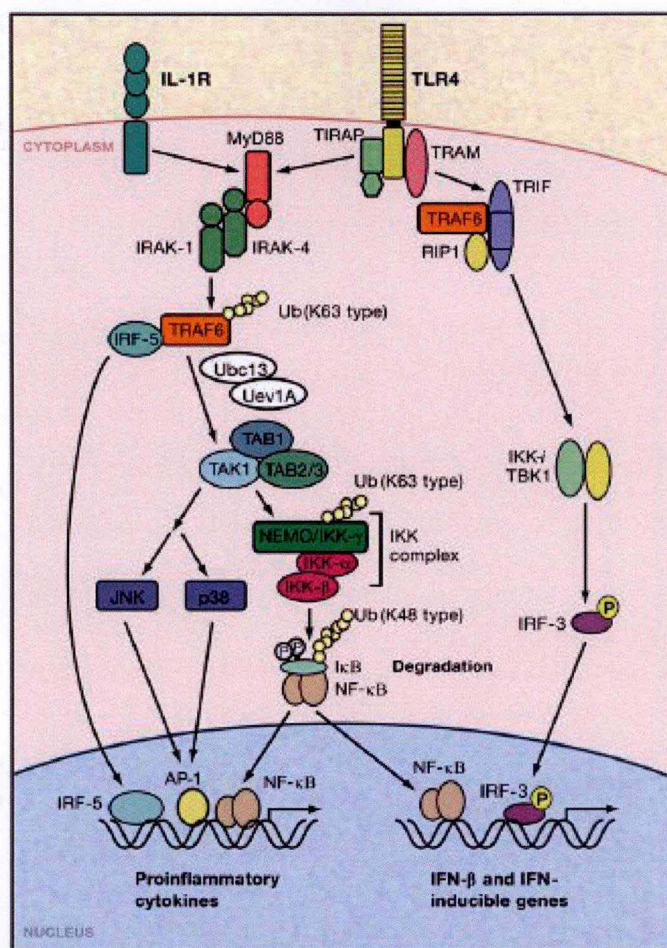


Figure 1-18 : **voie de signalisation MyD88 dépendante et indépendante.** Les TLRs, excepté le TLR3 et l'IL-1R partagent la même voie de signalisation. La stimulation avec leur ligand recrute les protéines adaptatrices contenant un domaine TIR, comme MyD88 et TIRAP au récepteur. Ceci induit la formation de complexe, par exemple IRAKs ou TRAF6. TRAF6 se lie à TRIF et RIP-1 pour activer le complexe IKK-i qui phosphoryle IRF-3 qui active la transcription des gènes induit par l'IFN et le gène *IFN-β*. Le complexe TRAF6 est polyubiquitiné par l'action du complexe IRAKs ce qui induit la dégradation du complexe NEMO, activant NF-κB qui induit l'expression d'INF-β et de cytokines pro-inflammatoires. La dégradation de TRAF6 permet également l'activation de facteur de transcription tels que JNK et p38. L'activation de JNK et p38 permet l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques résident dans les tissus épithéliaux périphériques dans un état immature. En réponse à un pathogène, les DCs mûrissent en cellules présentatrices d'antigènes. Par la suite, les DCs expriment différentes chemokines qui attirent différents types cellulaires de la réponse immunitaire. Elles expriment des signaux costimulateurs permettant l'activation de cellules T naïves. La réponse immunitaire primaire est enclenchée. A travers les cytokines sécrétées, les DCs dirigent la réponse des cellules T naïves (Blanco et al., 2008).

La souche virulente ou phase I de *Coxiella burnetii* produit un LPS contenant la chaîne O complète (Toman et Skultevy, 1996). Des études ont montré que la souche virulente de *C. burnetii* n'active pas la maturation des cellules dendritiques (DCs). L'inhibition de la maturation des DCs est due à un manque de stimulation plutôt qu'une inhibition active de la maturation. La souche avirulente produisant un LPS tronqué active au moins 10 fois plus la production de TNF et d'IL-12 que la souche virulente. La présence du LPS complet sur la souche virulente de *C. burnetii* empêche la maturation des DCs (Shannon et al., 2005). Malgré ces mécanismes, une légère activation du système pro-inflammatoire est médiée par le TLR9 qui reconnaît des signaux de l'ADN bactérien et les lipoprotéines de la membrane bactérienne qui sont reconnus par le TLR2 (Zamboni et al., 2004). Une réplication bactérienne sans production de cytokines inflammatoires ou sans maturation significative des cellules dendritiques permet à *C. burnetii* de persister dans un hôte immunocompétent (Shannon et al., 2005).

Shigella et *Mycobacterium* sont capables de modifier les voies de signalisation afin d'inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Ces bactéries provoquent des modifications des histones ou de la chromatine afin d'altérer la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Shigella flexneri est capable d'altérer la structure de la chromatine afin de moduler la réponse transcriptionnelle de l'hôte. Durant l'invasion de *S. flexneri* dans les cellules dendritiques humaines, un effecteur du système de sécrétion de type III OspF (*Outer Shigella Protein*) migre jusqu'au noyau et cible spécifiquement les MAPK, ERK et p38. OspF a une activité phosphatase spécifique qui peut déphosphoryler Erk1/2 et p38. Les MAPK sont des protéines permettant une transduction des signaux externes jusqu'au noyau pour produire une réponse adéquate à un stimulus, dans notre cas les MAPK activent des facteurs de transcription qui ciblent des gènes pro-inflammatoires. OspF se lie à ERK1/2 qui sera phosphorylé par MEK, par un mécanisme inconnu, le complexe OspF/ERK1/2 phosphorylé est ensuite transloqué dans le noyau. Ce complexe est alors déphosphorylé par OspF lui-même (Kramer et al., 2007) et se lie à *Retinoblastoma protein* (Rb). Rb est connue pour recruter des facteurs de modification des histones (Zurawski et al., 2008). OspF empêche la phosphorylation dépendante des MAPK de la sous-unité H3S10 de l'histone 3 du promoteur de gènes spécifiques. Suite au blocage de la phosphorylation de l'histone 3, et le recrutement de NF- κ B sur le promoteur, on a une inhibition de l'activité de transcription de l'interleukine-8, IL-8, une chémokine (Figure 1-19) (Hammon et Cossart, 2008). L'inhibition de la transcription d'IL-8 diminue la réponse inflammatoire des cellules hôtes, permettant l'établissement de l'infection.

Mycobacterium tuberculosis est capable d'inhiber la réponse IFN- γ ⁴ au niveau de l'expression d'ARNm. Deux mécanismes ont été mis en évidence : ils ont tous deux un effet sur un promoteur différent régulé par l'IFN- γ et implique la modification des histones et de la chromatine.

Le premier mécanisme empêche la transcription du gène *CIITA*. L'expression de ces gènes est permise par l'induction d'une cascade de signaux cumulant le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et CBE (*CREB Binding Protein*), un facteur de transcription et une histone acétyl transférase. Dans le cas d'une infection par *M. tuberculosis*, une inhibition de la liaison de SWI/SNF et une déacétylation des histones au promoteur bloque la transcription du gène cible *CIITA* (Pennini et al., 2007). Le mécanisme exact n'est pas élucidé.

⁴ L'interféron- γ (IFN- γ), une cytokine sécrétée par les cellules T et les *Natural Killer* (NKs) lors d'une infection joue un rôle majeur dans l'induction de l'expression des MHC-II à la surface des cellules infectées (Boehm et al., 1997). La liaison de l'IFN- γ à la surface cellulaire enclenche une cascade de signaux qui permet la transcription de gènes cibles tels que *CIITA*, qui est nécessaire pour la transcription de gènes impliqués dans la formation du complexe MHC-II ou HLA-DR qui est une protéine de surface du complexe MHC-II (Wang et al., 2005).

L'ADN des cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes ont une structure très complexe de leur ADN, il se retrouve sous forme d'hétérochromatine, l'ADN est fortement condensé et peu accessible par la machinerie de transcription. L'ADN peut également se retrouver sous la forme d'euchromatine, où l'état de condensation de l'ADN est moins important que pour l'hétérochromatine et la transcription de celui-ci est possible. Cette caractéristique de condensation est médiée par des complexes protéiques constitués d'histones qui permettent l'enroulement de l'ADN. L'état de l'ADN n'est pas figé, à l'aide d'enzymes telles que des enzymes modifiant les histones ou remodelant la chromatine (HDAC).

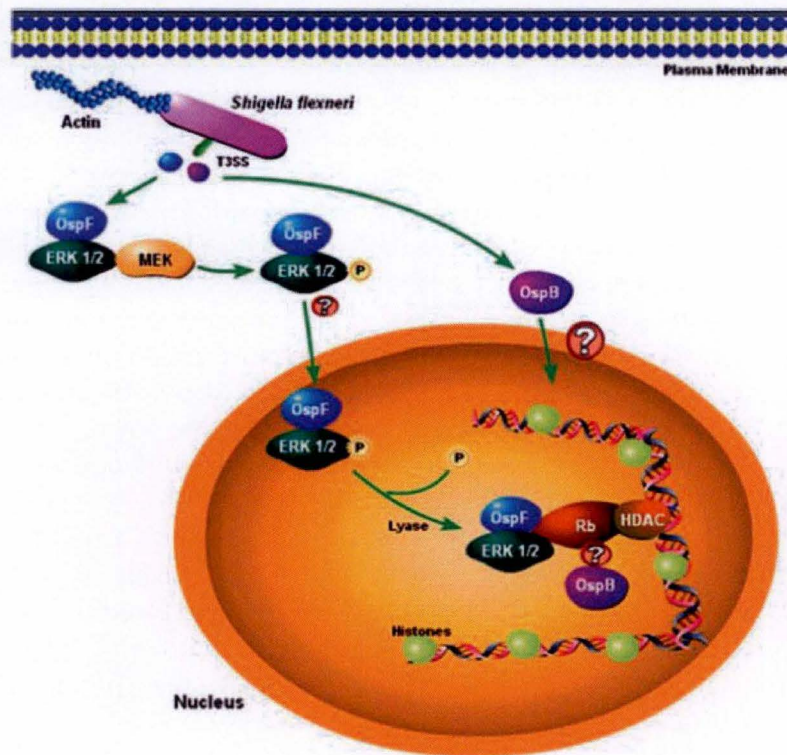


Figure 1-19 : Mécanisme d'action d'OspF dans la cellule hôte. OspF empêche la phosphorylation de HDAC indispensable pour la transcription de gènes cibles. OspB serait une protéine ayant la même fonction que la protéine OspF. (Zurawski et al., 2008)

Le second mécanisme connu est l'inhibition de la transcription du gène HLA-DR qui requiert CIITA qui est alors un coactivateur de sa transcription, et qui coordonne l'acétylation des histones au promoteur. Malgré l'inhibition de la transcription de CIITA, un taux suffisant de CIITA fut observé dans les cellules infectées par *M. tuberculosis* pour induire la transcription de HLA-DR. Cet effet est donc indépendant de l'inhibition de l'expression de CIITA car il a été observé qu'un répresseur mSin3A est recruté au promoteur HLA-DR. Le recrutement de mSin3A pourrait être en concurrence avec CBE ce qui donnerait la modulation entre l'acétylation ou la déacétylation des histones, et donc l'activation ou la répression de la transcription des gènes cibles (Figure 1.20) (Wang et al., 2005).

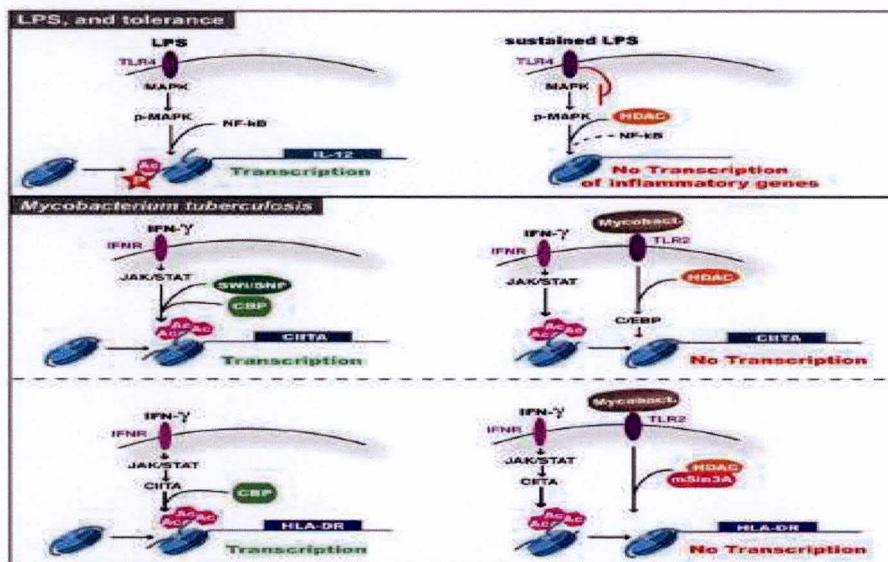


Figure 1-20 : Représentation des deux mécanismes de *M. tuberculosis* pour inhiber l'expression de CIITA, un coactivateur et de HLA-DR, un composant membranaire du complexe MHC-II. Dans le premier cas, une cascade de signaux empêche l'activité de facteur de transcription SWI/SNF et déacétyle l'histone. Dans le deuxième mécanisme, on a recrutement au promoteur du gène d'un répresseur, mSin3A (Hammon et Cossart, 2008).

Objectif du mémoire

Dans l'introduction, quelques exemples de stratégies de détournement des processus de la cellule hôte par des bactéries intracellulaires pathogènes ont été développés. Ceci montre l'importance de la connaissance de ces stratégies afin de mieux comprendre les maladies qu'elles induisent. *Brucella melitensis*, une bactérie intracellulaire est capable d'induire une maladie chronique qui implique des mécanismes capable de détourner la réponse immunitaire des cellules hôtes. Les protéines Btp de *Brucella melitensis* 16M ont des fonctions connues dans ce détournement mais leur mécanisme moléculaire ne sont pas encore compris. Il a été montré que Btp1 est capable d'interférer avec la voie de signalisation de TLR2 et d'empêcher la maturation des cellules dendritiques *in vivo*. Cette protéine a aussi été identifiée comme interagissant avec MyD88, une protéine adaptatrice, *in vitro*. Afin d'accomplir ces fonctions, il a été suggéré que ces protéines sont transloquées dans le cytoplasme des cellules qu'elles infectent.

L'objectif de ce mémoire a été de contribuer à l'identification de protéines interagissant avec les Btp de *Brucella melitensis* 16M. Tout d'abord, un crible double hybride en levure a permis l'identification de la protéine TAO2 α interagissant avec Btp1. Par la suite, il était important de vérifier et de connaître les domaines impliqués dans l'interaction des deux protéines. Deux techniques de confirmation de l'interaction ont été choisi : (1) une technique *in vitro* permettant la purification sur colonne grâce à un tag GST fusionné sur une des deux protéine et (2) une technique *in vivo*. Cette dernière est la Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes qui est plus proche des conditions d'infection de *Brucella melitensis*.

RESULTATS

Résultats

Brucella spp. a développé des stratégies de détournement des processus cellulaires de l'hôte à son avantage. L'entrée de la bactérie par les « lipid rafts » détermine sa destinée dans la cellule, et dépend du β 1-2 glucan cyclique et du LPS (Moriyon, 2003, Arenallo-Reynoso et al., 2005). Le système de sécrétion de type IV (VirB) est impliqué dans la déviation du trafic intracellulaire phagolysosomal (Celli et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que le LPS, l'Omp25 et les protéines Btp1 et Btp2 contribuent à la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (Jubier-Maurin et al., 2001) (Salcedo et al., 2008) (Cirl et al., 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires d'action de chacun de ces acteurs ne sont pas encore entièrement élucidés. Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail aux protéines Btp1 et Btp2 de *B. melitensis* 16M et avons tenté d'identifier les mécanismes moléculaires à la base de leur fonction (Salcedo et al., 2008, Cirl et al., 2008). Au cours d'un travail précédent, il a été proposé que la protéine Btp1 est sécrétée *in vitro* par la bactérie.

1. Recherche de partenaires protéiques eucaryotes d'interaction des Btp de *Brucella melitensis* 16M

En postulant que les protéines Btp1 et Btp2 atteignent le cytoplasme de la cellule infectée et sur base de la présence d'un domaine coiled-coil et/ou d'un domaine TIR, nous avons tenté d'identifier des protéines eucaryotes s'associant à ces effecteurs de *Brucella* spp.. Aussi, nous avons utilisé les protéines Btp1 et Btp2 comme protéines appâts lors du crible double hybride en levure d'une banque de protéines proies établies à partir d'ADNc de foie humain.

1.1. Le principe du double hybride en levure

Un crible double hybride en levure permet de rechercher des partenaires d'interaction d'une protéine connue sans *a priori*. Le principe de cette technique est basé sur la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel par l'association de deux protéines d'intérêts. Un facteur de transcription est constitué de deux domaines, le domaine BD (*Binding Domain*) liant l'ADN sur une séquence appelée UAS (*Upstream Activating Sequence*) située en amont du promoteur d'un gène, et le domaine AD (*Activating Domain*) qui recrute la machinerie de transcription. La séparation physique des deux domaines n'altère pas leur fonction respective mais rend le facteur de transcription non fonctionnel. L'interaction physique d'une protéine proie (P) fusionnée à l'AD et d'une protéine appât (A) fusionnée au BD permet le rapprochement des deux domaines et la reconstitution du facteur de transcription fonctionnel (figure 3-1). L'utilisation d'un gène rapporteur en aval du promoteur reconnu par le facteur de transcription permet de mettre en évidence l'association des protéines A et P.

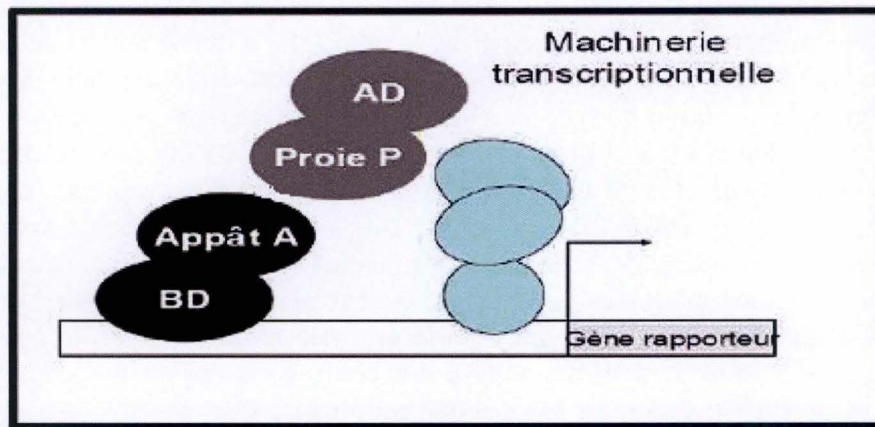


Figure 3-1 : Représentation schématique du principe du système double hybride en levure.

Les protéines fusionnées aux domaines BD et AD du facteur de transcription sont nommées respectivement protéine appât (A) et protéine proie (P). L'association physique de celles-ci permet la reconstitution du facteur de transcription et l'expression d'un gène rapporteur.

1.1. Le crible double hybride en levure d'une banque de protéines proies de foie humain par Btp1 et Btp2

Pour la réalisation du crible double hybride en levure lors de ce mémoire, nous avons utilisé les souches AH109 et Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*, qui sont des partenaires de croisement et le facteur de transcription Gal4. Gal4 est connu pour augmenter la transcription de gènes tels que Gal1 codant la β -galactosidase (Fields et Song, 1989). Les protéines Btp1, Btp2 et une version tronquée de Btp1 contenant uniquement son domaine TIR, appelée Btp1_{TIR} ont été utilisées comme protéines appâts. Les vecteurs pVV212 portent le gène *TRP* permettant la survie des levures AH109 transformées par celui-ci sur un milieu déplété en tryptophane. Pour ce faire, les vecteurs pVV212-Btp1, pVV212-Btp2 et pVV212-Btp1_{TIR} portant respectivement la séquence codante des protéines de fusion (N-terminal) Gal4BD-Btp1, Gal4BD-Btp2, Gal4BD-Btp1_{TIR}, ont été transformés individuellement dans la souche AH109 de *S. cerevisiae*. Les transformants sont sélectionnés sur milieu 'synthetic complete' (SC) dépourvu en tryptophane. Nous disposons au laboratoire des vecteurs pACT2 dans lesquels ont été clonés une banque d'ADNc de foie humain, transformés dans la souche Y187 de *S. cerevisiae* (réalisé par L. Tafforeau, INSERM, Lyon). Le pACT2 permet l'expression en levure d'une protéine de fusion (en N-terminal) avec le domaine Gal4AD, il porte gène *LEU* permettant la complémentation de l'auxotrophie leucine des levures Y187. Le crible double hybride en levure a été réalisé par croisement des souches haploïdes ce qui permet d'obtenir des levures diploïdes ayant les deux vecteurs. Le croisement des deux souches dépend du type sexuel de la levure : MATa pour la souche AH109 et MAT α pour la souche Y187. La réalisation d'un crible double hybride en levure par croisement nécessite de calculer l'efficacité du croisement, afin de s'assurer que chaque protéine proie a pu rencontrer toutes les protéines appâts. Pour ce faire, lorsque les levures haploïdes AH109 et Y187 sont croisées, une partie des levures diploïdes est récupérée et étalée sur milieu sélectionnant les levures diploïdes (SC-L-W). Ainsi, nous avons pu déterminer que le crible réalisé est saturant.

1.1.1. Mise en évidence des interactions

Le croisement des souches haploïdes AH109 et Y187 transformées respectivement par les plasmides permettant l'expression des protéines appâts et des protéines proies a été réalisé sur milieu riche. Les levures diploïdes issues du croisement sont étalées sur le milieu sélectionnant l'activité du facteur de transcription Gal4 reconstitué par l'interaction physique entre une protéine appât et une protéine proie. Cette sélection se fait sur milieu SC déplété en leucine (L), en tryptophane (W) et en histidine (H) car le gène rapporteur sous le contrôle du promoteur Gal4 utilisé est *HIS3*. Ce gène code pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'histidine. Si ce gène est muté ou absent, la levure devient auxotrophe pour l'histidine. De plus, le milieu est complété en 10 mM de 3AT (3-aminotriazole) qui est un inhibiteur de l'enzyme codée par le gène *HIS3* afin de supprimer son expression basale. On observe à la figure 3-2, 8 clones indépendants positifs exprimant des protéines pouvant être des candidats d'interaction avec la protéine Btp1, 16 candidats potentiels d'interaction avec Btp1_{TIR} et 3 candidats potentiels d'interaction avec Btp2. Les milieux ont été vérifiés par la croissance attendue ou non de 6 contrôles (détails à la figure 3-2).

Partenaires d'interaction	Annotations par GenBank
Crible Btp1	
1	Solute carrier family 35, member C2 (SLC35C2), transcript variant 1
2	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)
3	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1
4	Transmembrane channel-like 8 (TMC8) ou Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)
5	Homo sapiens caldesmon 1 (CALD1), transcript variant 1 2,3,4 ou5
6 et 8	Solute carrier family 38, member 3 (SLC38A3)
7	Chromosome 22 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)
Crible Btp1_{TIR}	
1	Mesoderm development candidate 2 (MESDC2)
2, 3, 7, 8, 12	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase9 (PSMD9), mRNA
4, 15	TAO kinase 2 (TAOK2), transcript variant 2
5, 6	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1 (ASCC3L1) OU similar to U5 snRNP-specific protein, 200kDa (LOC652147)
9	Coagulation factor XI (plasma thromboplastin antecedent)(F11), transcript variant 2
10, 11, 14	Chromosome 18 genomic contig, alternate assembly
13	Deltex homolog 2 (Drosophila) (DTX2)
16	Solute carrier family 38, member 3 (SLC38A3)
Crible Btp2	
1	amplified in osteosarcoma (OS9), transcript variant 1
2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1 (SMARCA1), transcript variant 2
3	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6 (CYP2B6)

Tableau 3-1 : **Annotation de la séquence de l'ADNc contenu dans les plasmides exprimés par les différents candidats d'interaction.** L'annotation est donnée par Genbank. Les numéros des candidats correspondent aux numéros attribués aux levures présentées sur la figure 3-2.

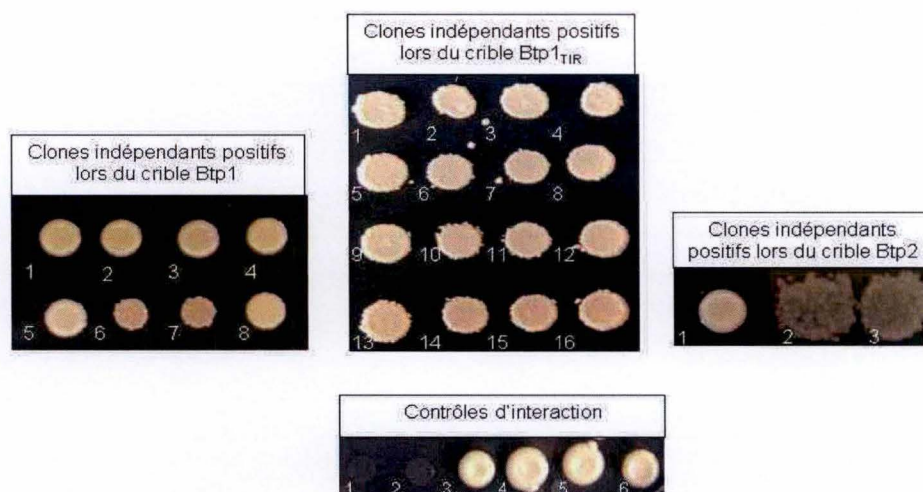


Figure 3-2 : Clones positifs sur le milieu SC-L-W-H+3AT 10mM Les levures poussent sur milieu *synthetic complete* dépourvu de leucine, de tryptophane et d'histidine supplémenté de 10 mM en 3AT (SC-L-W-H +3AT 10mM) permettant la sélection des levures diploïdes contenant le transactivateur Gal4 reconstitué. Les contrôles d'interactions sont un contrôle négatif, levure contenant les plasmides (1), un contrôle d'une interaction faible (2), une interaction moyenne (3) et trois contrôles positifs (4-5 et 6).

1.1.2. Extraction et identification des vecteurs d'expression des protéines d'interaction

L'identification de la protéine proie exprimée par chaque clone positif nécessite l'isolement et le séquençage de l'insert du vecteur pACT2 qui l'encode.

Les plasmides de chaque clone positif ont été extraits. Nous avons utilisé la souche d'*E. coli* KC8 qui est auxotrophe pour la leucine, le tryptophane et l'histidine afin de ne sélectionner uniquement que les pACT2. Pour ce faire, les KC8 sont transformées par les plasmides extraits des levures et sélectionnées sur un milieu M9 déplété en leucine et supplémenté en ampicilline. Le pACT2 contient le gène LEU2 qui permet la complémentation du gène analogue *leu2*, ce gène analogue est manquant dans les souches KC8. La présence d'ampicilline permet la sélection du pACT2 par la présence d'un gène de résistance à l'ampicilline. Ils ont été amplifiés dans la souche *E. coli* DH10B. Avant le séquençage, les plasmides ont été extraits des souches DH10B et restreint par l'enzyme BglII. Cette enzyme permet de cliver les plasmides de part et d'autre du site d'insertion. La restriction diagnostique permet de vérifier la présence du pACT2 et d'observer des différences de taille d'insert entre deux candidats différents. Par exemple, à la figure 3-3, on observe la restriction des plasmides portant les candidats d'interaction 6 et 8 de Btp1_{TIR}. Les bandes à 8 000 pb correspondent à la matrice et les autres bandes correspondent à l'insert. Le séquençage nous a permis d'identifier 7, 8 et 3 partenaires d'interaction respectivement pour Btp1, Btp1_{TIR} et Btp2 qui sont repris dans le tableau 3-1. Certains ont été retrouvés plusieurs fois dans des clones positifs indépendants. Chaque numéro correspond à la numérotation attribuée aux clones positifs indépendants sélectionnés lors du crible double hybride (Tableau 3-1).

Résumé des faux positifs le plus souvent retrouvés lors de cribles double hybride en levures.
Adapté à partir du site WWW-site of E. Golemis (44-45).

Proteine	Trouvées comme faux positifs	Considérées comme interactant
hsp's	16	5
ribosomal proteins	14	1
cytochrome oxidase	5	-
mitochondrial proteins	3	1
proteasome subunits	4	3
ferritin	4	-
tRNA synthase	3	-
collagen-related proteins	3	-
Zn finger proteins	3	4
vimentin	2	-

Tableau 3-2 : **Proportion de certaines protéines retrouvées soit comme véritable partenaire d'interaction soit comme faux positif dans des cribles double hybride en levure indépendants** Le nombre de fois où la protéine est identifié est différente pour chaque protéine, par exemple les hsp's ont été identifié dans 21 cribles différents et dans 16 cribles, l'interaction avec cette protéine est un faux positif (Van Crielinge et Beyaert, 1999).

1.1.3. Identification des faux-positifs

La technique du double hybride en levure est connue pour générer des faux positifs, certaines protéines sont connues pour être des faux positifs dans de nombreux cribles double hybride indépendants (tableau 3-2) (Van Crielinge et Beyart, 1999). Certains candidats d'interaction tels que la protéine d'une sous-unité du protéasome, la protéine hsp ou encore la protéine du cytochrome C sont des faux positifs dans notre situation.

Un candidat d'interaction est considéré comme un faux-positif si son expression ou sa localisation sont différentes de la protéine appât. Le facteur de coagulation a peu de chance *in vivo* d'être en contact avec la protéine Btp1_{TIR}. Cette protéine est dès lors considérée comme un faux positif.

Certaines protéines exprimées dans les levures ne correspondent pas aux protéines prédites. En effet, les protéines appâts sont le résultat de la traduction d'ADNc qui ont été formés par la rétrotranscription d'ARNm. La rétrotranscription est permise par la rétrotranscriptase qui à l'aide de primer transcrit l'ARNm en ADNc. Cette enzyme peut s'arrêter à beaucoup d'endroits différents, soit à la fin de l'ARNm soit au milieu ou après quelques bases. Ce qui signifie que l'ADNc inséré dans les vecteurs ne permet pas toujours la traduction en phase de la protéine avec le Gal4AD du vecteur. Ce qui est le cas des candidats d'interaction 4 et 15 avec Btp1_{TIR}. Ces cas précis seront discuté plus loin. La reproduction de cette interaction est également une condition pour ne pas considérer les protéines proies comme des faux positifs.

1.1.4. Confirmation des interactions en levure

Le but de la confirmation de l'interaction en levure est d'éliminer les faux positifs de l'étude réalisée. Les plasmides pACT2 identifié et les plasmides pVV212-Btp1, pVV212-Btp1_{TIR} et pVV212-Btp2 ont été transformés respectivement dans la souche Y187 et AH109. Les levures sont croisées sur milieu riche et elles sont répliquées sur un milieu sélectionnant l'interaction à l'aide du gène rapporteur *HIS3* et à l'aide du second gène rapporteur *ADE2* qui code pour une enzyme permettant la synthèse de l'adénine (A), ce qui permet la croissance des levures lors d'une interaction sur milieu dépleté en histidine et en adénine (figure 3-4).

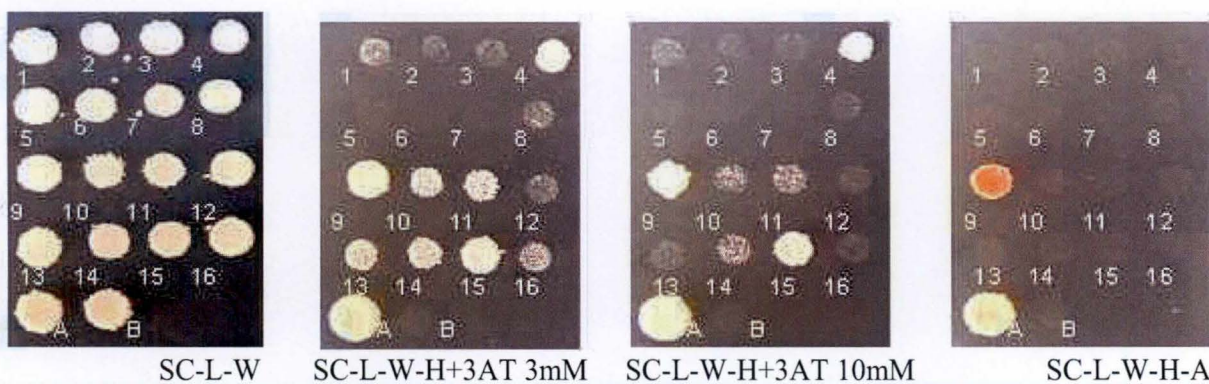


Figure 3-4 : **Confirmation des interactions identifiées lors du crible Btp1_{TIR}.** Toutes les levures poussent sur le milieu SC-L-W. Sur le milieu le moins stringent, le milieu SC-L-W-H+3AT 3mM, les candidats d'interactions 4, 9, 10, 11, 13, 14 et 15 poussent ce qui confirme ces interactions. Sur le milieu SC-L-W-H+3AT 10 mM, les candidats 4, 9 et 15 poussent et sur le milieu le plus stringent, le milieu SC-L-W-H-A seule le candidat 9 pousse. Le contrôle A est le contrôle d'auto-activateur de BD- Btp1_{TIR}, cette levure contient les plasmide pVV212 Btp1_{TIR} et pACT2gw. La levure B contenant les plasmides pVV212gw et pACT2gw est le contrôle négatif.

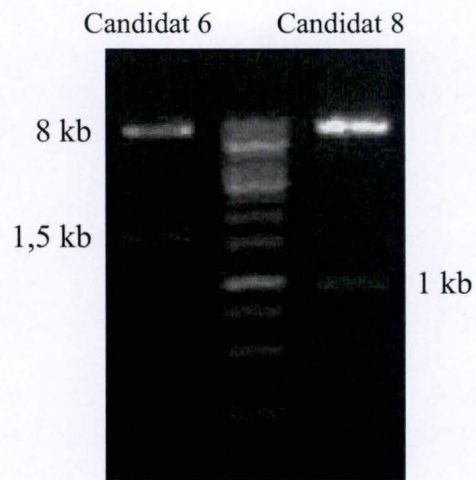


Figure 3-3 : électrophorèse en gel d'agarose montrant le résultat de la restriction diagnostique du pACT2-ADNc candidat 6 et 8 de Btp1TIR par BglII. Deux sites de restriction BglII bordent le site d'insertion de l'ADNc. Le profil attendu est obtenu avec au moins une bande de 8 kb correspondant à la matrice du pACT2. Les bandes à 1,5 kb et à 1 kb suggèrent que les protéines candidates d'interactions sont différentes.

Toutes les levures exprimant un partenaire d'interaction et Btp1_{TIR} poussent sur milieu SC-L-W sélectionnant les levures diploïdes. La protéine exprimée par le candidat 13 annotée dans le tableau 3-1 comme '*deltex homolog 2 Drosophila*', et la protéine exprimée par les candidats 10, 11 et 14 annotés comme '*chromosome 18 genomic contig, alternate assembly*' interagissent avec la protéine Btp1_{TIR}. Ces interactions ont été observées sur le milieu moins stringent sélectionnant la reconstitution du Gal4 fonctionnel, le milieu SC-L-W-H+3AT 3mM. L'interaction entre les candidats 4 et 15 annotés comme tous deux comme '*TAO2 transcrit variant 2 ou TAO2α*' et Btp1_{TIR} a été vérifiée sur le milieu SC-L-W-H+3AT 10mM. Ces deux candidats d'interaction seront annotés protéine 4-15 par la suite. L'interaction avec le candidat 9 annoté comme le '*coagulation XI factor*' et la protéine Btp1_{TIR} sur le milieu le plus stringent (SC-L-W-H-A) a également été vérifiée, cette interaction s'avère être plus forte que les autres. Le contrôle d'auto-activateur BD- Btp1_{TIR} était positif sur les milieux sélectifs. Et le contrôle négatif exprimant uniquement les sous-unités AD et BD de Gal4 s'est avéré négatif sur les milieux de sélection de l'interaction.

Malgré la croissance de toutes les levures transformées par pVV212-Btp1 ou pVV212-Btp2 et les pACT2 sur milieu SC déplété en L et en W, aucune croissance n'a été observé sur milieu SC déplété en L, en W, en H et complémenté en 3AT 10mM (SC-L-W-H+3AT 10mM) (figure 3-5 et 6). Plusieurs contrôles ont été utilisés : les contrôles d'auto-activation de BD-Btp1 et BD-Btp2 qui étaient déjà connus pour être négatif n'ont pas poussé, le contrôle négatif ne pousse pas sur milieu sélectionnant l'interaction. Nous avons voulu utilisé un contrôle positif mettant en évidence l'interaction entre la protéine Btp1 et MyD88 car cette interaction avait été identifiée par Cirl et *al.* en 2008 par GST pull down. Aucune croissance de la levure exprimant ces protéines a été observé sur les milieux de culture utilisés. Les mêmes observations ont été réalisées sur milieu moins stringent ayant des concentrations moins importante en 3AT (données non montrées) (figure 3-5 et 3-6).

Aussi, seulement 8 des 16 interactions avec la protéine Btp1_{TIR} ont pu être confirmées. Les autres interactions entre les protéines appâts et les protéines Btp1 et Btp2 n'ont pas pu être confirmées. Ils sont donc considérés comme des faux positifs car les interactions n'ont pas pu être reproduite par co-transformation des vecteurs spécifiques.

2. La protéine 4-15, un faux positif intrigant

Deux candidats décrits comme des faux positifs identifiés lors du crible double hybride de la protéine proie Btp1_{TIR}, annotés tous deux comme étant un fragment de l'isoforme 2 de la protéine TAO2 ou TAO2α (*Thousand And One amino-acid 2*), nous ont intrigué. Les deux plasmides pACT2 exprimant ce fragment de protéine sont identiques. Les fragments proviennent de la même rétrotranscription de l'ARNm de TAO2α.

L'insertion de l'ADNc dans le vecteur de destination du système Gateway, le pACT2gw, ne permet pas l'expression du fragment de la protéine TAO2α en phase avec le Gal4AD. La protéine exprimée en levure n'est dès lors pas la protéine prédite. Les deux candidats ont été comparé à un candidat annoté comme TAO2α lors d'un crible double hybride en levure d'une banque d'ADNc de leucocytes humains par Btp1_{TIR}. Ce candidat identifié était également un faux-positif de par la fusion de l'ADNc sur le vecteur qui ne permettait pas l'expression d'un fragment de la protéine TAO2α en phase avec le Gal4AD.

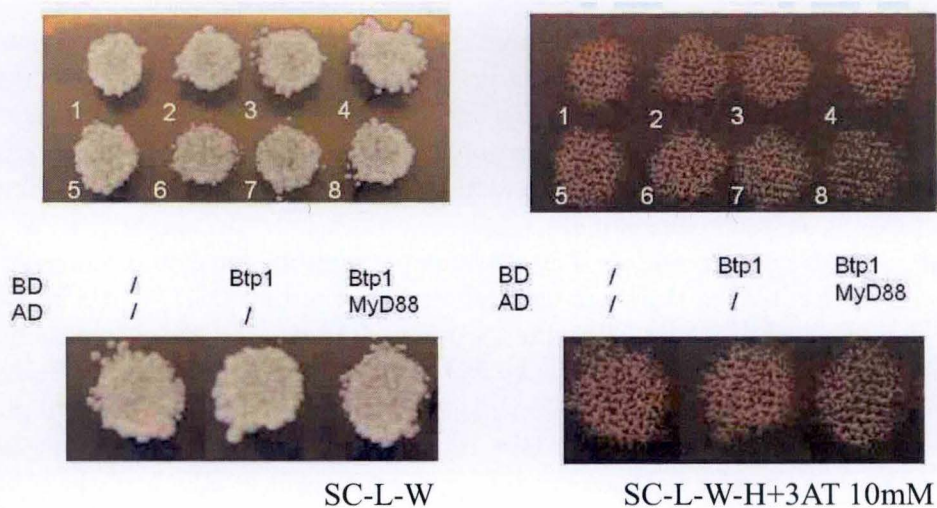


Figure 3-5 : **Confirmation des interactions identifiées lors du crible Btp1.** Sur milieu SC-L-W, les levures diploïdes sont sélectionnées par la reconstitution du facteur Gal4 qui permet la croissance des levures sur un milieu dépourvu d'histidine. Sur le milieu SC-L-W+3AT 10 mM aucune levure ne pousse.

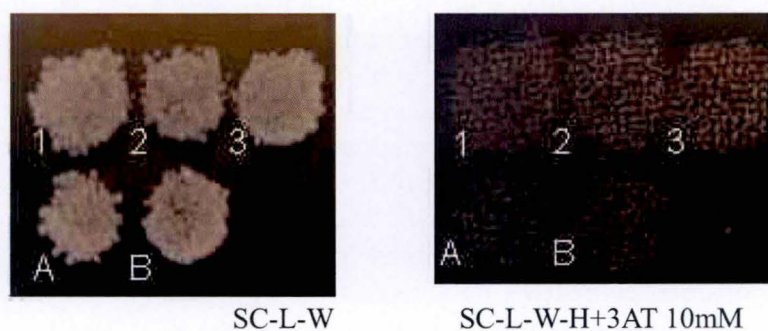


Figure 3-6 : **Confirmation des interactions identifiées lors du crible Btp2.** Les levures poussent sur milieu SC-L-W mais aucune ne poussent sur SC-L-W-H+3AT 10 mM. Le contrôle d'auto-activateur BD-Btp2 ne pousse pas sur le milieu sélectif, cette levure contient les plasmides pVV212 Btp2 et pACT2gw (A). La levure contenant les plasmides pVV212gw et pACT2 gw est le contrôle négatif (B)

2.1. Comparaison de la protéine 4-15 et du candidat provenant du crible d'une banque d'ADNc de leucocyte humain

Le crible double hybride en levure d'une banque d'ADNc de leucocytes humains par Btp1 réalisé au sein du laboratoire avait identifié un faux positif annoté 'TAO2 α '. Ce candidat s'est avéré être un faux-positif par l'analyse du séquençage au même titre que les deux candidats identifiés lors de notre crible double hybride. TAO2 α est une MAP3K impliquée dans les voies de signalisation lors de stress osmotique par exemple. Cette protéine comporte deux domaines principaux : le domaine N-terminal sérine thréonine kinase et le domaine C-terminal coil coiled (figure 3-7). Le domaine sérine thréonine kinase est capable de phosphoryler des protéines cibles. Le domaine coil coiled est quant à lui décrit comme capable d'interagir avec d'autres domaines coil coiled. Le séquençage des vecteurs permettant l'expression des candidats d'interaction 4 et 15 avec Btp1_{TIR} a permis de comparer les protéines normalement exprimées par les levures avec le candidat identifié lors du crible indépendant du notre. La comparaison des deux séquences protéiques des candidats d'interaction (les deux séquences protéiques en vert sur les figures 3-8 et 3-9) nous permet d'affirmer que le peptide exprimé est différent de celui qui avait été retrouvé lors du crible double hybride en levure d'une banque d'ADNc de leucocytes humains. Les résultats obtenus sont intrigant car par deux fois, une même protéine prédite est retrouvée dans deux cribles indépendants. Par l'analyse des séquences nucléotidiques des candidats 4 et 15 d'interaction avec Btp1_{TIR}, la séquence nucléotidique permet l'expression d'un peptide de 19 kDa si aucune variation du cadre de lecture n'a lieu. Ceci s'explique par l'apparition rapide d'un stop dans la séquence. Si un saut de deux nucléotides ou l'ajout d'un nucléotide a lieu, une protéine correspondant à un fragment de la protéine TAO2 α fusionné au Gal4AD et au tag HA d'une taille de 112 kDa est exprimée. Le candidat identifié lors du crible d'une banque d'ADNc de leucocytes humains formerait quant à lui une protéine de 22 kDa. Nous avons donc émis l'hypothèse que les protéines exprimées comme CI4-15 ne correspondent pas au peptide prédit. Cette hypothèse est supportée par la connaissance de changement de cadre de lecture lors de la traduction chez la levure (Henderson et *al.*, 1992).

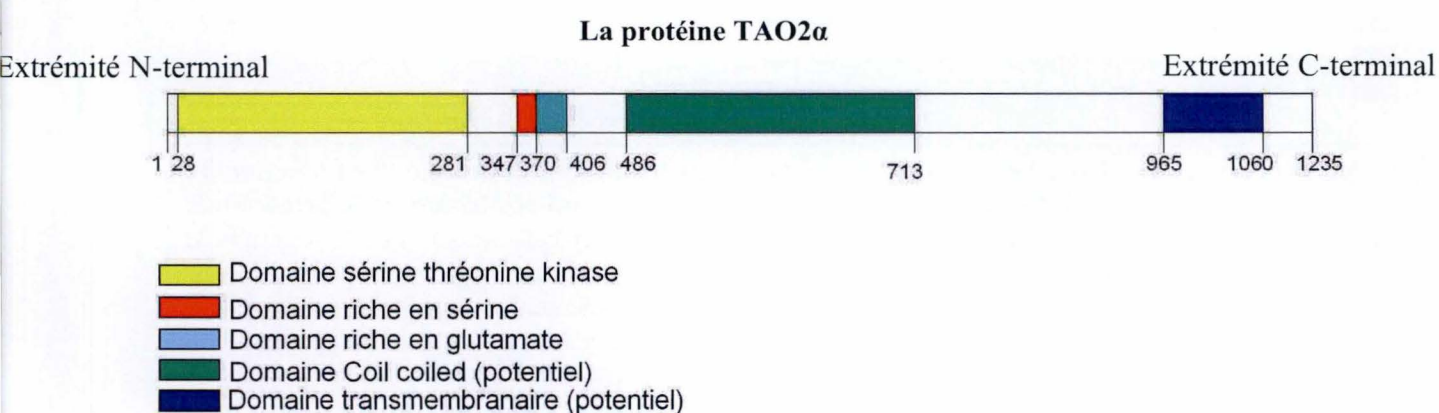


Figure 3-7 : **représentation schématique de la protéine TAO2 α (ou isoforme 2 ou transcrit variant 2)**. la protéine TAO2 transcrit variant 2 est composée de 1235 acides aminés. Le domaine sérine thréonine kinase est compris entre le résidu 28 et 281. Différents domaines riches en un acide aminé sont présents dans cette protéine tels que le domaine riche en sérine (résidu 347 à 370) et le domaine riche en glutamate (résidu 378 à 406). Un domaine coil coiled est également prédit entre les résidus 486 et 713 mais selon les programmes de prédiction, les limites de ce domaine varient. Un domaine transmembranaire est prédit allant du résidu 965 et 1060.

taccctatcagatgttccagattaccgc
AGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCTTAC
CAGATTTGTCAGAGAGAT
TGGGCCGGGGAGATGGCCATGATGCAGGAGG
 Y P V D V P B V A S L G G H H A H E R P G I L L T S L V K K V G P G R H F * C R R
 T H T H F Q I T L A H V V I W P H R P R G S * Q V C T K K L G P G D G H D A G G
 P I R C S R L R * L G W S V G H G G P G D L N K F V Q K S H

GGGAGCACACAGTCACCTCTCACAGCTCCATTATCCACC6GCTGCCGGGCTCTGACACCTATATGATGACCCCTACCAGCCAGAGATACCCCCAGCCCTCTCCAGCCGCTGCAGCCC
G S T Q S P L T A P L S T G C R A L T T V M H T P T S Q R * P P A L S S R L Q P
G A H S H L S Q L H V P P A R A G L * Q P I * * P L P A R D N P Q P S P A R C S P

- Une partie de la séquence nucléotidique de Gal4AD
- La séquence nucléotidique du tag HA
- La séquence protéique de la protéine traduite (19 kDa)
- La séquence protéique d'un fragment de la protéine TAO2 (112kDa)

Figure 3-8 : Représentation schématique de la traduction de la séquence de l'insert du pACT2-ADNc du candidat 4 et 15 d'interaction avec Btp1_{TIR} selon les trois phases de lecture possibles. La première ligne correspond à une partie de la séquence nucléotidique du pACT2-ADNc du candidat 4 et 15 avec Btp1_{TIR}. En jaune, on observe la fin de la séquence du Gal4AD et en bleu la séquence du tag HA. La ligne suivante correspond à la protéine traduite sans changement de phase. La protéine traduite qui se termine par un STOP (représenté par *) encadré en vert, cette protéine a une taille de 19 kDa. Si un saut d'un nucléotide a lieu, on aura la protéine à la troisième ligne qui sera traduite et si un saut de deux nucléotides a lieu, on obtient la protéine à la quatrième ligne qui sera traduite avec en rouge, la séquence protéique d'un fragment de la protéine TAO2 α qui va du résidu 396 à 1235. La taille de cette protéine est de 112 kDa.

acagccagctcagacatttcccaatgctaccctccatcagcctatgcccagagatttccccttcccctaccagcagccctaccgcccatttccagagagagagagagccctaccctaccagagag
N S R P A R H L P A L P P C T C P A R A S P S I S S S I A P V A R A R P S P T C T G
I R G R V D I F P C V L H A Y A P G L P L P C P A R A V A L F A G G R A L H A P G
F A R A S T S S H A T S M H H P Q G F P F P V Q Q P T P C S Q E

ccggagctctgaccagcctcagagagtagccacccagtgcccagcagctgcccacagcctccagccagagcagcctccgccaacagccctagcagatgcccctagacacagagagagagagag
R S D Q P R E * P L S A Q H V H Q R L Q P E Q L R Q Q P S R C L R Q R G R G
R D S D Q P R E * P L S A Q H V H Q R L Q P E Q L R Q Q P S R C L R Q R G R G

- La séquence nucléotidique du site de restriction EcoRI
- La séquence protéique de la protéine traduite (22 kDa)
- La séquence protéique d'un fragment de la protéine TAO2 (121kDa)

Figure 3-9 : représentation schématique de la séquence nucléotidique et protéique en fonction du cadre de lecture du candidat annoté comme étant TAO2 α lors d'un crible double hybride d'une banque de protéines humaines provenant des leucocytes par Btp1_{TIR}. Le site EcoRI a permis le clonage des ADNc, et reflète la phase de lecture de Gal 4AD, sa séquence complète est gaattc, elle est représentée en mauve. En vert, on a la protéine traduite sans changement du cadre de lecture, elle a une taille de 21kDa (*, représentation du STOP). En rouge suite à un saut de deux nucléotides, on aurait la traduction de cette protéine correspondant à un fragment de la protéine TAO2 α allant du résidu 334 au résidu 1235 et ayant une taille de 121 kDa.

2.2. Détection de la protéine 4-15 par western blot

Afin de vérifier la taille de la protéine exprimée, un western blot a été réalisé sur différents extraits protéiques. Le premier extrait est réalisé sur la souche de levure Y187 vide, aucune protéine taguée n'est détectée (figure 3-10). Le western blot réalisé sur ce premier extrait permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé. Dans le second extrait réalisé sur la souche de la levure Y187 transformée par le vecteur pACT2gw, une protéine de 33kDa est détectée. La taille de cette protéine est supérieure à la taille de la protéine normalement exprimée par le pACT2gw qui est de 20 kDa. La protéine exprimée par le pACT2gw contient le Gal4AD, le tag HA et un courte séquence d'acides aminés. Dans le troisième extrait protéique réalisé sur la souche de levure Y187 transformé par le vecteur le pACT2-ADNc '*tao2α*' du candidat 4, une protéine de 29 kDa est détectée. La taille de cette protéine est également supérieure à la taille attendue lors de la traduction de l'insert sans modification du cadre de lecture de la séquence nucléotidique par rapport au Gal 4AD et le tag HA. Les protéines ont été détectées à une taille supérieure à la taille attendue ce qui ne nous permet pas de confirmer la présence d'un fragment de la protéine TAO2α dans la levure. De plus, le changement du cadre de lecture de l'insert est un évènement rare ce qui fait que la protéine est en faible quantité et donc est difficilement détectable en western blot. Nous en traiterons plus longuement lors de la discussion.

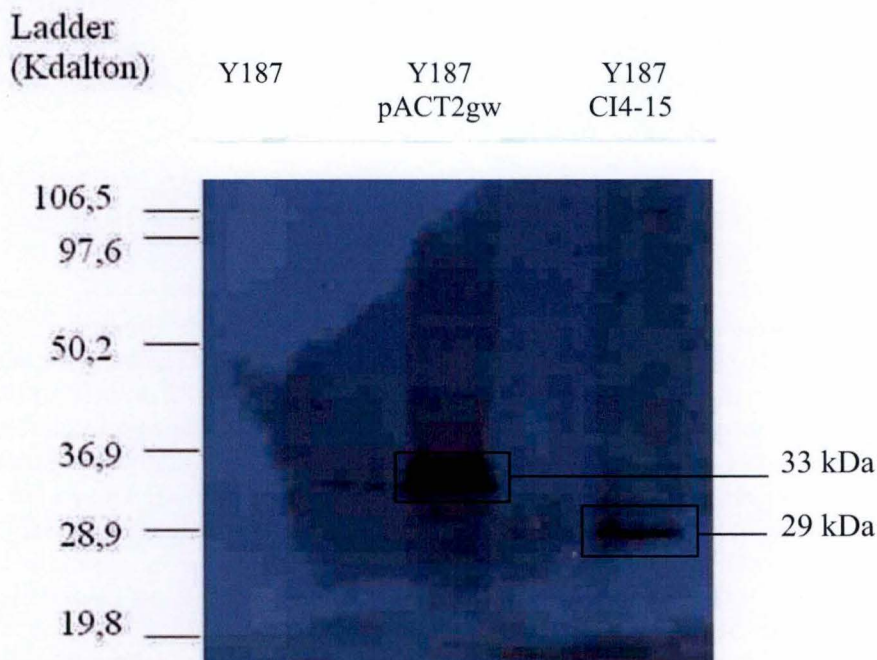


Figure 3-10 : Résultat du western blot des protéines exprimées par les levures non transformées (piste 1), contenant le plasmide pACT2gw (piste 2) et contenant le plasmide pACT2-ADNc *tao2α* (piste 3). Dans la première piste, aucune protéine n'a été détectée, ce qui est le résultat attendu car aucun vecteur permettant l'expression d'une protéine tagguée HA n'est présent. Dans la piste 2, une protéine de plus ou moins 33 kDa a été détectée, la détection d'une protéine tagguée HA est possible car le vecteur pACT2 gw permet l'expression d'une protéine de 20 kDa et dans la piste 3, une protéine de 29 kDa a été détectée.

2.3. La protéine 4-15 n'interagit pas aspécifiquement avec les domaines TIR

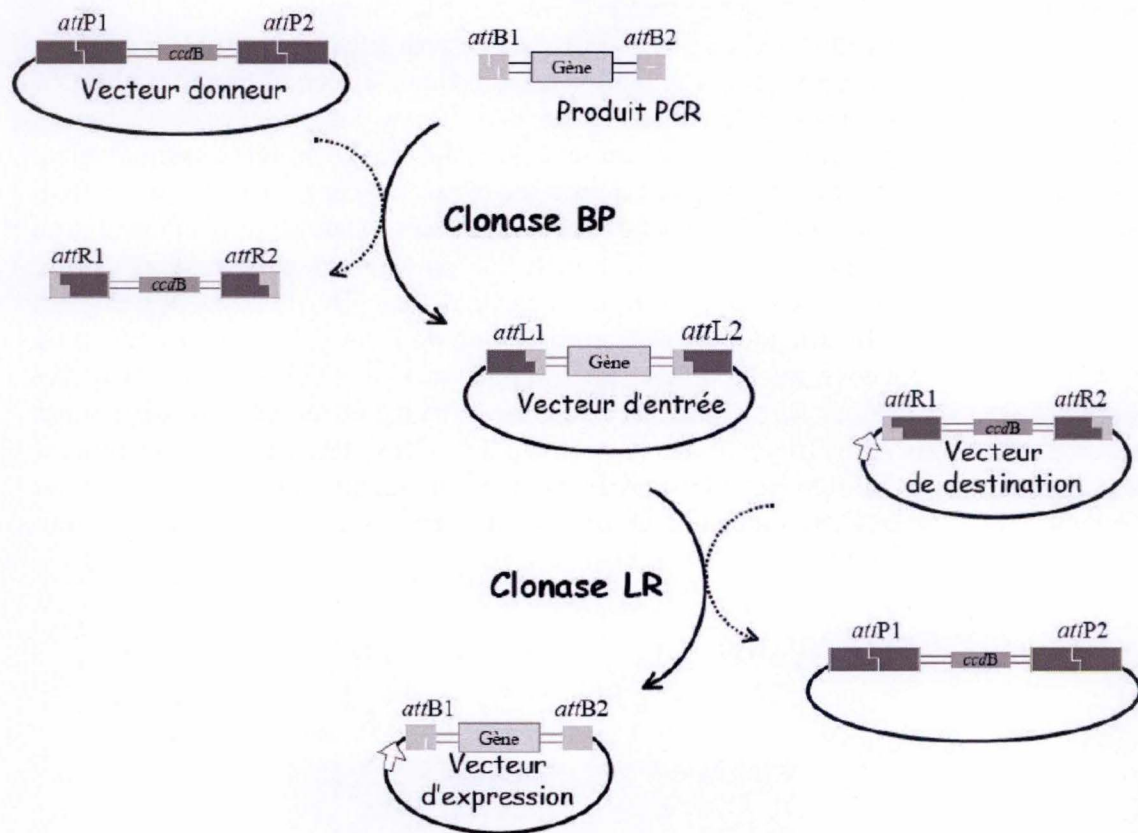


Figure 3-12 : représentation schématique du système Gateway™ de clonage.

La séquence d'intérêt est amplifiée avec des amorces portant à l'extrémité les séquences *attB1* et *attB2*. Ces séquences vont recombiner avec les séquences *attP1* et *attP2* du vecteur donneur bordant la cassette Gateway (constituée du gène *ccdB* et du gène *cat* de résistance au chloramphénicol). Cette réaction catalysée par la « BP clonase » et nommée la réaction « BP », permet le clonage directionnel du produit PCR. Le vecteur résultant est nommé vecteur d'entrée et porte l'insert bordé des sites *attL1* et *attL2*. L'obtention du vecteur d'entrée permet, par la suite, le clonage de l'insert en une étape dans des vecteurs aux caractéristiques variées. Les sites *attL1* et *attL2* de celui-ci vont recombiner avec les sites *attR1* et *attR2* bordant la cassette Gateway du vecteur de destination. Ceci permet le transfert de l'insert vers le vecteur de destination et est catalysé par la « LR clonase ».

L'apparition d'une interaction entre une protéine contenant un domaine TIR et une autre protéine ne contenant pas de domaine TIR paraît étonnant. Les domaines TIR sont en effet connus pour interagir entre eux. Nous avons dès lors testé la spécificité de l'interaction entre la protéine 4-15 qui ne contient pas de domaine TIR et la protéine Btp1_{TIR}. Pour ce faire, un test de croissance sur milieu sélectif d'interaction a été réalisé en testant la capacité de la protéine 4-15 d'interagir avec d'autres domaines TIR des différents TLRs humains. L'interaction entre la protéine 4-15 et Btp1_{TIR} est une nouvelle fois vérifiée et aucune interaction entre la protéine 4-15 et les différents domaines TIR des TLRs n'est observée (figure 3-11). De plus, on observe une spécificité au niveau des différentes Btp car la protéine 4-15 n'interagit qu'avec Btp1_{TIR}. L'homodimérisation de MyD88 a été utilisée comme contrôle positif. Ce contrôle est positif sur les différents milieux excepté sur le milieu SC-L-W-H+3AT 10 mM, où on observe une faible croissance de la levure. Le contrôle d'auto-activateur AD-Btp1_{TIR} apparaît positif comme lors des tests précédents. La croissance du contrôle d'auto-activateur sur les milieux spécifiques est probablement dû à l'interaction entre la protéine exprimée par les vecteurs et pas une auto-activation par Gal4AD- Btp1_{TIR}. En effet, si la protéine AD- Btp1_{TIR} était un auto-activateur, toutes les levures permettant son expression pousseraient sur milieu sélectif. Ce qui nous permet de conclure que l'interaction est spécifique entre Btp1_{TIR} et la protéine 4-15.

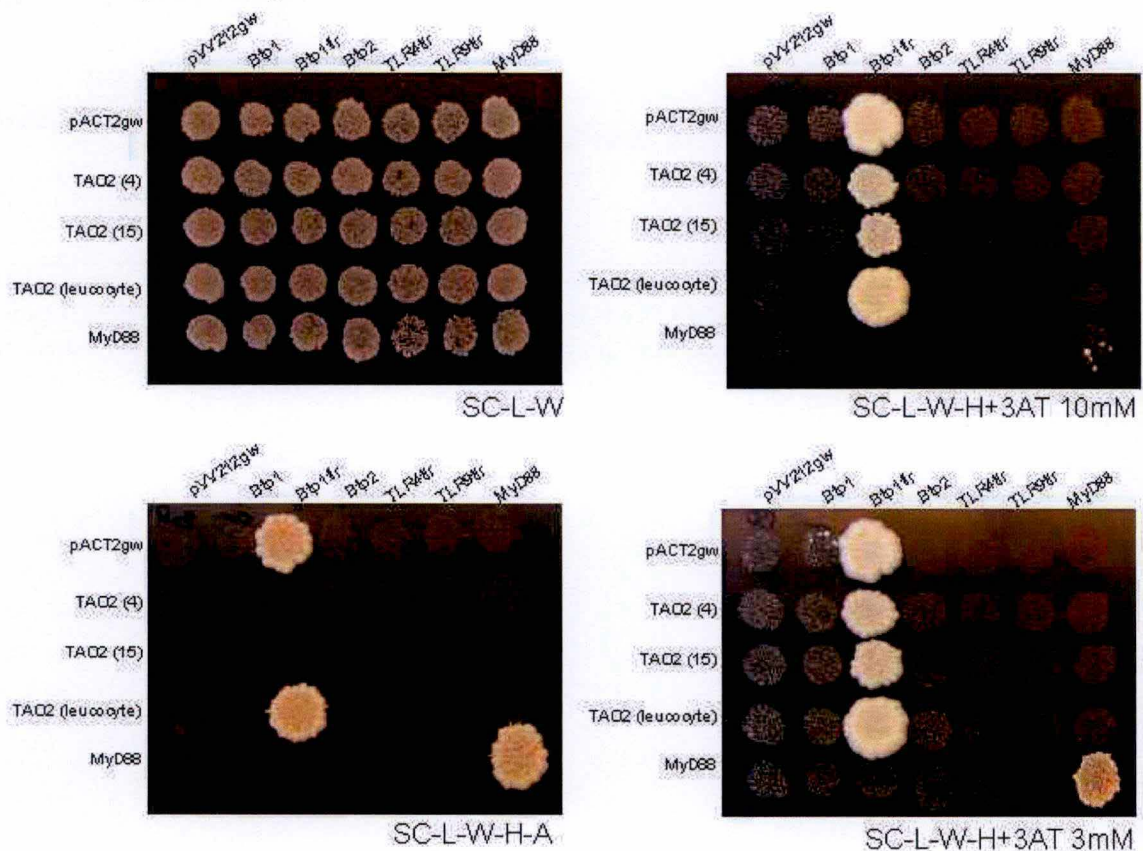


Figure 3-11 : résultats du test d'interaction entre le domaine TIR des TLRs et la protéine d'interaction 4-15. L'interaction entre la protéine d'interaction 4-15 et la Btp1_{TIR} est une nouvelle fois observée. Le contrôle positif comprend la levure diploïde comprenant le plasmide pACT2 MyD88 et pVV212 MyD88, la levure pousse sur les milieux SC-L-W-H+3AT 3mM, SC-L-W-H-A et de manière plus faible sur le milieu SC-L-W-H+3AT 10mM.

3. Le fragment Cterm de TAO2α fusionné en phase avec Gal4AD

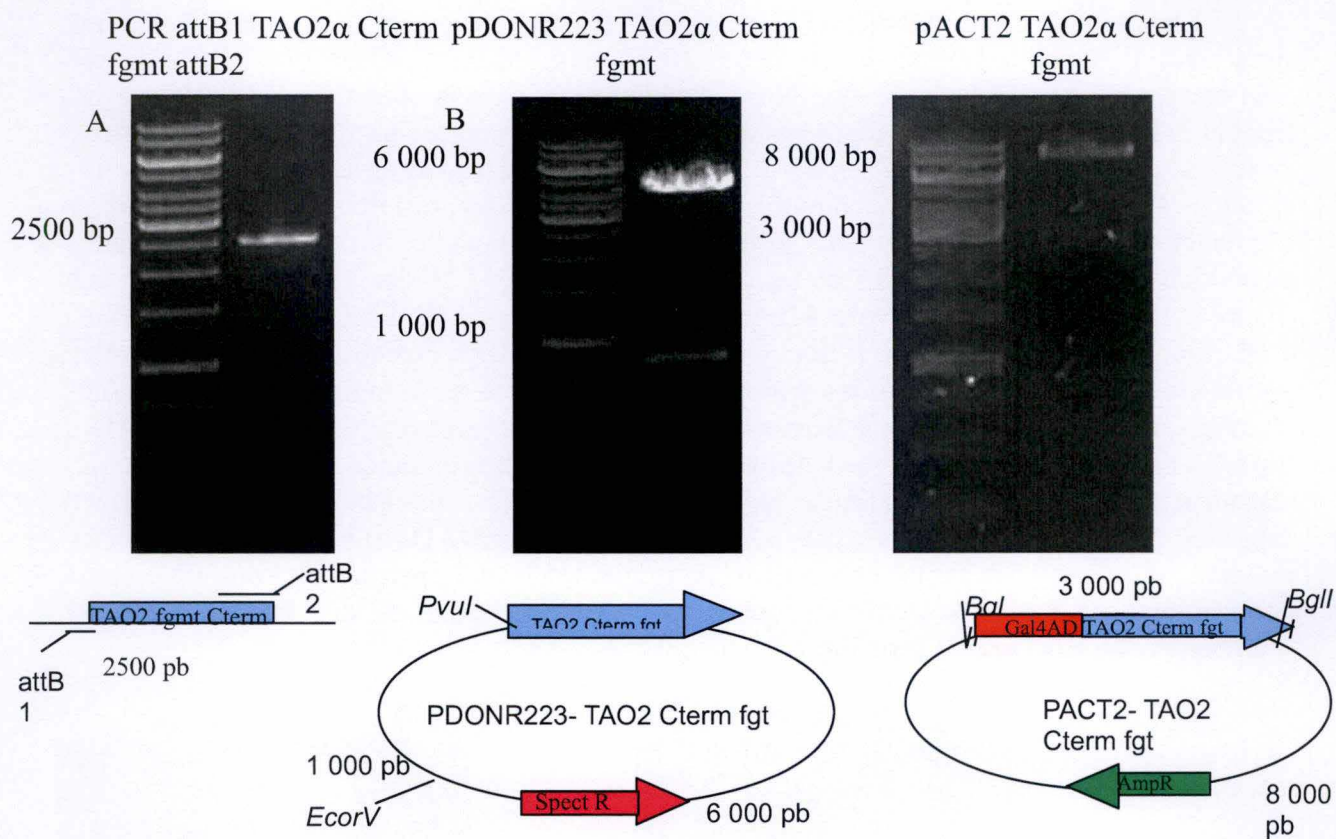


Figure 3-13 : électrophorèse en gel d'agarose montrant les résultats obtenus à différentes étapes de la construction du pACT2 TAO2α Cterm fragment. Les résultats du produit d'amplification de *tao2α cterm fragment* ont une taille de 2500 bp qui correspond à la taille attendue (A). Ainsi que le produit de la restriction du pDONR223 TAO2α Cterm fragment par *PvuI* et *EcoRV* qui permet de couper le vecteur en deux fragments(B). Le résultat de la restriction par *BglII* du pACT2 TAO2α Cterm fragment (C).

Jusqu'à présent, nous n'avons aucune preuve que la protéine TAO2 α fusionnée au Gal4AD s'associe avec Btp1_{TIR}. Afin de vérifier l'hypothèse d'une éventuelle interaction entre ces deux protéines, nous avons commencé par la construction d'un vecteur permettant l'expression du fragment Cterm de la protéine TAO2 α fusionné au Gal4AD. Nous avons également changé les vecteurs de destination portant les gènes des différentes Btp pour permettre une fusion de celles-ci à un tag afin de détecter les protéines par la suite lors d'un western blot. Pour réaliser les différentes constructions des vecteurs, nous avons utilisé le système GatewayTM de clonage qui permet de cloner une même séquence nucléotidique dans différents vecteurs (figure 3-12). Nous avons testé l'interaction en levure du fragment Cterm de la protéine TAO2 α et Btp, qui ont ensuite été détectés par un western blot afin de s'assurer de la présence des protéines. Par la suite, nous avons tenté une coimmunoprécipitation en levure des protéines pour isoler les deux protéines interagissantes.

3.1. Construction du vecteur permettant l'expression du fragment C-term de TAO2 α en phase avec Gal4AD

Afin de permettre l'expression du fragment Cterm de la protéine TAO2 α fusionné au Gal4AD et au tag HA, nous avons amplifié le fragment de la séquence nucléotidique *tao2 α* provenant des deux candidats d'interaction identifiés par PCR et l'avons cloné dans un plasmide donneur, le pDONR223 par réaction BP (figure 3-13 A). Une étape de séquençage a permis de s'assurer de l'insertion en phase avec le Gal4AD de l'insert. Et une restriction diagnostique du pDONR223 TAO2 α Cterm fragment a été réalisée afin de s'assurer de la présence du bon plasmide. Ensuite, par réaction LR la séquence *tao2 α Cterm fragment* a été insérée dans le pACT2gw. Le produit de la réaction LR a été restreint par une enzyme également dans le but de vérifier la bonne construction du plasmide (figure 3-13 B et C).

Les plasmides pVV212 Btp1-1_{TIR}-2 permettent la fusion des protéines Btp au Gal4BD mais aucun tag ne permet la détection par un western blot des ces protéines. Afin de détecter ces protéines dans les levures, nous avons changé les vecteurs d'expression des protéines Btp (figure 3-14).⁵

3.2. Détection des protéines TAO2 α Cterm fgmt et Btp des levures et test d'interaction entre elles

En sachant que différents problèmes ont été rencontrés du point de vue de l'expression des protéines dans les levures. Différents western blot ont été réalisés et ont permis de s'assurer de la bonne expression des protéines Btp1- Btp1_{TIR}-Btp2 et du fragment Cterm de la protéine TAO2 α . La souche AH109 de *S. Cerevisiae* a été transformée par chaque plasmide. Une extraction protéique et un western blot ont été réalisés sur ces différentes souches. L'anticorps anti-Flag a permis de détecter les protéines Btp's tagguées Flag. Pour le fragment de la protéine TAO2 α , nous avons utilisé l'anticorps anti-HA permettant la détection de la protéine TAO2 α . Cterm fgmt tagguée HA. Des bandes ont été détecté à des tailles de 48 kDa, 32 kDa, 38 kDa et de 117 kDa correspondant respectivement aux protéines Btp1- Btp1_{TIR}-Btp2 et au fragment Cterm de la protéine TAO2 α . La taille de chaque protéine correspond plus ou moins aux tailles attendues. (figure 3-15).

⁵ Pour ce faire, nous avons amplifié les différentes séquences nucléotidiques btp bordées par les séquences attB1 et attB2. Le pDONR201gw habituellement utilisé dans le laboratoire a une cassette de résistance à la kanamycine qui est également porté par le vecteur de destination pGBKT7gw. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé les vecteurs donneurs pDONR223gw qui ont une cassette de résistance à la spectinomycine. Les vecteurs de destination, les pGBKT7gw, permettent la fusion des différentes protéines Btp avec le Gal4BD et le tag flag

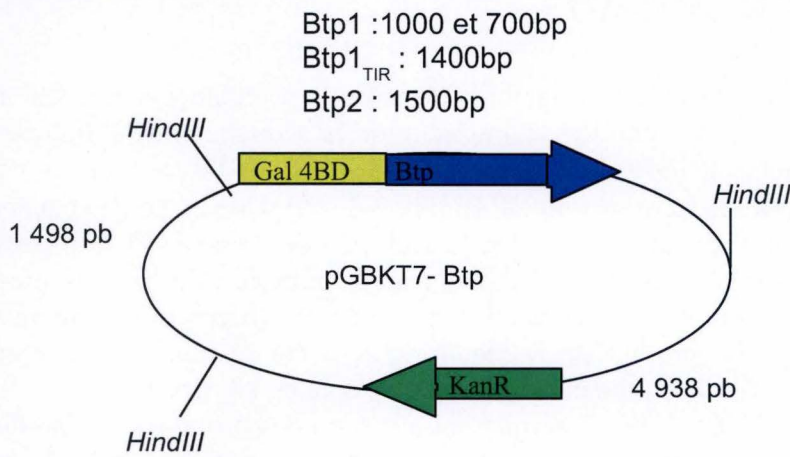
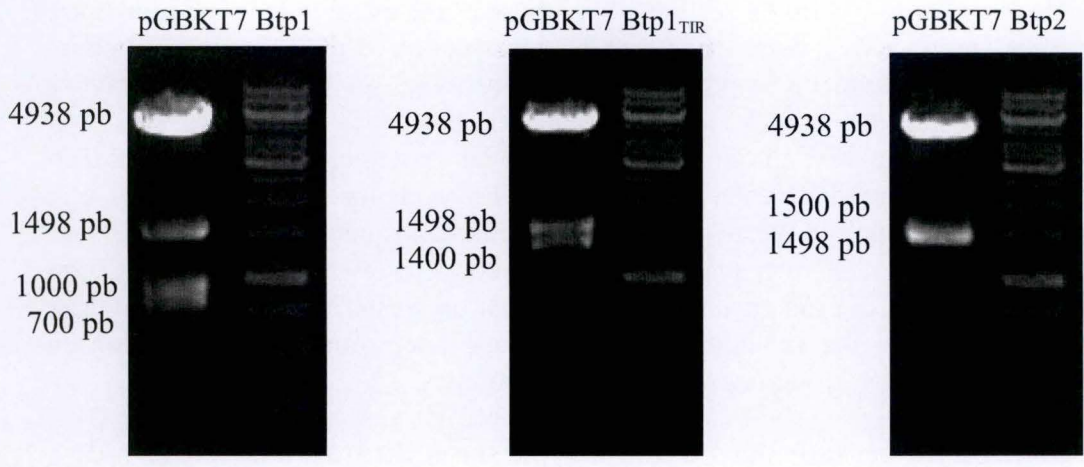


Figure 3-14 : électrophorèse en gel d'agarose montrant la construction des vecteurs pGBKT7 Btp1-Btp1_{TIR}-Btp2. Les étapes de construction sont la formation du produit PCR à l'aide d'amorce contenant les séquences attB1 et attB2 permettant l'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur d'entrée pDONR223. Par une réaction LR, les séquences d'intérêt sont insérées dans les vecteurs de destination pGBKT7gw. Une restriction diagnostique a été réalisée par l'enzyme *HindIII*. Qui permet pour de cliver quatre fois le vecteur pGBKT7-Btp1, trois fois le vecteur pGBKT7- Btp1_{TIR} et deux fois le vecteur pGBKT7-Btp2. La séquence de Btp1 contient un site de restriction *HindIII*.

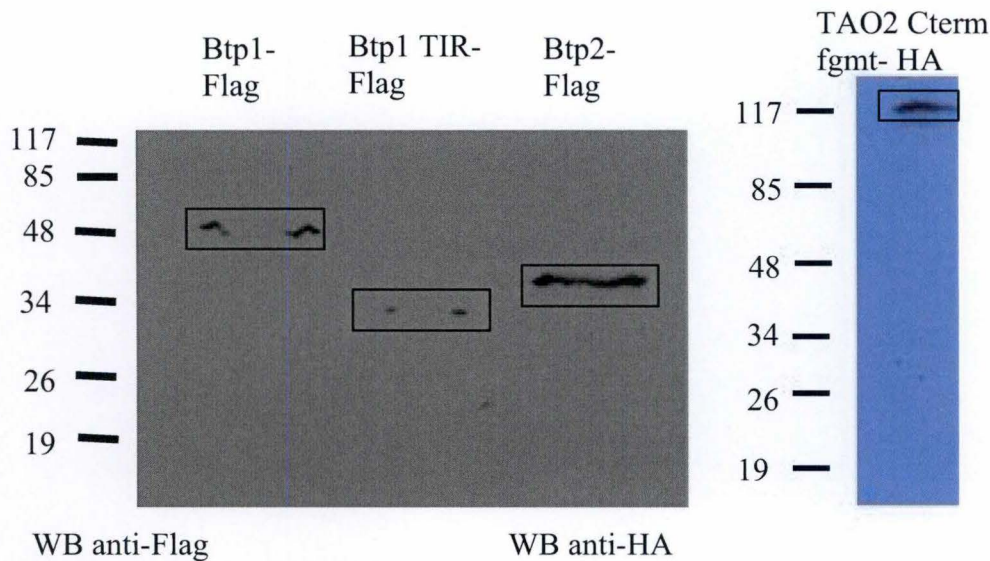


Figure 3-15 : Détection des protéines exprimées dans les levures transformées par le pACT2-TAO2 α Cterm fgmt, le pGBKT7 Btp1, le pGBKT7 Btp1_{TIR}, le pGBKT7 Btp2. Les protéines détectées à l'aide de l'anticorps anti-flag ont une taille de 48 kDa pour Btp1 flag , de 32 kDa pour Btp1_{TIR}-flag et de 38 kDa pour Btp2-flag. Ces tailles correspondent plus ou moins au taille attendue à savoir 42 kDa pour Btp1, 36 kDa pour Btp1_{TIR} et de 38 kDa pour Btp2. La protéine détectée par l'anticorps anti-HA a une taille de 117kDa ce qui correspond à la taille du fragment Cterm de la protéine TAO2 α .

Nous avons également testé la croissance des levures sur le milieu de croissance SC-L-W-H + 3AT 5 mM sélectionnant la reconstitution du facteur de transcription Gal4 suite à l'interaction entre deux protéines. On observe que les levures contenant les plasmides permettant l'expression des protéines Btp1 ou Btp1_{TIR} et du fragment Cterm de la protéine TAO2 α ne poussent pas sur le milieu sélectif d'interaction. Lorsque la levures contient le fragment Cterm de la protéine TAO2 α et une des deux Btp, la levure pousse sur le milieu sélectif. Le fragment Cterm de TAO2 α mise en phase continue d'interagir avec la protéine Btp1_{TIR}. Pour la première fois, on observe l'interaction entre le fragment Cterm de TAO2 α et Btp1. Sachant que Btp1_{TIR} est la protéine Btp1 tronquée, l'interaction entre le fragment Cterm de TAO2 α et Btp1 est dès lors attendue (figure 3-16).

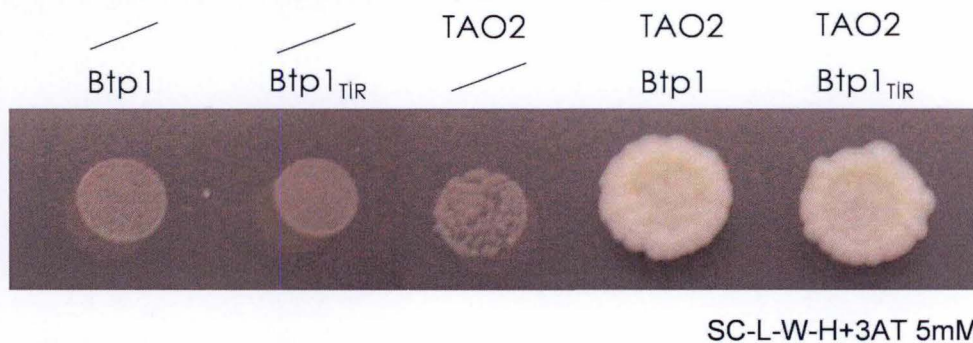


Figure 3-16 : résultat du test d'interaction entre le fragment Cterm de TAO2 α et les protéines Btp1 et Btp1_{TIR}. Les levures ne contenant que les protéines Btp1, Btp1_{TIR} ou le fragment Cterm de TAO2 α ne pousse pas. Par contre, les levures contenant le fragment Cterm de TAO2 α et une Btp pousse sur milieu sélectionnant la reconstitution du facteur de transcription Gal 4. C'est la première fois que l'interaction entre le fragment CtermTAO2 α et Btp1 est observé.

3.3. Tentative de coimmunoprécipitation de TAO2 α Cterm fgmt et Btp en levures

Afin de confirmer l'interaction, nous avons tenté de réaliser une coimmunoprécipitation sur les levures cotransformées par les plasmides permettant l'expression des protéines TAO2 α Cterm fgmt, Btp1 et Btp1_{TIR}.

La coimmunoprécipitation permet de purifier une protéine grâce à un anticorps dirigé contre celle-ci, ce qui permet la co-purification de la protéine qui interagirait avec la première. Pour ce faire, une extraction protéique a été réalisé sur les souches de levures contenant les vecteurs suivants:

- soit le pACT2-TAO α Cterm fgmt (taggé HA) et le pGBKT7gw,
- soit le pACT2gw et le pGBKT7-Btp1 (taggé Flag),
- soit le pACT2gw et le pGKBKT7-Btp1_{TIR} (taggé Flag),
- soit le pACT2-TAO α Cterm fgmt et le pGBKT7-Btp1,
- soit le pACT2-TAO α Cterm fgmt et le pGBKT7-Btp1_{TIR}.

La CoIP a été réalisé à l'aide de billes portant les anticorps souris anti-HA donc le fragment Cterm de TAO2 α est précipité et les protéines interagissant avec sont dès lors coimmunoprécipitées. Après la CoIP, les extraits sont déposés sur gel SDS-PAGE et une détection par l'anticorps anti-Flag est excécutée et est suivie par une détection par l'anticorps anti-HA. Aucune protéine n'a pu être détectée suite à la coimmunoprécipitation. Seuls les anticorps anti-souris utilisés pour la CoIP ont été détectés en se liant aux anticorps secondaires anti-souris. Une partie des extraits protéiques n'ayant pas subi la CoIP a été déposé sur le gel SDS et a subi les mêmes détection que les extraits protéiques après la CoIP. Aucune protéine n'a été détectées dans ces extraits. Aucun contrôle de détection n'a été déposé sur le gel (figure 3-17).

Western blot avant la CoIP

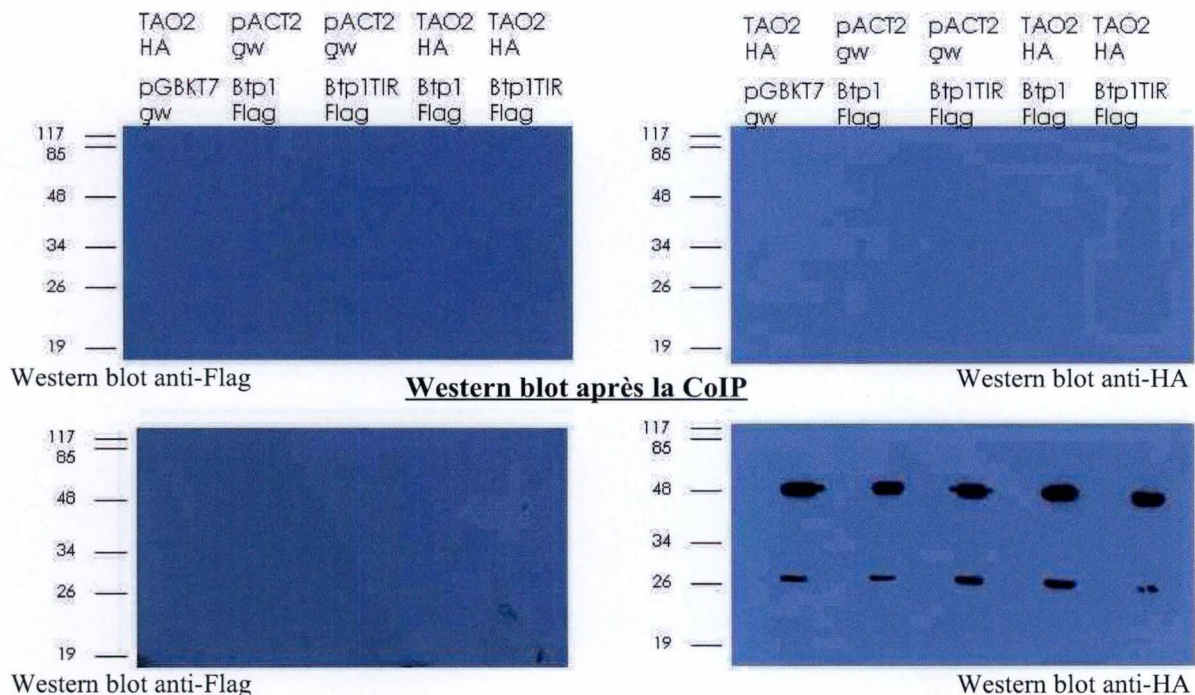


Figure 3-17 : **résultat de la détection des protéines avant et après la CoIP.** Les deux premiers western blot ne détecte aucune protéine taggée Flag ou HA, les extraits sont déposés sur gel avant la CoIP. Les deux western blots suivants permettent la détection des anticorps souris anti-HA utilisés lors de la CoIP lors de la détection à l'aide des anticorps anti-HA. Ces résultats font supposé que les protéines ne sont pas solubles et donc ne sont pas utilisables pour la CoIP.

Suite aux résultats de la CoIP, l'hypothèse que les protéines ne sont pas solubles est émise. En effet, la CoIP est réalisée sur les extraits protéiques solubles ce qui signifie que si les protéines ne sont pas soluble, la CoIP ne sera pas efficace. Afin de tester cette hypothèse, une extraction protéique totale et soluble a été réalisée sur les souches utilisées pour le CoIP. Une première détection par l'anticorps anti-HA a permis la détection de protéine de taille similaire à la taille de TAO2 α Cterm fgmt à savoir une taille de 113 kDa. Ce qui nous permet de penser que la protéine TAO2 α Cterm fgmt est bien exprimée. Lorsqu'on compare la détection des extraits protéiques totaux et solubles, seule la détection des protéines provenant d'extraits protéiques totaux a été observée. Différentes extractions protéiques totales et solubles de souches n'exprimant qu'une des trois protéines d'intérêt ont été utilisé comme contrôles. Les extraits protéiques des souches ne contenant que le pACT2gw ont permis la détection d'une bande à une taille approximative de 28 kDa. Le vecteur pACT2gw permet en effet l'expression d'une protéine de 20 kDa taguée HA. Le contrôle positif a été détecté (figure 3-18). l'ensemble de ces résultats, nous donne une explication sur l'échec de la CoIP, on peut penser que les protéines ne sont pas solubles donc ne peuvent pas être utilisées pour réaliser la CoIP.

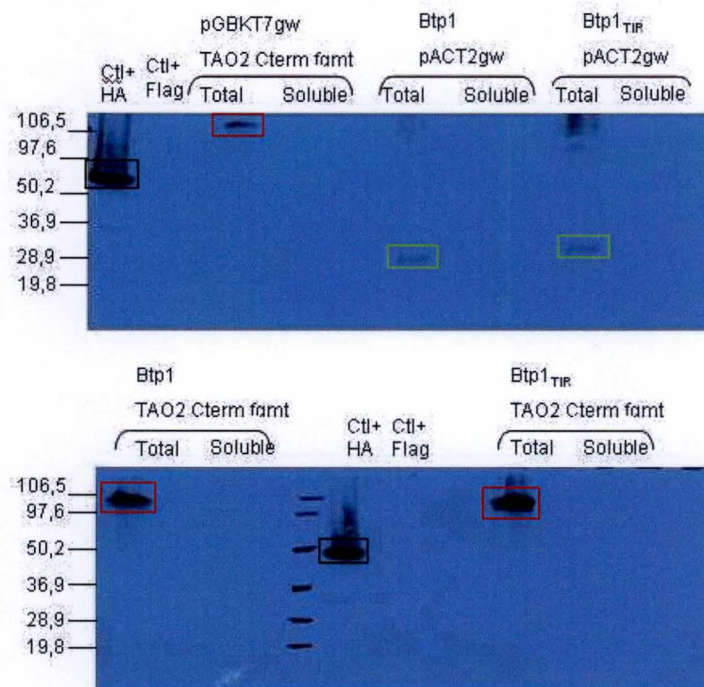


Figure 3-18 : **Détection par l'anticorps anti-HA des protéines TAO2 α Cterm fgmt.** Les protéines TAO2 α Cterm fgmt ont été détectées à la taille attendue de 113 kDa dans les extraits totaux et non dans les extraits solubles (bandes entourées en rouge). Les protéines détectées dans les levures contenant le plasmide pACT2gw vide, ont une taille de 20 kDa correspondant sûrement à la protéine exprimée par ce vecteur (bandes entourées en vert). Deux contrôles positif (entourés en noir) ont été déposé sur chaque gel et sont bien détectés.

La détection des protéines Btp1 et Btp1_{TIR} a été réalisé sur les même extraits protéiques. Une protéine ayant une taille de 50 kDa a été détectée dans l'extrait de la souche transformé par les vecteurs pGBKT7 Btp1 et pACT2gw, la protéine Btp1 fusionnée au BD et au tag Flag a une taille de 42 kDa. Une protéine a été détectée dans l'extrait de la souche transformée par les vecteurs pGBKT7 Btp1_{TIR} et pACT2-TAO2α Cterm fgmt à une taille de 97 kDa qui ne correspond pas à la taille attendue de Btp1_{TIR}. La membrane utilisée pour cette détection est la même que celle utilisée pour la détection par l'anti-HA après une étape de stripping qui permet normalement d'enlever les anticorps lié aux protéines. Dans notre cas, l'étape de stripping n'a pas été complète et on observe les fragments de la protéine TAO2α. Le contrôle positif a été détecté à la taille attendue. Les protéines Btp1 et Btp1_{TIR} n'ont pas été détectés lors de ce test dans les levures exprimant les deux protéines d'intérêts (figure 3-19). Or, dans des western blot antérieurs, les protéines Btp1 et Btp1_{TIR} ont pu être détectées. Ces résultats nous permettent d'être sur que le fragment de la protéine TAO2α est bien exprimé en levure et que cette protéine n'est pas soluble.

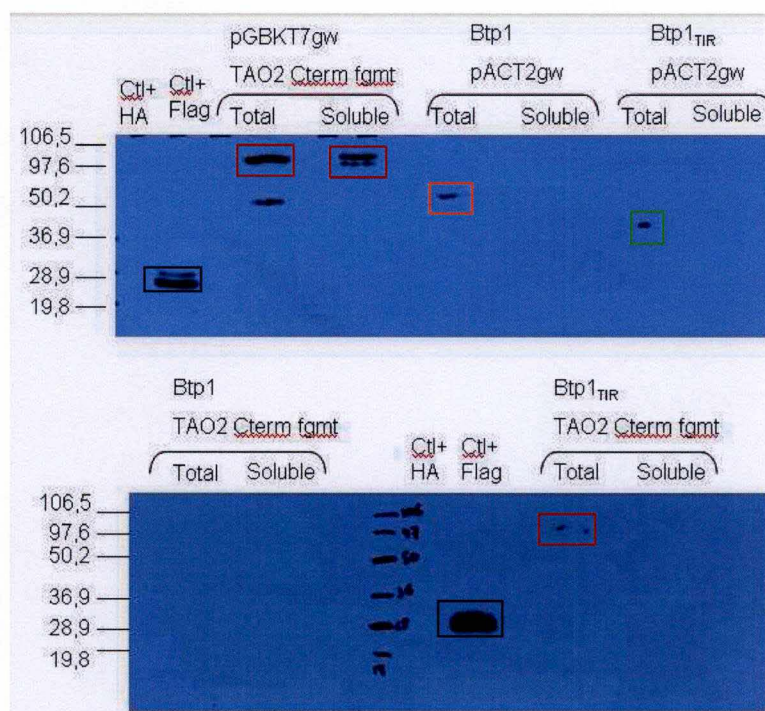


Figure 3-19 : détection grâce à l'anticorps primaire anti-flag des protéines Btp1 et Btp1_{TIR}. Les membranes ont été strippée après la détection par l'anticorps anti-HA. Le stripping de la membrane n'a pas été complète car on observe les mêmes bandes que lors de la détection anti-HA (fig 3-18) (entourée en rouge). Seules les souches ne contenant pas le plasmide pACT2 TAO2α Cterm fgmt ont permis une détection de protéine de taille semblable aux Btp1 et Btp1_{TIR}. La protéine Btp1 est détectée à une taille de 52 kDa (entourée en orange) qui est supérieure à la taille attendue (42kDa). La protéine Btp1_{TIR} est détectée à une taille de 37 kDa (entourée en vert) qui est semblable à la taille attendue (36kDa). Deux contrôles de détection anti-Flag ont également été détectées (entourées en noir).

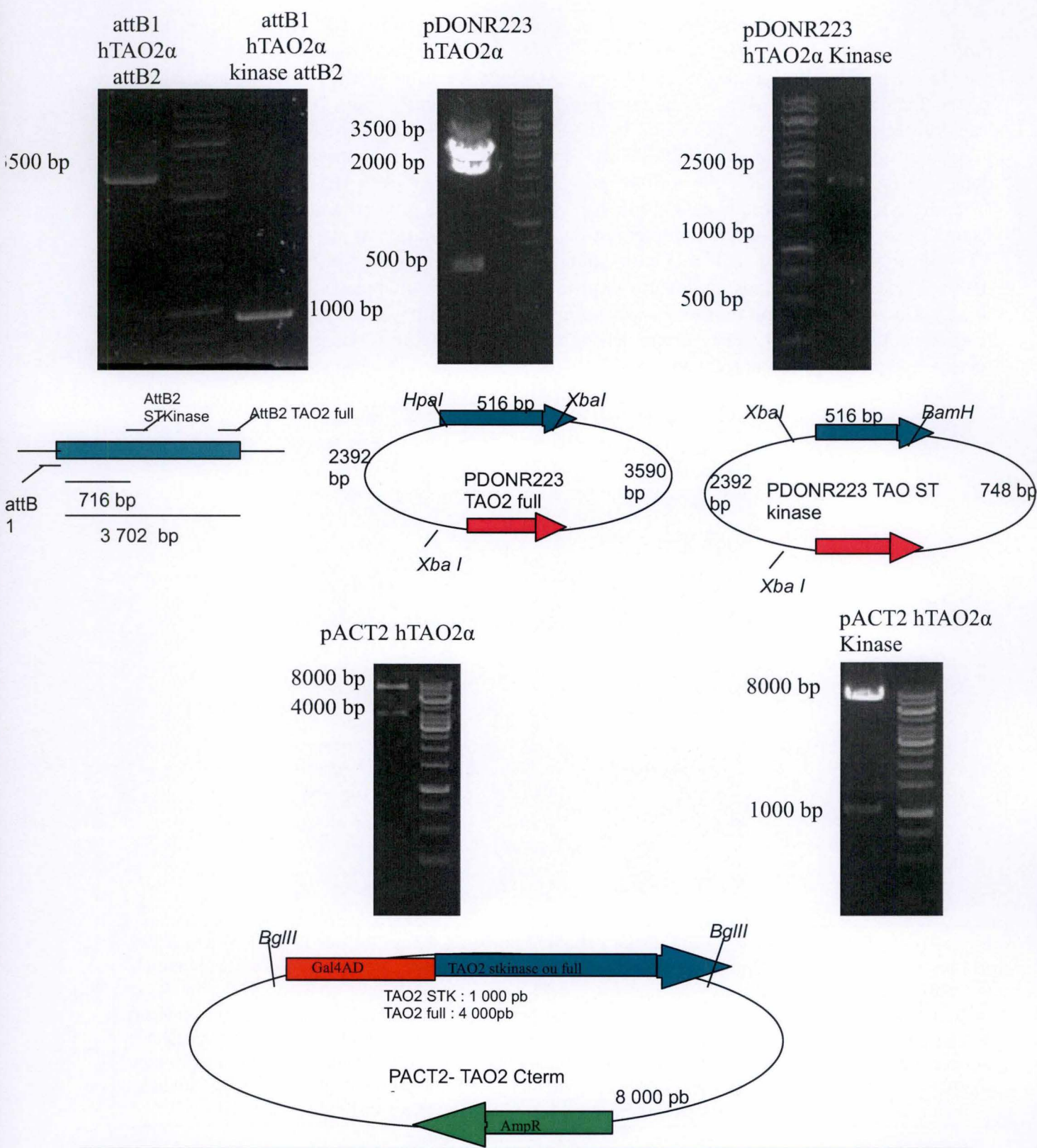


Figure 3-20 : gel d'agarose montrant les tailles des différentes constructions réalisé afin d'obtenir les vecteur pACT2 TAO2α full (hTAO2α) et pACT2 TAO2α ST kinase (hTAO2α Kinase). La première étape est d'amplifier les séquences avec des amorces ayant à leur extrémité 5' les séquences attB1 ou attB2. Les produits PCR attB1 hTAO2α attB2 et attB1 hTAO2α kinase ont une taille théorique de 3 702 bp et de 762 bp respectivement. Ensuite, la séquence est insérée dans un vecteur d'entrée, le pDONR223gw, qui permet d'insérer la séquence dans le vecteur pACT2gw. Lorsque les vecteurs pACT2 hTAO2α et pACT2 hTAO2α kinase sont formés, une restriction enzymatique par *BglIII* est réalisée. *BglIII* clive de part et d'autre de la séquence insérée. Les tailles attendues pour le pACT2 hTAO2α sont de 8021 bp et 3865 bp, pour le pACT2 hTAO2α kinases, les tailles attendues sont de 8021 bp et 1023 bp.

3.4. TAO2 α et ses différents domaines

3.4.1. Construction de vecteurs portant des domaines de TAO2 α

TAO2 α est une protéine contenant deux domaines bien déterminés : un domaine coiled coil et un domaine sérine thréonine kinase. Afin de déterminer le domaine responsable de l'interaction entre TAO2 α et Btp1 ou Btp1_{TIR}, des vecteurs portant la séquence entière de TAO2 α , nommé TAO2 α full ou uniquement la domaine Sérine Thréonine Kinase, nommé TAO2 α STKinase ou le domaine Coiled coil qui correspond à la version TAO2 α Cterm fragment ont été construits. Le vecteur portant la séquence de TAO2 α Cterm fragment est le résultat de la mise en phase de la séquence nucléotidique de l'ADNc des candidats 4 et 15. La taille de la séquence nucléotidique de TAO2 α full est de 3 702 bp, la séquence nucléotidique du domaine sérine thréonine kinase a une taille de 762 bp. La réalisation des vecteurs se fait par le système de clonage GatewayTM (figure 3-20). Les inserts sont bordés des séquences attB1 et attB2 afin de permettre leur insertion par réaction BP dans le pDONR223gw. Les vecteurs d'entrée peuvent ensuite réagir avec les vecteurs de destination, les pACT2gw, qui permettent la fusion en phase de l'insert au Gal4BD et au tag HA.

3.4.2. Le domaine coiled coil de TAO2 interagit avec Btp1_{TIR} et Btp1

Les vecteurs une fois construits ont permis de tester l'interaction par la croissance des levures sur le milieu sélectionnant la reconstitution du facteur Gal4. Pour ce faire, les levures ont été cotransformées par un plasmide permettant l'expression d'une protéine proie, une des protéines TAO2 α et par une protéine appât, Btp1 ou Btp1_{TIR}. Sur le milieu sélectionnant la présence des levures cotransformées (SC-L-W), toutes les levures poussent. Ce qui nous permet de s'assurer que les levures sont correctement cotransformées. Le fragment Cterm de la protéine TAO2 α interagit avec la protéine Btp1_{TIR} et avec la protéine Btp1 sur le milieu sélectif le moins stringent. Lorsqu'on augmente la stringence du milieu, on n'observe plus l'interaction entre la protéine Btp1_{TIR} et le fragment de la protéine TAO2 α . Par contre, la protéine Btp1 interagit avec le fragment Cterm de la protéine TAO2 α sur le milieu stringent comme sur le milieu le moins stringent. Ce qui nous permet de penser que le domaine coiled-coil n'est pas impliqué dans l'interaction entre TAO2 α et Btp1. La protéine TAO2 α full interagit uniquement avec la protéine Btp1 et l'association de l'interaction Btp1- TAO2 α est indépendante du domaine kinase. En ce qui concerne la protéine Btp2, on n'observe toujours aucune interaction. (figure 3-21).

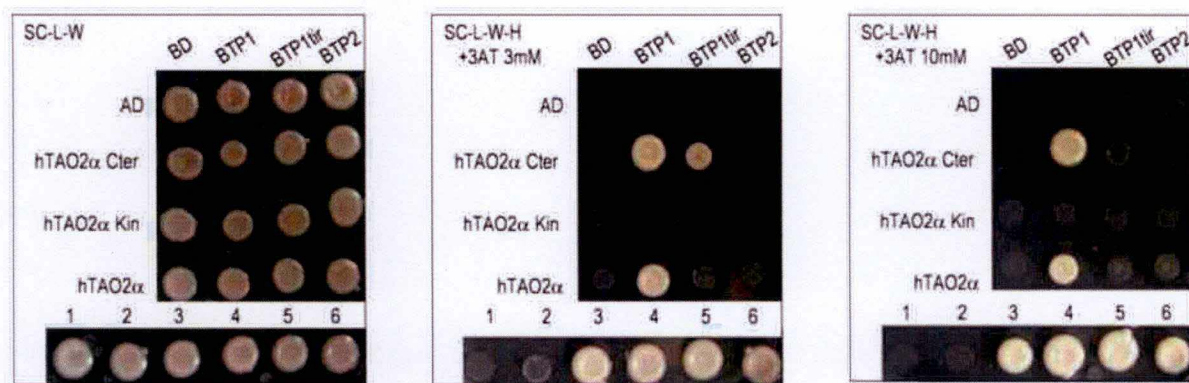


Figure 3-21 : test d'interaction de différents domaines de TAO2α et les trois Btp. Sur milieu SC-L-W, toutes les levures poussent, sur milieu SC-L-W-H+3AT 3mM, les interactions entre le fragment TAO2α Cterm et les protéines Btp1 et Btp1^{tr} et l'interaction entre TAO2α full (hTAO2α) et la protéine Btp1 sont sélectionnées. Sur milieu SC-L-W-H+3AT 10mM, l'interaction entre hTAO2α et Btp1 et l'interaction entre hTAO2α Cter et Btp1 sont sélectionnées. Les contrôles utilisés lors du criblage double hybride ont été remplacés sur les différents milieux. Les contrôles 1 et 2 sont négatifs et les contrôles 3 à 6 sont positifs.

4. Construction d'outils pour confirmer les interactions obtenues lors du crible double hybride

Les interactions identifiées lors du crible double hybride en levure doivent être confirmées par une autre technique. Nous avons en effet pu observer que chaque modèle apporte des faux positifs et des inconvénients inhérents au modèle et ne nous permet pas d'identifier une interaction entre deux protéines. Pour ce faire, nous avons opté pour deux techniques de confirmation.

La première technique est le GST-pull down qui permet de purifier sur colonne une protéine taguée GST par des billes qui lient spécifiquement le GST. Si la protéine taguée GST lie une autre protéine, elle sera accrochée à la colonne. Après élution, les échantillons pourront être analysés par western blot afin de détecter la présence de la protéine d'interaction.

La deuxième technique est la coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes. Elle identifie une interaction entre deux protéines à l'aide de tags si nécessaire qui seront reconnus par des anticorps. Cette technique offre l'avantage d'être une étude *in vivo* plus proche des conditions d'infection de *Brucella melitensis*.

4.1. Confirmation de l'interaction TAO2-Btp 1 par GST pull-down

Le GST pull down est une technique qui permet de mettre en évidence l'interaction entre une protéine taguée ou une protéine appât et une autre protéine. La protéine appât est fusionnée au tag GST qui sera exprimé par exemple par *E. coli*, l'extrait protéique est déposé sur une colonne contenant des billes d'agarose couplées au glutathion permettant la rétention des protéines taguées GST. Par la suite, l'extrait protéique contenant la protéine supposée interagir avec la protéine appât est déposé sur la colonne. Si une interaction entre les deux protéines a lieu, on observera dans les fractions d'élution la présence des deux protéines par un western blot. La protéine appât dans notre situation est le fragment Cterm de la protéine hTAO2 α . Le test n'a pas pu être réalisé avec la protéine hTAO2 α full ou ne contenant que le domaine kinase car les constructions des vecteurs portant les inserts hTAO2 α full et hTAO2 α ST kinase étaient en cours lors des tests préliminaires.

4.1.1. Construction des vecteurs

Les vecteurs nécessaires pour cette technique doivent permettre la surexpression des protéines d'intérêt taguées afin d'obtenir des extraits protéiques fort concentrés. La construction des vecteurs a été réalisée par le système GatewayTM. Les vecteurs donneurs sont les vecteurs pDONR223 formés au préalable. Les différents vecteurs de destination utilisés sont des pBBR-GST permettant la fusion de la protéine appât avec le tag GST, pBBR3HA permettant la fusion avec le tag 3HA. Ces vecteurs permettent la surexpression de la protéine d'intérêt dans les souches *E. coli* BL21 (Boîte 3-1). La protéine Btp1 est fusionnée au tag 3HA et le fragment Cterm de la protéine hTAO2 α est fusionnée au tag GST.

4.1.2. Choix de la souche permettant la surexpression des protéines d'intérêts

Les protéines d'intérêt doivent être en quantité suffisante pour réaliser le test. Pour ce faire, la souche *E. coli* BL21 a été choisie pour surexprimer les protéines. Lors des premières tentatives de surexpression des protéines, la présence des protéines dans les extraits a été vérifiée par western blot qui ne nous montraient aucune protéine d'intérêt détectée. Nous avons dès lors comparé l'expression des protéines dans la souche BL21 et dans la souche de clonage DH10B dans les mêmes conditions de culture et d'induction. Un arrêt de croissance a été remarqué pour la souche DH10B transformée par le vecteur pBBR GST TAO2 α Cterm fragment, ce qui nous a empêché de réaliser le test avec les souches transformées par ce vecteur. Donc la comparaison n'a été réalisée que sur les souches transformées par le vecteur pBBR 3HA Btp1. Des extraits protéiques ont été réalisés sur les cultures ayant atteint une DO_{600nm} de 0,7, avant et après l'induction de la surexpression des protéines par l'IPTG. Le résultat du western blot montre qu'aucune protéine est détectée dans les souches BL21. La souche DH10B est quant à elle capable d'exprimer la protéine Btp1-3HA. La taille de la protéine détectée sur la membrane est approximativement de 45 kDaltons, ce qui correspond à la taille théorique de la protéine Btp1-3HA (figure 3-22). Aucune normalisation du dépôt des extraits protéiques sur le gel n'a été réalisée ce qui ne nous permet pas de comparer la quantité de protéine exprimée. Dès lors, nous avons opté pour l'expression des protéines dans la souche DH10B au lieu de la souche BL21.

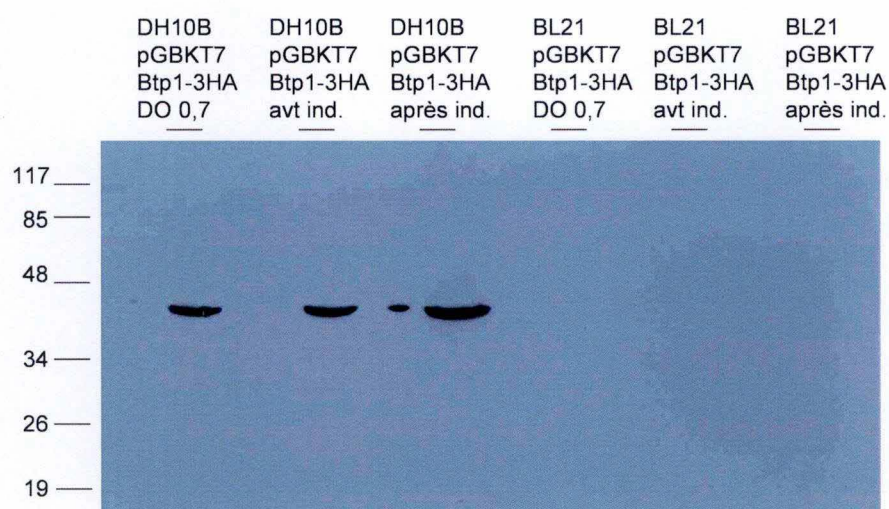


Figure 3-22 : résultat du western blot permettant la comparaison des protéines surexprimées par les souches BL21 ou DH10B. Les extraits protéiques de la culture à une DO de 0,7 et avant induction à l'IPTG de la souche DH10B sont déposés dans la première et la deuxième piste, une protéine d'approximativement 45 kDaltons est détectée dans cette piste ainsi que dans la piste contenant l'extrait protéique après induction dans la souche DH10B transformée. Les trois pistes suivantes contiennent les extraits protéiques des souches BL21 avant et après induction, aucune protéine n'est détectée.

4.1.3. TAO2 α a peut être un effet toxique

En observant les problèmes de croissance rencontrée par les souches transformées par les plasmides pBBR GST TAO2 α Cterm fragment, nous avons émis l'hypothèse que la protéine exprimée par cette souche était toxique pour la bactérie. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des courbes de croissance sur les différentes souches avec des conditions de pré-culture et de culture différentes. Nous avons testé deux types de préculture avec et sans Glucose. Les mêmes conditions ont été testées pour les cultures. La présence de Glucose réprime l'expression de la protéine et l'IPTG induit son expression. Les tests ont été réalisés sur les souches DH10B transformées par le plasmide pBBR 3HA Btp1 ou par le plasmide pBBR GST TAO2 Cterm fgmt. La souche exprimant la protéine de fusion Btp1-3HA nous a servi de contrôle de croissance. Nous avons conservé le même protocole d'induction et des extractions protéiques ont été réalisées sur les souches ayant atteint une DO_{600nm} de 0,7, avant l'induction à l'IPTG et après l'induction à l'IPTG afin de réaliser un western blot sur les extraits. Pour la condition après l'induction à l'IPTG, on a réalisé une extraction des protéines totales et solubles dans le but de confirmer l'observation faite lors de la CoIP en levure, en postulant que les protéines ne sont pas solubles. Les cultures sont lancées à une DO_{600nm} de 0,058 et nous avons ajouté du glucose à une concentration de 1g/L soit dans la préculture ou dans la culture ou dans les deux. Durant les deux premières heures de la culture, la DO_{600nm} de chaque culture a été mesurée ainsi que la concentration de Glucose dans le milieu. Par la suite, ces mêmes mesures ont été faites toutes les demi-heures.

L'étude sur la souche DH10B transformée par le plasmide pBBR 3HA Btp1 montre que, on observe à la figure 3-23 A les résultats du western blot réalisé sur les extraits protéiques des différentes conditions qui permet de détecter les protéines tagguées HA à une taille approximative de 50 kDaltons. Dans les conditions d'absence de glucose en préculture et de présence en culture, de présence de glucose en préculture et en culture ainsi que dans la fraction soluble des extraits protéiques après induction, aucune protéine n'a été détectée. Ce qui confirme que la protéine Btp1 exprimées n'est pas soluble. Les dépôts des extraits ont été normalisés ce qui permet une indication de la quantité de protéines exprimées par les bactéries. On observe avant l'induction que les bactéries expriment plus de protéines lorsque la culture contient du glucose. A la figure 3-23 B, on observe pour les mêmes souches dans les mêmes conditions la croissance et la consommation de glucose des bactéries. La croissance des bactéries est semblable dans les 4 conditions de préculture et de cultures et la croissance de la souche ne dépend pas des conditions de culture. En effet, toutes les cultures atteignent une DO_{600nm} de 1 après 3h La consommation de glucose est quant à elle identique entre les conditions d'absence de glucose dans la préculture et dans la culture (//) et la présence de glucose en préculture et l'absence de glucose en culture (Glu/). L'absence de glucose lorsque la préculture en contenait signifie que les bactéries ont consommées tout le glucose lors de la préculture (figure 3-23 B).

En ce qui concerne la détection des protéines TAO2 α Cterm fgmt, aucune protéine de la taille attendue (113kDa) n'a été détectée dans les différentes conditions. Seule une protéine de la taille approximative de 36 kDa a été détectée après l'induction de l'expression de la protéine. Ces résultats seront discutés un peu plus loin. (figure 3-24A). L'étude sur la souche DH10B transformée par le plasmide pBBR GST TAO2 Cterm fgmt montre que la présence de glucose dans la culture favorise la croissance de la souche. Nous observons un retard de croissance des souches qui n'atteignent une DO_{600nm} de 1 qu'après 3h30 de culture. La croissance des souches en absence de glucose dans la culture est fortement ralentie, en effet, on observe une DO_{600nm} de 1 après 5 ou 6 h de culture ce qui nous montre que la protéine exprimée a peut-être un effet toxique sur les bactéries. La consommation du glucose est identique que la consommation du glucose des souches DH10B transformées par le plasmide pBBR 3HA Btp1 (figure 3-24B).

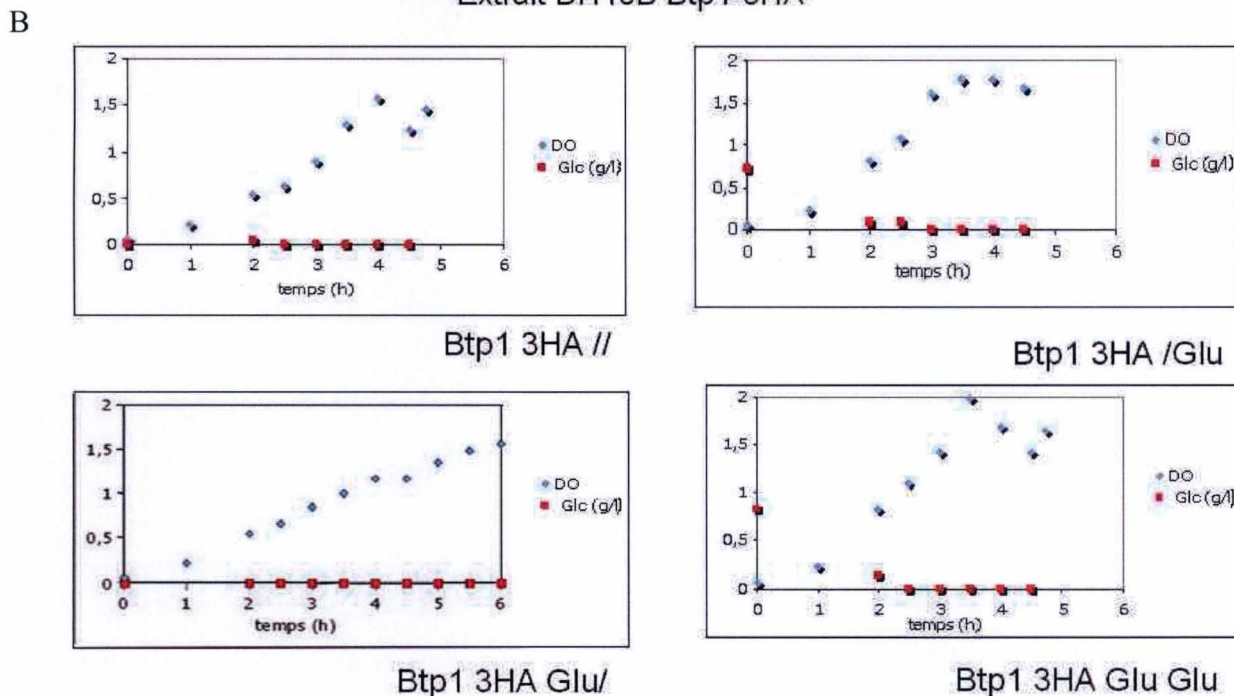
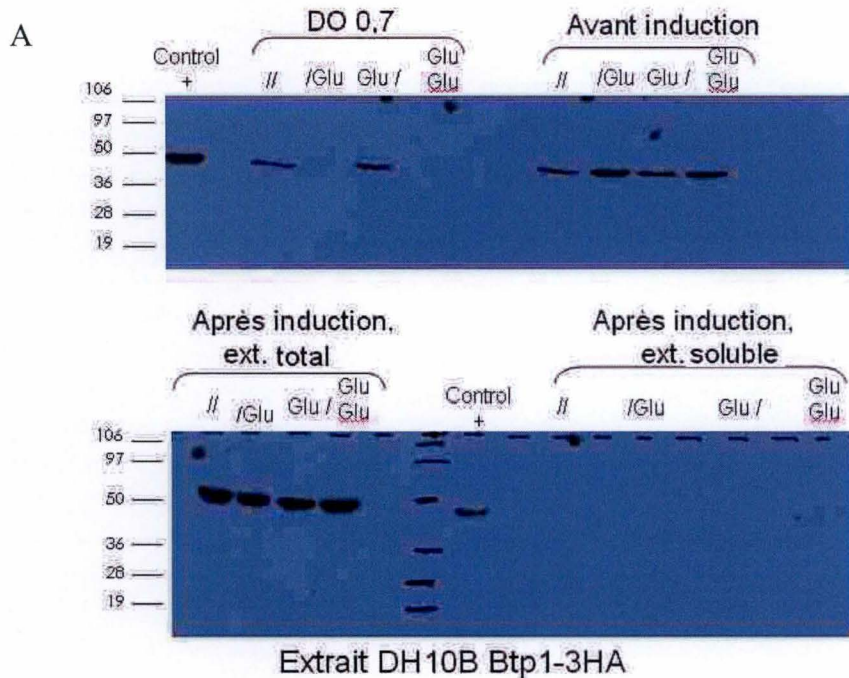


Figure 3-23 : **A. détection des protéines Btp1 taguées HA suite à l'expression de la protéine dans différentes conditions de préculture et de culture.** Une protéine d'une taille approximative de 50 kDa est détecté dans les extraits à DO_{600nm} de 0,7 dans les conditions de l'absence de glucose dans la préculture (//)et dans la culture et dans la condition de glucose en préculture et absence de glucose en culture (glu/). Dans les extraits avant et après induction, la protéine est retrouvée dans chaque condition. La détection des protéines Btp1 a une plus forte intensité lorsque la culture contient du glucose. L'absence de protéines détectées dans l'extrait soluble confirme que la protéine Btp1 n'est pas soluble. **B. Courbe de croissance de la souche DH10B transformé par pGBKT7 Btp1 3HA dans les différentes conditions de préculture et de culture avec et sans glucose.** Les différentes conditions sont : absence de glucose dans la préculture et dans la culture, représenté par //, du glucose dans la préculture mais pas dans la culture, représenté par Glu/, pas de glucose dans la préculture mais dans la culture, représenté par /Glu, du glucose dans la préculture et dans la culture, représenté par GluGlu. Toutes les cultures ont atteint à une DO_{600nm} de 1 après 3h de culture et le glucose a totalement été consommé lorsque la préculture en contient et que la culture n'en contient pas. Ce qui signifie que les bactéries consomment tout le glucose lors de la préculture.

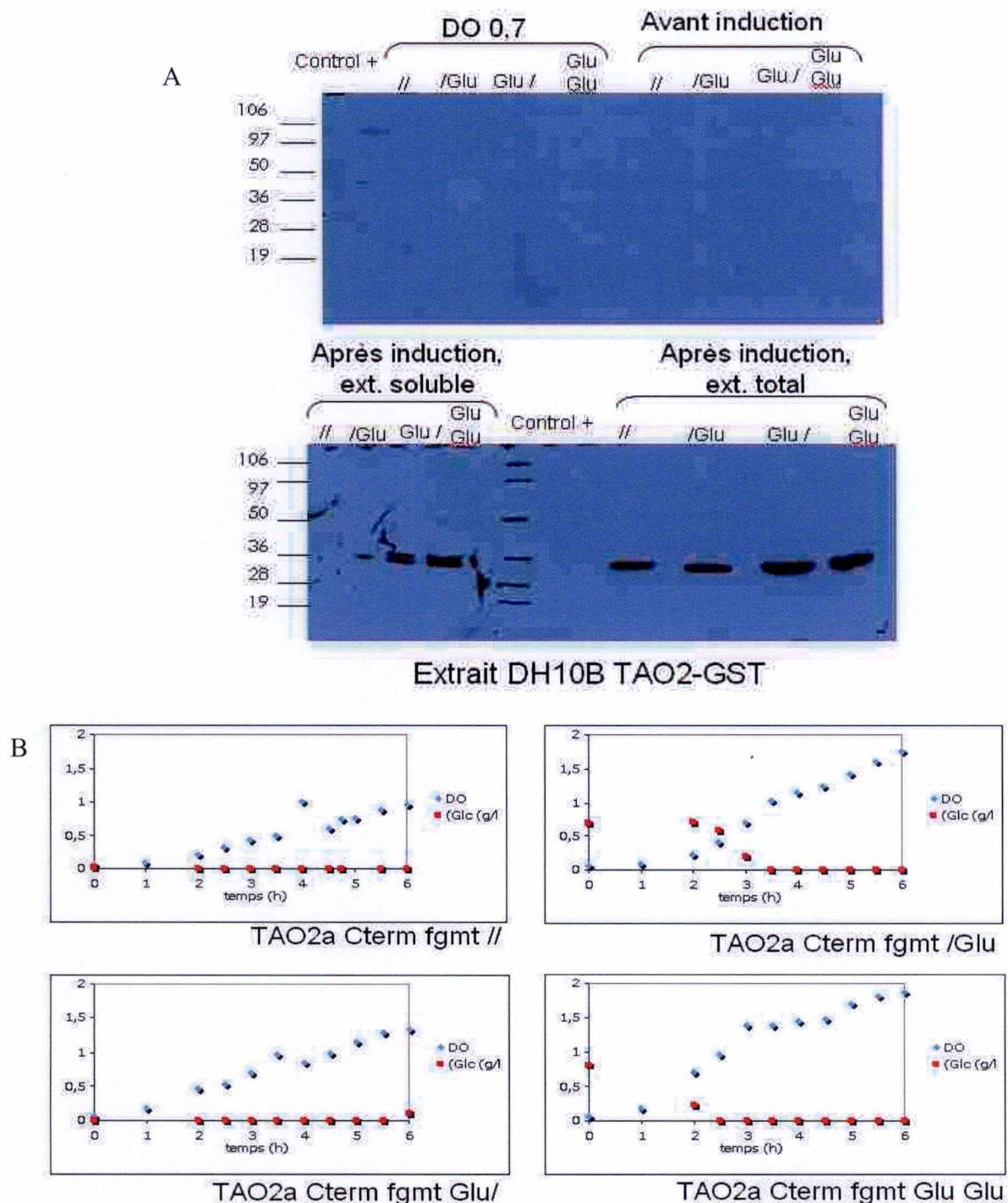


Figure 3-24 : **A. Détection des protéines TAO2 Cterm fgmt taguées Flag suite à l'expression de la protéine dans différentes conditions de préculture et de culture.** Aucune protéine n'a été détectée dans les conditions à DO 0,7 et avant l'induction à l'IPTG. Par contre, des protéines de plus ou moins 36 kDa ont été détecté mais la taille de ces protéines ne correspond pas à la taille de la protéine TAO2 Cterm fgmt taguée GST. **B. Courbe de croissance de la souche DH10B transformée par pACT2 TAO2a Cterm fgmt dans les différentes conditions de préculture et de culture avec et sans glucose.** Les différentes conditions sont : absence de glucose dans la préculture et dans la culture, représenté par //, du glucose dans la préculture mais pas dans la culture, représenté par Glu/, pas de glucose dans la préculture mais dans la culture, représenté par /Glu, du glucose dans la préculture et dans la culture, représenté par GluGlu. Toutes les cultures ont été à une DO_{600nm} de 1 après 3h de culture et le glucose a totalement été consommé lorsque la préculture contient du glucose et pas la culture .

4.2. Confirmation de l'interaction TAO2 α -Btp par Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes

La deuxième technique choisie pour confirmer l'interaction identifiée lors du crible double hybride est la Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes. La Coimmunoprécipitation permet de détecter une interaction en utilisant des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les tags des protéines. La Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes se déroule de la même manière que la Coimmunoprécipitation en levures.

4.2.1. Construction des vecteurs

Pour réaliser cette technique, nous avons dû tout d'abord construire des vecteurs permettant l'expression des protéines d'intérêt en cellules mammaliennes. Ce qui implique un promoteur actif en cellules eucaryotes comme le pCMV. La construction des vecteurs a été réalisée à l'aide du système de clonage Gateway™. Les gènes *tao2 α Cterm fgmt*, *tao2 α full*, *tao2 α ST kinase*, *btp1*, *btp1 TIR* et *btp2* ont été clonés dans les vecteurs de destination pDEST 490 permettant la fusion C-term avec le tag Flag, pDEST CMV4 permettant la fusion N-term avec le tag Flag et le pDEST 474 permettant la fusion C-term avec le tag Myc. Les vecteurs donneurs étant toujours les pDONR223gw.

4.2.2. Transfection des cellules HEK293 par les plasmides portant Btp et TAO2 α

Nous avons choisi de transférer les cellules HEK 293 qui proviennent du rein d'embryon humain. Ces cellules sont adaptées à la culture en suspension pour la production de protéines recombinantes. La mise au point de la transfection des cellules est en cours.

DISCUSSIONS ET
PERSPECTIVES

Discussions et perspectives

1. Discussion générale des résultats

La recherche de partenaires protéiques eucaryotes des protéines Btp nous a amené à réaliser un crible double hybride en levure d'une banque d'ADNc de foie humain par Btp. Cette technique permet de rechercher les partenaires protéiques possible d'une protéine appât sans *a priori*. Différents clones indépendants positifs ont été identifiés, nous avons 8 partenaires d'interaction avec Btp1, 16 avec Btp1_{TIR} et 3 avec Btp2 (figure 3-2 et tableau 3-1).

Chaque plasmide codant pour un partenaire d'interaction a été séquencé et retransformé dans la levure adéquate. Lors du séquençage, plusieurs candidats se sont avérés identiques, ce qui a réduit le nombre de candidat. Une première confirmation de l'interaction a été réalisée en testant la croissance sur milieu sélectif des levures exprimant une protéine appât et une protéine proie identifiée. Ce test permet de s'assurer que la croissance de la levure est bien due à la reconstitution du facteur Gal4 grâce à l'interaction entre le partenaire d'interaction identifié et une des Btp. La vérification des 8 partenaires d'interactions de Btp1 et des 3 partenaires d'interaction de Btp2 n'a donné aucun résultat positif malgré une croissance des souches sur le milieu non sélectif. Ce qui détermine ces candidats comme des faux positifs du crible. Nous pouvons aussi supposer que les protéines n'ont pas pu être exprimées ou un effet toxique de celles-ci est peut être à l'origine des problèmes de croissance des levures. Le contrôle positif que nous avons choisi pour Btp1 n'a pas poussé sur le milieu sélectif (figure 3-5). Ce contrôle était la vérification de l'interaction entre Btp1 et MyD88 qui avait déjà été mis en évidence au laboratoire et publié par Cirl et *al.* en 2008. La technique du double hybride en levure est une technique permettant la recherche parmi un grand nombre de protéines. Elle est également connue pour la découverte d'un grand nombre de faux positifs trouvés (Criekinge and Beyaert, 1999).

Malgré les problèmes survenus lors de la vérification pour les partenaires d'interaction avec Btp1 et Btp2, la vérification des interactions avec la protéine Btp1_{TIR} nous a confirmé 4 partenaires d'interactions. Un des partenaires était annoté comme '*Chromosome 18 genomic contig, alternate assembly*', ce qui ne correspond à aucune protéine connue. Un facteur de coagulation s'est avéré interagir avec Btp1_{TIR}, mais l'interaction avec ce facteur de coagulation paraît peu vraisemblable car la rencontre entre les deux protéines n'est pas possible lors d'une infection par *Brucella* (figure 3-4). Quant aux deux autres partenaires d'interaction confirmés, le fragment CtermTAO2 α , ou candidat 4-15, sont considérés comme des faux positifs car leur séquence nucléotidique n'est pas en phase avec la séquence de Gal4AD et le tag HA. La littérature décrit largement les différents types de faux positifs générés lors d'un crible double hybride en levure. Le contrôle d'autoactivateur de Btp1_{TIR} s'est révélé positif lors de cette manipulation ce qui ne correspondait pas à ce qui avait été observé lors de tests préliminaires. En effet, si la protéine Btp1_{TIR} était capable d'autoactiver, toutes les levures contenant le plasmide pVV212- Btp1_{TIR} auraient poussé et lors du crible, nous aurions eu énormément de clones positifs. La cause de cette croissance sur le milieu sélectif d'interaction serait sûrement due à l'expression d'une protéine de 20kDa codée par le pACT2gw (contenant le Gal4AD) qui interagirait avec la protéine Btp1_{TIR} contenant le Gal4BD.

2. Un partenaire d'interaction avec Btp1_{TIR} pas comme les autres

Malgré tout ces faux positifs retrouvés, les candidats 4 et 15 d'interaction avec Btp1_{TIR} nous ont intrigué. Les séquences nucléotidiques de ces deux candidats sont identiques, ce qui paraît attendu car les ADNc sont le résultat de la rétrotranscription de l'ARNm. Après amplification des ADNc, il est tout à fait probable d'insérer plusieurs fois le même ADNc dans les vecteurs de destination. Ce partenaire prédit comme un fragment Cterm de la protéine TAO2 α avait déjà été identifié lors d'un crible double hybride en levure d'une banque d'ADNc de leucocytes humains contre Btp1. Dans ce crible aussi, il avait été identifié comme un faux positif par le décalage du cadre de lecture de la séquence nucléotidique avec le Gal4BD. Contrairement à ce qu'on pouvait penser, les deux séquences résultant de ces deux cribles indépendants ne sont pas identiques. Elles proviennent toutes deux d'un ADNc légèrement différent et donnant des protéines différents (figure 3-8 et 3-9). Mais les candidats découverts ne correspondent pas à ces derniers. Ce qui nous mena à émettre l'hypothèse que la protéine exprimée et interagissant devait être un fragment Cterm de la protéine TAO2 α .

Nous avons voulu alors essayer de détecter la taille de la protéine exprimée dans la levure portant ce partenaire d'interaction. La protéine détectée avait la taille approximative de la taille théorique de la protéine correspondant à l'expression de l'ADNc *tao2 α* pas en phase avec le domaine Gal4BD. Cependant, l'expression du fragment Cterm de la protéine TAO2 α n'était peut être pas assez importante pour être détectée. Les western blot ne sont pas assez sensibles pour détecter des protéines en faible quantité. L'hypothèse est que le cadre de lecture soit modifié et que cet événement rare soit favorisé sur milieu sélectif de l'interaction permettant la croissance des levures exprimant le fragment de la protéine TAO2 α . De plus, le changement de cadre de lecture est un événement assez fréquent chez la levure (Henderson et al., 1992). Ce qui favorise cette hypothèse.

2.1. Ce partenaire n'interagit pas avec les domaines TIR des TLRs

Les domaines TIR des protéines sont connus pour interagir entre eux, de manière homotypique. La protéine découverte comme capable d'interagir avec Btp1_{TIR} ne contient pas de domaine TIR. Elle contient un domaine Coiled coil qui est décrit comme capable d'interagir avec différentes protéines. La protéine TAO2 α intervient dans la régulation de la réponse au stress des MAPK (Chen and Cobb, 2001), elle est capable de transmettre les signaux du carbachol (un médicament qui se lie aux récepteurs acétylcholines) à p38, une MAPK (Chen et al., 2003).

Dès lors, nous avons voulu vérifier la spécificité de l'interaction entre cette protéine et Btp1_{TIR}. Nous avons utilisé les domaines TIR des TLRs humains disponible au laboratoire. Il s'est avéré que la protéine d'interaction 4-15 n'interagissait avec aucun de ces domaines ni même avec Btp2 et Btp1 (figure 3-11). L'absence d'interaction avec Btp1, nous pose question car la protéine Btp1_{TIR} est une forme tronquée de la protéine Btp1. Donc, ça semble logique que ce partenaire d'interaction interagisse également avec Btp1. L'explication émise était que la protéine Btp1 n'est pas repliée sous sa forme native et l'interaction n'a peut être pas lieu par le manque d'accessibilité au site spécifique de liaison. Car la protéine Btp1 est fusionnée au Gal4BD, ce qui peut influencer l'accessibilité à des sites impliqués dans le bon repliement de la protéine.

2.2. Tentative de vérification de l'interaction entre TAO2 α Cterm fgmt et Btp1

Nous avons pu observer que des partenaires d'interactions considérés comme des faux positifs peuvent être de véritables partenaires d'interaction. En effet, la première idée lorsque des faux positifs apparaissent lors d'un crible double hybride en levure est de ne plus en tenir compte. Or dans notre cas, nous nous sommes intéressés à un des faux positifs qui avait déjà été identifié lors d'un crible indépendant et comme faux positif également. Afin de s'assurer que le fragment Cterm de la protéine TAO2 α est bien impliqué dans cette interaction, nous avons évidemment construit des vecteurs contenant le fragment C-term de la protéine TAO2 α en phase avec le Gal4AD. Il nous a semblé intéressant de construire également des vecteurs codants toute la séquence de TAO2 α et la séquence codante pour le domaine sérine thréonine kinase N-term de TAO2 α . Une coimmunoprécipitation en levure nous a paru la technique la plus appropriée et surtout la plus rapide afin de détecter l'interaction et les partenaires d'interaction impliqués. Mais une condition de la réussite de cette technique est que les protéines doivent être solubles ce qui n'était pas notre cas. Suite à l'échec de la CoIP en levures, deux types d'extraits ont été comparés à savoir la fraction soluble et la fraction totale. Le fragment C-term de la protéine TAO2 α a été détecté uniquement dans les extraits protéiques totaux et non dans les extraits solubles. Les protéines Btp1 et Btp1_{TIR} n'ont pas été détectés dans les extraits protéiques totaux et solubles des levures contenant les plasmides permettant l'expression de TAO2 α C-term et de Btp1 ou de Btp1_{TIR} (résultat figure 3-18 et 3-19). Nous avons pensé que les Btp n'étaient pas en assez grande quantité pour être détectés. La tentative de confirmation a donc échoué par la non solubilité des protéines. Cette technique de confirmation était une première approche car on confirme généralement une interaction en changeant de modèle.

2.3. Le fragment C-term de la protéine TAO2 α interagit avec Btp1 et Btp1_{TIR}

Lorsque chaque plasmide fut disponible, nous avons testé les interactions possibles avec les trois Btp et les différentes versions de la protéine TAO2 α . Nous avons observé que la protéine TAO2 α interagit avec Btp1 et que le fragment C-term de la protéine TAO2 α interagit avec les protéines Btp1 et Btp1_{TIR} sur milieu sélectif peu stringent de l'interaction (SC-L-W-H+3AT 3mM) (figure 3-21). L'interaction entre Btp1_{TIR} et le fragment C-term de TAO2 α n'est plus observée sur le milieu plus stringent. Nous en avons conclu qu'une partie du domaine Coiled coil C-term de TAO2 α est responsable de l'interaction avec Btp1 et que le domaine TIR des Btp ne serait pas impliqué dans l'interaction. Nous savons que la protéine Btp1_{TIR} est composée du domaine TIR et de quelques acides aminés en dehors de ce domaine. L'interaction observée n'est donc pas dépendante du domaine TIR des Btp ni du domaine sérine thréonine kinase de TAO2 α . Ce qui semble en accord avec la littérature qui décrit les domaines TIR comme interagissant de manière homotypique avec d'autres protéines à domaine TIR (O'Neil and Bowie, 2007)

3. Une confirmation de l'interaction

Suite aux résultats encourageants, une confirmation de l'interaction entre Btp1 et TAO2 α sera tentée à l'aide de deux méthodes différentes. Le GST pull down, une étude *in vitro* pour laquelle, les premières étapes consistant en la construction des vecteurs et en la surexpression des protéines a pu être réalisés. La Coimmunoprécipitation en cellules mammaliennes, une étude *in vivo* permet de se mettre dans les conditions les plus proches d'une infection par *Brucella* de cellules a été choisie comme seconde technique de confirmation. Seules les étapes de construction des vecteurs a pu être réalisées lors de ce mémoire.

3.1. Le GST pull down

3.1.1. Problème de la surexpression

Les séquences codantes pour les protéines d'intérêt TAO2 α Cterm et Btp1, Btp1_{TIR} et Btp2 ont été insérées respectivement dans les vecteurs de destination pBBR GST et pBBR 3HA. Suite à cela, les cellules *E. coli* BL21 ont été transformées par ces vecteurs. L'expression des protéines est sous le contrôle du promoteur pLAC qui est inductible à l'IPTG. L'induction et un western blot ont été réalisés mais aucune protéine ne fut détectée. La souche BL21 est généralement utilisée pour surexprimer des protéines. Nous avons comparé l'expression des protéines dans la souche d'*E. coli* de clonage DH10B. Les souches DH10B transformées par ces plasmides sont capables d'exprimer les protéines (figure 3-22). Nous en avons conclu qu'un problème d'expression a lieu et que les souches choisies ne correspondaient pas à nos besoins. La possibilité d'utiliser les souches DH10B au lieu des BL21 fut mise en avant afin de pallier ce problème de surexpression. Malgré tout, nous suspectons un problème de toxicité de la protéine TAO2 α pour la bactérie. En effet, les cultures de bactérie exprimant le fragment Cterm de TAO2 α mettaient plus de temps que les autres cultures pour atteindre une DO déterminée. Par la suite, nous avons vérifié cet effet de toxicité de l'expression de la protéine en comparant la croissance et la consommation de glucose des bactéries transformées.

3.1.2. TAO2 α semble être toxique

Suite au retard de croissance de souches exprimant le fragment Cterm de TAO2 α , nous avons analysé sa croissance et sa consommation de glucose. Le promoteur permettant son expression est inductible à l'IPTG et est inhibé par le glucose. Seulement cette inhibition n'est pas totale et une expression basale de TAO2 α est possible. Ce qui ne permet pas à la bactérie d'exprimer la protéine à partir d'un moment donné et d'éviter donc l'effet toxique de la protéine sur la croissance des bactéries. Les résultats obtenus montrent que les bactéries exprimant TAO2 ont une croissance plus faible que celles exprimant Btp1 (figure 3-23 et 24); Il serait par la suite, intéressant de changer de vecteurs pour changer le promoteur afin de mettre l'expression sous le contrôle du promoteur T7. Ainsi l'utilisation de la souche BL21 DE3 pLys permettra d'inhiber l'expression basale des protéines. Ceci nous permettrait d'induire l'expression de nos protéines lorsque la biomasse est assez importante afin d'obtenir une quantité suffisante de protéines pour réaliser le GST pull down.

4. Conclusion et perspectives

Le crible double hybride permet de rechercher des partenaires d'interaction sans *a priori* avec une protéine, en l'occurrence, Btp. Cette recherche a identifié deux partenaires d'interaction intéressants capable d'interagir avec Btp1. Afin de s'assurer de la reproductibilité de cette interaction et de sa confirmation, les deux techniques de confirmation sélectionnées sont à réaliser.

Premièrement le GST pull down mettra en évidence l'interaction dans un contexte *in vitro* et dans le cas d'une surproduction de chaque protéine d'intérêt.

Deuxièmement, la CoIP en cellules mammaliennes se rapproche plus des conditions d'infection de *Brucella*. Ceci pourrait aussi nous donner une idée sur la délocalisation de certaines protéines comme les MAPK ou encore une localisation particulière de Btp1. Cette détermination de localisation spécifique peut être réalisée par une fusion à un tag fluorescent tel que la GFP, ou le

mCHERRY utilisés au sein du laboratoire. Suite à la transfection des cellules mammaliennes, une étude sur l'état de phosphorylation (ce qui signifie l'état d'activité) des MAPK telles que p38 pourrait être réalisée.

Ces différentes études permettraient de comprendre la raison de cette interaction entre les deux protéines *in vivo*.

MATERIELS ET
METHODES

Matériels et méthodes

1. Souches et plasmides

1.1. Les souches de bactéries

Souches	Génotypes	Commentaires
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL-lacX74-80lacZM15 araD139 (ara, leu)7697 mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Souche utilisée pour l'amplification des plasmides. GibcoBRL- (Invitrogen)
<i>E. coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 glnV44 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Smr) xyl5-leu mtl1</i>	Souche utilisée pour amplifier les vecteurs gateway™ grâce à sa résistance à la toxine ccdB apportée par l'allèle <i>gyrA462</i> (Invitrogen)
<i>E. coli</i> KC8	<i>hsdR leuB600 trpC9830 pyrF::Tn5 hisB463 lacDX74 strA galU</i>	Souche résistante à la kanamycine permettant la sélection des plasmides proies lors du crible double hybride (pACT2-cDNA)
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(cm^R)</i>	Souche utilisée pour surexprimer les protéines

1.2. Les souches de levures

Souches	Génotypes	Commentaires
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATα <i>trp1901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{TATA} HIS3 GAL2_{UAS} GAL2_{TATA} ADE2 URA3::MEL1_{TATA} lacZ MEL1</i>	Souches contenant le plasmide appât contenant le DNA-Binding (BD) pour le crible double hybride en levure (Y2H).
<i>S. cerevisiae</i> Y187	MATα <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4Δ met- gal80Δ MEL1 URA3::GAL1_{UAS} GAL1_{TATA} lacZ</i>	Souche contenant le plasmide proie permettant la fusion avec l'Activator Domain (AD) pour le Y2H.

1.3. Les plasmides

Plasmides	Commentaires
PDONR201gw	Il s'agit d'un vecteur donneur du système Gateway™ (Invitrogen) il contient les sites attP1 et attP2 qui flanquent la cassette Gateway qui contient les gènes de la toxine ccdB et le gène de résistance au Chloramphénicol. Ce plasmide permet l'insertion du fragment d'ADN bordé par les régions attB1 et attB2. suite à cette réaction BP, le vecteur devient un vecteur d'entrée qui pourra 'donner' la séquence par réaction LR avec un vecteur de destination contenant les sites attR1 et attR2. Ce plasmide contient aussi la cassette de résistance à la Kanamycine et une origine de répllication chez <i>E. coli</i> , pUC ori.
pDONR223gw	Ce plasmide a les mêmes caractéristiques que le pDONR201 excepté qu'il contient une cassette de résistance à la spectinomycine et non à la kanamycine
pVV212	Vecteur utilisé pour exprimer les protéines appâts lors du crible double hybride fusionnées au Gal4BD.
pACT2gw	Il s'agit d'un vecteur de destination du système Gateway™ qui permet la fusion de la protéine d'intérêt à la sous unité Gal4 AD (activating domain). Ce vecteur contient une cassette de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur nous permet de réaliser le crible double hybride.
pOAD	Il s'agit d'un vecteur permettant l'expression de la sous unité Gal4 AD seule du promoteur Gal4. il sera utilisé comme contrôle lors des vérifications des interactions en levures.
pGBKT7gw	Il s'agit d'un vecteur de destination du système Gateway™ qui permet la fusion de la protéine d'intérêt à la sous unité Gal4 BD (Binding DNA). Ce vecteur contient une cassette de résistance à la kanamycine et permet de réaliser le crible double hybride.
pGEM-T	Ce vecteur linéarisé permet l'insertion d'un produit PCR afin de permettre son amplification suite à une transformation en bactérie.
pCDNA3	Vecteur intermédiaire entre le pGEM-T et les pDEST permettant l'insertion de la séquence d'intérêt dans les vecteurs pDEST
pDEST 490 C-Flag	Il s'agit d'un plasmide de destination utilisé pour le clonage Gateway™, portant un promoteur eucaryotique CMV (Cytomégalovirus) et une cassette de résistance à l'Ampicilline. Une fois l'ORF cloné dans ce vecteur, elle sera fusionnée en C term au tag FLAG. Ce vecteur est utilisé pour la transfection des cellules eucaryotes.
pDEST CMV4 N-Flag	Même remarque que pour le plasmide pDEST 490 sauf que le tag FLAG sera fusionné en N-term de la protéine d'intérêt.
pDEST 474 N-Myc	Même remarque que pour les plasmides pDEST 490 et CMV4 sauf que le tag est Myc et sera fusionné en N-term de la protéine d'intérêt.
pBBR GST	Il s'agit d'un vecteur de destination du système Gateway™ qui permet la fusion de la protéine d'intérêt au tag GST. Ce vecteur est utilisé dans le but de réaliser le GST-pull down
pBBR 3HA	Il s'agit d'un vecteur de destination du système Gateway™ qui permet la fusion de la protéine d'intérêt à trois tag HA. Ce vecteur est également utilisé dans le but de réaliser le GST-pull down

2. Milieux, tampons et solution

2.1. Milieux pour les levures

2.1.1. Milieux Synthétique Complete (SC)

	Pour 1L	Pour 400 ml
Poudre d'acides aminés	1,3 g	5,2 g
Yeast Nitrogen Base	6,75 g	2,7 g
Glucose	20 g	8 g
Agar (si forme solide)	20 g	8 g
H2O	Ajuster à volume	Ajuster à volume

Mettre à pH 5,9 avec du NaOH

Autoclaver

Ajouter 8 ml de chaque aa nécessaire ou du 3AT

Poudre d'acides aminés :

Peser les différents aa et mélanger les :

Adénine (AD)	1 g	Isoleucine (I)	2 g
Uracile (UR)	2 g	Leucine (L)	4 g
Alanine (A)	2 g	Lysine (K)	2 g
Arginine (R)	2 g	Méthionine (M)	2 g
Aspartate (D)	2 g	Phénylalanine (F)	2 g
Asparagine (N)	2 g	Proline (P)	2 g
Cystéine (C)	2 g	Sérine (S)	2 g
Glutamate (E)	2 g	Thréonine (T)	2 g
Glutamine (Q)	2 g	Tryptophane (W)	2 g
Glycine (G)	2 g	Tyrosine (Y)	2 g
Histidine (H)	2 g	Valine (V)	2 g

La poudre est préparée sans leucine, tryptophane et sans histidine et une seconde poudre est préparée sans leucine, tryptophane, histidine et sans adénine

Additifs au milieu SC

Concentration de stock	Acide aminé	À peser pour 400 ml
100 mM	Histidine	6,206 g
100 mM	L-Leucine	5,247 g
40 mM	Tryptophane	3,267 g
40 mM	Adénine sulfatée	5,892 g
20 mM	Uracile	0,897 g

Ajouter de l'eau désionisé pour arriver à volume

Passer à l'autoclave sauf le tryptophane qui sera filtré avec un filtre 0,22 µm (Millipore) et conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

2.1.2. Yeast peptone D-glucose (YPD)

	Pour 1 litre
Yeast extract	10 g
Bactopeptone	20 g
Glucose	20 g
Agar (si forme solide)	20 g

2.1.3. YPAD

On ajoute 8 ml d'Adénine sulfaté stérilisé 40 mM par litre de YPD.

2.1.4. Milieu M9 amp-Leu

Solution 1 : 150 ml d'Agar 3%, autoclavé

Solution 2 :

	Pour 150 ml
M9 20X	15 ml
Mix AA 10X	30 ml
Uracile 0,2%	5 ml
Tryptophane 1%	1 ml
Histidine 1%	1 ml
Dextrose 20%	3 ml
Thiamine 0,5 M	0,6 ml

Mélanger les deux solutions en les maintenant à 55°C, puis ajouter :

MgSO ₄ 1 M	300 µl
CaCl ₂ 0,1 M	300 µl
Ampicilline 100mg/ml	300 µl

Milieu M9 20 X

	Pour 100 ml
NaHPO ₄	12 g
KH ₂ PO ₄	6 g
NH ₄ Cl	2 g
NaCl	1 g

2.1. Milieux pour les bactéries

2.1.1. Préparation d'antibiotique (concentré 1000X)

	cc stock	cc finale	Solution de dissolution
Kanamycine	50 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O
Chloramphénicol	20 mg/ml	20 µg/ml	Ethanol 70%
Ampiciline	100 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O
Spectinomycine	100 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O
IPTG	100 mM	100 µM	H ₂ O

Chaque antibiotique est préparé dans un volume final de 15 ml qui est ensuite filtré au travers d'un filtre 0,22 µm (Millipore) et aliquoté dans des eppendorfs stériles et conservé à -20°C.

2.1.2. Milieu LB (Luria Betrani)

	Pour 1 litre d'eau désionisé
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	5 g
Agar (si forme solide)	15 g

Le milieu est autoclavé et les antibiotiques nécessaires sont ajoutés par la suite.

3. Techniques relatives à l'ADN

3.1. Polymerase chain reaction (PCR)

Principe :

Cette méthode permet d'amplifier de manière exponentielle la quantité d'un fragment d'ADN. Cette réaction compte trois étapes : la dénaturation des brins d'ADN qui se fait en chauffant l'ADN, l'hybridation des amorces en amont et en aval de la séquence à amplifier qui se fait à une température qui dépend de la composition des amorces (température de melting), et enfin l'élongation qui est l'action de la polymérase et des dNTPs qui permet l'amplification du brin d'ADN.

Méthode :

Amorces	Séquence de 5' en 3'
attB1-Btp1	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctcgATGAGTTCGTACTIONCTTCTAAT
attB1 btp1 tir	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGatggaagcagaagaatac
attB1 tao2fgmt	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGgcccgggagatggccatgat
attB1 to2full	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGatgccagctgggggcccgggc
attB2 tao2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAacctcagggggcagggcc
attB2 tao2 kin	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAgtgggtggccgctcccggag

MIX PCR	Programme PCR
<ul style="list-style-type: none"> - Le tampon correspondant à la polymérase utilisé 1X - 1 µl de primer forward (20µM) - 1 µl de primer reverse (20 µM) - 4 µl de dNTPs (mix de chaque dNTP 5mM) - 1-10 ng de matrice - 2U de polymérase - porter à 50 µl avec de l'eau désionisé 	Dénaturation : 4 minutes 94°C 30 cycles de 3 étapes : dénaturation : 45'' 94°C hybridation : 30'' Tm-10°C élongation : 1' par Kb 72°C élongation finale : 10' à 72 °C

La température de melting est calculée suivant ce calcul : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$; elle correspond à un état où 50% des amorces sont hybridés sur la matrice et 50% non hybridés. En fonction de la polymérase utilisée, Go Taq, Expand Hight Fidelity, le tampon varie. Pour l'utilisation de la polymérase Fusion, le protocole suivi est fournit avec la polymérase.

3.2. Purification et concentration de produit PCR après une réaction PCR

Principe :

Cette technique permet de purifier le produit PCR en trois étapes ; liaison de l'ADN à la colonne de purification, lavage de l'ADN et élution de celui-ci.

Méthode :

Pour se faire on utilise le protocole du kit de purification de produit PCR : MSB Spin PCRapace d'Invitek.

3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Principe :

Le gel d'agarose au bromure d'éthidium, agent intercalant, permet de détecter les fragments d'ADN, de connaître leur taille et leur quantité grâce à un étalon de taille et de quantification.

Méthode :

Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 10 g d'agarose dans 1L de tampon TAE

- Couler le gel dans un support adéquat muni de peignes et ajouter 5 µL de bromure d'éthidium (10mg/ml) avant la polymérisation du gel
- Après polymérisation du gel, placer le support dans une cuve d'électrophorèse et remplir celle-ci avec du tampon TAE 1X
- Retirer le peigne
- Charger les échantillons (contenant 1/10^{ème} de l'ADN à détecter et le bleu de chargement) et un marqueur de taille (GeneRuler)
- Appliquer une différence de potentiel entre les deux bornes (environ 130 V) pendant environ 30 minutes
- Visualiser l'ADN sous des rayons ultraviolets

Préparation de tampons et de solutions

Solution	Composant	Concentration ou quantité	Solution de dissolution et commentaires
P1	TrisHCl EDTA Rnase A	50 mM 10 mM 100 µg/mole	Mettre à pH 8 avec de l'HCl
P2	NaOH SDS	200 mM 1%	
P3	KAc	3M	Mettre à pH 5,5 avec du CH ₃ COOH
Tampon TAE 20X	Tris HCl pH8 EDTA Acide acétique glacial	40 mM 50 mM 57,1 ml	Porter à volume de 1 litre avec de l'eau désionisé
Solution d'alourdissement de l'ADN	Glycérol EDTA SDS Méthyl orange	50% 100 mM 1% 0,25 %	Solution concentrée 10X
Breaking buffer	Triton X-100 SDS NaCl Tris HCl EDTA pH 8	2% 1% 100 mM 10 mM 1 mM	
TE 10X	Tris pH 7,5 EDTA pH 8	100 mM 10 mM	La solution est mis à pH 7,85 avec de l'HCl et ensuite filtré avec des filtres 0,22µm ou autoclavé
PEG 4000 50%	PEG 4000	50 g pour 100 ml	La solution est filtrée par un filtre 0,45 µm
LiAc 1M	LiAc	102 g pour 1 l	La solution est autoclavée
Tampon NP-40 (Nonidet P-40)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ Nonidet P-40 NaCl EDTA NaF	6 mM 4 mM 1% 150 mM 2 mM 50 mM	Une fois la solution préparé, pour 50 ml de tampon ajouté 1 tablette d'inhibiteur de protéase, EDTA free, 500 µl de PMSF 0,1 M et 130 µl de Benzamidine (tous deux préparés dans de l'éthanol 100%)
Tampon IPLS	Tris HCl pH 7,5 NaCl NP-40 buffer Glycérol Pastille complete	50 mM 120 mM 500 µl pour 100 ml de tampon 10 % 2 pour 100 ml	Mélanger toutes les solutions et ensuite mettre à volume avec de l'eau deux fois distillé
IPP-150	Tris HCl pH8 NaCl NP-40	10 mM 150 mM 0,1%	
SOC	Peptone Yeast Extract NaCl KCl MgSO ₄ Glucose MgCl ₂	2% 0,5% 10 mM 2,5 mM 10 mM 20 mM 10 mM	Le peptone et le yeast extract sont mis ensemble dans de l'eau désionisé et passé à l'autoclave ensuite sont rajoutés les autres composants

3.4. Clonage Gateway™

Principe :

Cette méthode de clonage est rapide et évite l'utilisation d'enzyme de restriction et de ligase. Son système est basé sur la recombinaison de site tel que le site attB1 avec le site attP1. Le fragment d'ADN qu'on souhaite intégrer doit être bordé des sites attB1 et attB2 et il sera intégré dans un vecteur donneur contenant les sites attP1 et attP2 qui flanquent la cassette gateway (réaction BP), le produit de l'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur se nomme le vecteur d'entrée qui a les sites attL1 et attL2. Ce vecteur sera utilisé pour transmettre la séquence d'ADN dans un vecteur de destination qui comporte les séquences attR1 et attR2 (réaction LR).

Méthode :

Pour une réaction BP

On mélange 75-150 ng de produit PCR
 75-150 ng de plasmide donneur
 1 µl de BP clonase
 2 µl de tampon de BP clonase 5X
 Porter à 10 µl avec de l'H₂O désionisé

Pour une réaction LR

On mélange 75-150 ng de plasmide d'entrée
 75-150 ng de plasmide de destination
 1 µl de LR clonase
 2 µl de tampon de LR clonase 5X
 Porter à 10 µl avec de l'H₂O désionisé

3.5. Restriction enzymatique

Principe :

La restriction enzymatique peut être réalisée dans deux contextes différents ; une restriction enzymatique diagnostique qui permet de vérifier si on a purifié le plasmide souhaité ou une restriction enzymatique pour le clonage qui permet de retirer un insert d'un plasmide ou de linéariser un plasmide pour permettre l'insertion d'un insert dans celui-ci.

Méthode :

Restriction diagnostique

- Mélanger : - 1 µl de la minipréparation plasmidique
- 1 µl de tampon 10 X qui dépendra de l'enzyme utilisée
- quantité d'enzyme à calculer en fonction de la formule suivante :

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

tp = taille plasmide en kb

qp = quantité plasmide à restreindre (µg)

np = nombre de sites de restriction dans le plasmide

nλ = nombre de sites dans le génome du phage lambda

- porter à 10 µl avec de l'eau désionisé
- laisser à 37°C pendant 1 h
- enlever de 37°C et ajouter 1 µl de tampon de chargement et placer sur gel d'agarose.

Solution de stripage	SDS 10% Tris HCl 1 M pH 6,7 β -mercaptoéthanol 14,3 M	50 ml 15,6 ml 1,75 ml	Porter à 250 ml avec de l'eau désionisé
Tampon Z	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ KCl $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16,1 g (ou 8,52g anhydreux) 5,5 g (ou 4,8 g anhydreux) 0,75 g 0,246 g (ou 0,12 g anhydreux)	Mélanger les composants et porter à 1 l avec de l'eau désionisé. Autoclaver et mettre à pH7
Solution test β -gal	B-mercaptoéthanol X-gal 40% Tampon Z	13 μl 120 μl 5 ml	Quantité utilisée pour faire le test β -gal pour une petite boîte de pétri
SDS PAGE sample buffer 2X (Roche)	Tris 1,5 M pH 6,8 SDS 20% Glycérol 100% β -mercaptoéthanol bleu de bromophénol H_2O désionisé	10 ml 6 ml 30 ml 15 ml 1,8 mg 61 ml	Aliquoter par 10 ml et conserver à -20°C
Running buffer 10X	Tris Glycin SDS	0,25 M -30,35 g 144 g 10 g	Mélanger les composants et porter à 1 l avec de l'eau désionisé
Towbin buffer	Tris Glycine SDS Méthanol technique	5,8 g 2,9 g 0,37 g 200 ml	Mélanger les composants et porter à 1 l avec de l'eau désionisé
PBS 20X	KH_2PO_4 Na_2HPO_4 KCl NaCl	4 g 23 g 4 g 160 g	Mélanger les composants et porter à 1 l Avec de l'eau désionisé, mettre à pH 7,4 avec du NaOH
Tampon TAE 50X	Tris HCl pH 8 EDTA Acide acétique glacial	40 mM 50 mM 57,1 mL	Porter à un volume de 1 l avec de l'eau désionisée
Solution de révélation	ECL buffer Acide coumarique 90 mM dans DMSO Luminol 250 mM dans DMSO H_2O_2 30%	10 ml 25 μl 50 μl 3 μl	Cette solution est a préparée en dernière minute

3.1. Ligation

Principe :

La ligation permet de liquer deux produits qui ont des extrémités compatibles, ceci permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide.

Méthode :

- mélanger : - 1 μ l de T4 DNA ligase
- 2 μ l de tampon 5X
- un volume d'insert et de matrice à déterminer en fonction du rapport de l'un par rapport à l'autre. Calcul : rapport (ng insert/ng matrice) = rapport (kb insert/kb matrice) . rapport (moles insert/moles matrices).

- porter à 10 μ l avec de l'eau désionisé

Rem. : le rapport utilisé pour un clonage nondirectionnel, avec le pGEM-T par exemple est de 3 : 1 (matrice : insert)

- incuber 2h ou toute la nuit à température ambiante.
- transformer le produit de la ligation dans la souche adéquate de bactéries.

4. Techniques relatives à l'utilisation des levures

4.1. Transformation de levures : LiAc/ss carrier DNA/PEG method

Principe :

Il s'agit de permettre l'entrée d'ADN exogène dans les levures rendues au préalable compétente par l'acétate de lithium et le polyéthylène glycol.

Méthode :

J-1 : lancer une colonie isolée en préculture dans 10 ml de YPD ou dans le milieu sélectif, incubé toute la nuit à 30°C.

J0 : - lancer une culture dans 50 ml de YPD ou dans le milieu sélectif en diluant la préculture afin d'obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,2 et 0,3.

- Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,7 et 0,8.
- Centrifuger la culture à 4 000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante.
- Effectuer deux lavages à l'eau stérile avec 1/10^{ème} (5ml) du volume de culture.
- Effectuer un lavage au TE 1X / LiAc 100 mM avec 1/10^{ème} (5ml) du volume de culture. Le mélange TE 1X / LiAc est préparé extemporanément.
- Dénaturer l'ADN de sperme de saumon en le laissant 5 minutes à 100°C, et ensuite en le laissant sur glace.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante.
- Resuspendre le culot dans 250 μ l de TE / LiAc afin de concentrer 200 X les cellules.
- Préparer le mélange PEG 4 000 40% / TE 1X / LiAc 100 mM (300 μ l par transformation).
- Dans un eppendorf stérile, par transformation, ajouter dans l'ordre :
 - 5 μ l d'ADN carrier (10 mg/ml)
 - 1 μ g d'ADN plasmidique
 - 50 μ l de levures
 - 300 μ l de PEG 4 000 40% / TE 1X / LiAc 100 mM
- Vortexer quelques secondes

- Incuber 1h à 30°C sans agitation
- Incuber 20 minutes à 42°C en inversant toutes les 5 minutes
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.
- Resuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile.
- Etaler sur milieu sélectif.

Incuber à 30°C pendant 2 à 4 jours.

4.2. Test d'activité β-gal

Principe :

L'étude de l'activité d'un promoteur se fait grâce à un gène rapporteur qui est ici le gène lacZ codant pour l'enzyme galactosidase. On aura transcription du gène lorsque notre promoteur Gal4 est reformé par l'interaction entre deux protéines, une fusionnée avec Gal 4AD (Activating Domain) et l'autre fusionnée à Gal 4BD (Binding DNA). L'enzyme galactosidase est capable de dégrader le X-Gal, un composé synthétique qui dégradé donne deux produits ; le galactose et un chromophore bleu colorant les levures produisant la β-galactosidase et donc pour lesquelles, le promoteur Gal4 a été reformé.

Méthode :

J-1 : - Les levures qu'on souhaite testées sont répliquer sur une membrane de nitrocellulose placé sur un milieu riche (YPAD). Incuber à 30°C.

J0 : - Deux papiers Wattman sont placés dans une boîte de pétri et imbibé de la solution test β-gal.

- La membrane est plongé dans de l'azote liquide pendant 10-15 secondes afin de perméabilisé les levures.

- La membrane est maintenue quelques secondes à température ambiante.

- Elle est ensuite posée sur les papiers Wattman imbibés de la solution.

- Le tout incube à 37°C pendant 24 h.

4.3. Extraction d'ADN plasmidique

Principe :

L'extraction d'ADN plasmidique permet de lyser chimiquement et physiquement les levures pour extraire et purifier l'ADN plasmidique.

Méthodes :

J-1 une colonie isolé est lancée en préculture dans 10 ml de SC liquide avec les aa nécessaires, elle incube toute la nuit à 30°C, sous agitation

J0 : - transférer 4 ml de préculture dans un eppendorf.

- centrifuger 30 secondes à 14 000 rpm.

- le culot est resuspendu dans 200 µl de breaking buffer.

- ajouter 200 µl de billes de verres (diamètre de 425 à 600 µm).

- ajouter 200 µl de phénol/ chloroforme/ alcool iso amylique pH 7,8 (prendre la phase inférieure).

- vortexer 5 fois pendant 1 minute en laissant reposer sur glace entre chaque vortex.

- laisser sur glace pendant 10 minutes.

- centrifuger à 5 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.

- récupérer la phase aqueuse supérieure.

- précipiter l'ADN dans 2 volumes d'éthanol 70% (froid), retourner les eppendorfs.

- centrifuger à 5 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.

- retirer le surnageant, sécher le culot.
- resuspendre dans 40 µl d'eau désionisée.

4.4. Extraction des protéines solubles des levures

Principe :

Cette méthode permet la lyse de la paroi des levures et l'extraction et la purification des protéines solubles.

Méthode :

J-1 : lancer une colonie isolée en préculture dans 10 ml de YPD ou dans le milieu sélectif, incubé toute la nuit à 30°C.

J0 : - lancer une culture dans 50 ml de YPD ou dans le milieu sélectif en diluant la préculture afin d'obtenir une DO_{600nm} comprise de 0,25.

- centrifuger la culture à 4 000rpm à température ambiante pendant 4 minutes (à partir d'ici tout se passe sur glace).
- Laver une fois avec 1 ml de NP-40 + inhibiteur de protéase (PI).
- Placer le tout dans des falcon de 15 ml.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 4 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 30 µl de NP-40 + PI.
- Ajouter 1,5 ml de billes de verre (diamètre de 425 à 600 µm).
- Vortexer 5 fois pendant 30 secondes à 4°C chaque échantillon.
- Ajouter 1 ml de NP-40 + PI et vortexer
- Chauffer une aiguille et percer l'extrémité du falcon avec celle-ci et replacer le Falcon dans un Falcon de 50 ml avec le capuchon percé.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant et le placer dans un eppendorf.
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant et réaliser un dosage protéique avant de mettre sur gel SDS-PAGE.

4.5. Extraction des protéines totales des levures

Principe :

Cette méthode permet la lyse des levures l'extraction totale des protéines selon le protocole de Matsuo et al. (Matsuo et al., 2006)

Méthode :

J-1 : lancer une colonie isolée en préculture dans 10 ml de YPD ou dans le milieu sélectif, incubé toute la nuit à 30°C.

J0 : - lancer une culture dans 50 ml de YPD ou dans le milieu sélectif en diluant la préculture afin d'obtenir une DO_{600nm} comprise de 0,25.

- Centrifuger 10 ml de la culture à 4 000rpm pendant 4 minutes à température ambiante.
- Resuspendre le culot avec 1 ml d'H₂O stérile.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot avec 300 µl de H₂O et ajouter 300 µl de NaOH 0,6M.

- Laisser à température ambiante pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 25 µL de SDS 2X et dans 25 µL de PBS 1X.
- Conserver les échantillons à -20°C.

4.6. Croisements de deux souches de levure, mating

Principe :

Les levures haploïdes sont soit MAT_a ou MAT_α, des levures de types différents peuvent former une levure diploïde et contiennent les plasmides des deux levures indépendantes.

Méthode :

- Placer une goutte de 5 µL de préculture d'une souche sur milieu sélectif
- Laisser sécher la goutte et placer une goutte de 5 µL de préculture de la souche qui est le partenaire de mating de la première souche.

4.7. Coimmunoprécipitation des protéines

Principe :

La technique co-immunoprécipitation, une souche, dont deux protéines cibles sont taguées, permet de purifier une protéine et les protéines qui sont éventuellement accrochées à celle-ci. Une immunoprécipitation est réalisée à l'aide de billes magnétiques couvertes d'anticorps dirigés contre le tag d'une protéine ici anti-HA. Si la deuxième protéine est liée à la protéine immunoprécipitée, celle-ci sera également précipitée avec la première protéine.

Méthode :

Lavage des cellules

- Inoculer une culture cellulaire liquide à une DO d'environ 0,5.
- Récupérer 50 ml de la culture.
- Centrifuger à 4 000 rpm pendant 4 minutes.
- Resuspendre le culot dans 1 mL de tampon NP-40 froid.
- Transférer dans un tube de 10 ml.
- Centrifuger 4 minutes à 5000 rpm à 4°C.

Lyse des cellules et extraction des protéines solubles.

- Eliminer le surnageant.
 - Resuspendre dans 30 µL de tampon NP40+PI froid.
 - Ajouter l'équivalent de 1,5 mL de billes de verre (diamètre de 425 à 600 µm).
 - Vortexer 5 fois 30 secondes à 4°C.
 - Ajouter 1 ml de tampon NP40+PI froid pour rincer les billes.
 - A l'aide d'une aiguille chauffée, faire un petit trou dans le fond du tube et placer directement ce tube dans un tube de 50 mL avec capuchon troué.
 - Centrifuger 2 minutes à 2000 rpm à 4°C.
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant.

Préparation des billes pour l'immunoprécipitation

Pour les billes magnétiques IgG anti-HA (30 µL de billes par CoIP à réaliser, billes INVITROGEN DYNABEAD PAN mouse IgG cat n°110.41)

- Laver les billes 4 fois avec 300 µL de PBS 1X froid
- Resuspendre les billes dans 60 µL de PBS 1X froid
- Ajouter 0,5 µL d'anticorps anti-HA 11 (Covance réf. MMS-101P) et 0,5 µL d'anticorps anti-HA F7 (Santa-Cruz HA probe (F7) : SC-7392)
- Laisser incuber 30 minutes à 30°C sur plaque vibrante

- Laver deux fois les billes avec 300 µl de PBS 1X froid
- Laver une fois les billes avec 100 µl de tampon NP40 buffer froid
- Resuspendre les billes dans 100 µl de NP40 buffer froid
- Stocker les billes à 4°C.

Immunoprécipitation

- Ajouter 50 µL de billes + tampon à chaque échantillon
- Mélanger sur roue pendant 2 heures à 4°C
- Laver les billes trois fois dans 1 mL de tampon IPP150
- Laisser 30 µL de tampon IPP150
- Resuspendre les billes dans 30 µL de tampon de chargement 2X
- Chauffer 5 minutes à 100°C
- Récupérer le surnageant
- Conserver les échantillons à -20°C

5. Techniques relatives à l'utilisation des bactéries

5.1. Extraction d'ADN plasmidique des bactéries

Principe :

Cette technique permet de purifier l'ADN plasmidique produit par des bactéries. Elles comportent 5 étapes : une lyse alcaline de la bactérie, une élimination des débris cellulaires, une précipitation de l'ADN plasmidique, son nettoyage qui permet la purification de celui-ci et sa resuspension.

Méthode :

Pour les extractions d'ADN plasmidique en kit, suivre le protocole proposé par le kit Nucleospin® (Magerey-Nagel).

Pour les extractions d'ADN plasmidique classique, suivre ce protocole :

J-1 : - Une colonie isolée est lancée en pré-culture dans du LB liquide avec l'antibiotique nécessaire, cette pré-culture incube toute la nuit à 37°C.

J0 : - 1,5 ml de la pré-culture ou 3 ml si on extrait un plasmide à faible nombre de copies est centrifugée à 13 000 rpm pendant 5 minutes.

- Eliminer le surnageant
- Ajouter 300 µl de P1 et resuspendre le culot
- Ajouter 300 µl de P2, retourner plusieurs fois les eppendorfs
- Laisser 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de P3, retourner plusieurs fois les eppendorfs
- Laisser 10 minutes sur glaces
- Centrifuger pendant 15 minutes à 4°C à 13 000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un nouvel eppendorf
- Ajouter 0,7 volume (\pm 630 µl) d'isopropanol, retourner les eppendorfs
- Centrifuger les eppendorfs pendant 15 minutes à 4°C à 13 000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 300 µl d'éthanol 70% (-20°C)
- Centrifuger 5 minutes à 4°C à 13 000 rpm
- Eliminer le surnageant et sécher le culot
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau désionisé et stérile.

Préparation de bactéries électro-compétentes (KC8)

Principe :

Elle permet aussi de faire entrer de l'ADN plasmidique dans les cellules mais par un choc électrique.

Méthode :

J-1 : - Placer à 4°C tout le matériel nécessaire, seuls les eppendorfs stériles sont placés à -20°C, et le LB liquide est placé à 37°C. Une colonie isolée est mise en préculture dans 10 ml de LB liquide.

- J0 :
- ensemencer 1,2 l d'eau stérile avec les 10 ml de préculture.
 - Incuber la culture à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,7. répartir la culture dans des biberons de 200 ml.
 - Centrifuger à 6 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
 - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 200 ml d'eau froide par biberons de 200 ml.
 - Centrifuger à 6 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
 - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 100 ml d'eau froide par biberons de 200 ml.
 - Centrifuger à 6 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
 - Resuspendre l'ensemble dans 1/100 du volume finale (12 ml) de glycérol 10% froid.
 - Centrifuger à 6 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
 - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de glycérol 10% froid.
 - Répartir par aliquot de 50 µl dans des eppendorfs stériles et froids.
 - Placer les eppendorfs à -80°C.

Transformation de bactéries électro-compétentes par de l'ADN

- l'ADN plasmidique est dialysé afin de diminuer la concentration en sels de l'échantillon pour ne pas avoir création d'un arc électrique lors du choc électrique. Pour se faire l'échantillon d'ADN est placé pendant 20 minutes sur une membrane millipore VSWPO13000 type 0,025 µm qui est elle-même placée à la surface d'eau distillé.
- Préparer le SOC.
- Mélanger 10 µl d'ADN plasmidique avec 50 µl de cellules électro-compétentes dans un eppendorfs.
- Ce mélange est ensuite placé dans une cuvette d'électroporation de 2 mm (BIORAD).
- Régler l'appareil d'électroporation la résistance sur 200 ohms ; la capacitance sur 25 µF, le voltage sur 2 kVolts
- Placer la cuvette dans l'appareil et réaliser le choc électrique.
- 700 µl de SOC sont ajoutés rapidement.
- Homogénéiser et récupérer l'ensemble pour les placer dans un eppendorf stérile.
- Incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation.
- Etaler 100 µl sur milieu sélectif.
- Centrifuger à 5 000 rpm pendant 5 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot.
- Etaler les cellules sur milieu sélectif.
- Incuber à 37°C overnight.

5.2. Préparation de bactéries chémo-compétentes (DH10B)

Principe :

La préparation de cellules chémo-compétentes est nécessaire pour la réalisation de la transformation de celles-ci par de l'ADN plasmidique. Les cellules sont rendues compétentes par un passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Les bactéries compétentes ont acquis une paroi et une membrane plasmidique perméable, qui permettra le passage de l'ADN plasmidique dans la bactérie.

Méthode :

J-1 : placer à 4°C tout le matériel nécessaire, seuls les eppendorfs stériles sont placés à -20°C, et le LB liquide est placé à 37°C. Une colonie isolée est mise en préculture dans 10 ml de LB liquide.

J0 : - Inoculer une culture de 200 ml de LB liquide avec la préculture de bactérie afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,1

- Incuber la culture sous agitation à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,3 à 0,4, le tout est alors réparti dans des falcons.
- Laisser 10 minutes sur glaces.
- Centrifuger à 3 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1/5 du volume final (40ml) de $CaCl_2$ 60 mM stérile et froid.
- Centrifuger à 2 500 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre dans 1/5 du volume finale de $CaCl_2$ 60 mM stérile et froid.
- Laisser pendant 30 minutes sur glaces.
- Centrifuger à 2 500 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Resuspendre le culot dans 1/5 du volume final de $CaCl_2$ 60 mM glycérol 15% stérile et froid.
- Aliquoter par 100 µl dans les eppendorfs stériles et froids.
- Placer les eppendorfs à -80°C.

5.3. Transformation de bactéries chémo-compétentes

Principe :

La transformation des cellules permet l'entrée d'ADN plasmidique dans les cellules par un choc thermique.

Méthode :

- sortir un aliquots de 100 µl de cellules chémo-compétentes du -80°C et les laisser 10 minutes sur glaces.
- Ajouter entre 150 et 200 ng d'ADN, en veillant à ne pas dépasser 1/10^e du volume, laisser les échantillons pendant 30 minutes sur glace.
- Réaliser le choc thermique en laissant les échantillons à 37°C pendant 1 minutes.
- Ajouter rapidement 900 µl de LB liquide.
- Laisser le tout à 37°C pendant 45 minutes sous agitation.
- Etaler 100 µl sur milieu contenant l'antibiotique adéquat.
- Centrifuger les cellules à 5 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot.

- Etaler les cellules sur milieu contenant l'antibiotique adéquat.
- Incuber à 37°C overnight.

6. Techniques relatives à l'utilisation des protéines

6.1. Western blot

Principe :

La technique de western blot permet de faire migrer les protéines en fonction de leur taille et par la suite de détecter une protéine spécifique grâce à la présence de son tag.

Cette méthode est divisé en trois grandes parties : l'électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE), le transfert sur membrane de nitrocellulose et l'immunodétection et la révélation.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux gel : le gel d'empilement (stacking gel) qui permet de concentrer les échantillons déposés dans les puits et le gel de séparation (running gel) qui permet la séparation des protéines en fonction de leur taille. Le choix du pourcentage d'acrylamide se fait en fonction de la taille de la protéine qu'on souhaite détecter. Plus les protéines à séparer sont de petites tailles, plus la concentration en acrylamide sera importante.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines se réalise par un électroblot semy-dry, humidification par le tampon Towbin, une différence de potentiel entre 10 et 14 V, 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose est appliqué.

Immunodétection et révélation

Cette partie permet la détection des protéines par un anticorps primaire qui reconnaît le tag de la protéine et par la suite par un anticorps secondaire qui est couplé à une peroxidase qui permettra la révélation de par son activité sur le luminol qui deviendra oxydé et émettra de la lumière détectable à l'aide d'un film photographique.

Méthode :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant

On dépose sur le gel la même quantité de protéine par échantillon. La durée de migration à 40 mA et 300 V dépend de la taille des protéines dans l'échantillon et de la concentration du gel en acrylamide. Le plus souvent un gel de 12% est réalisé.

Immunodétection et révélation

Après le transfert, la membrane incube une heure à température ambiante avec du PBS Tween 0,05 % Lait 5 %.

Ensuite, la membrane incube une heure à température ambiante avec l'anticorps primaire 1/5 000 PBS Tween 0,05 % Lait 5 %.

La membrane est lavée 5 fois 3 minutes avec du PBS Tween 0,05 % Lait 5 %.

L'anticorps secondaire dilué 1/10 000 dans du PBS Tween 0,05 % Lait 5 % est mis en présence de la membrane. Cinq lavages de 3 minutes avec du PBS Tween 0,05 % Lait 5 % est réalisés. La solution de révélation est déposée sur la membrane et est exposé au film photographique.

6.2. Stripping d'une membrane de nitrocellulose portant des protéines

Principe :

Cette méthode permet d'enlever les anticorps primaires et secondaires qui ont permis une première détection, ceci permet donc de détecter plusieurs protéines différentes sur une même membrane.

Méthode :

- Immerger la membrane dans 25 ml de solution de stripping pendant 30 minutes à 60°C, en agitant délicatement de temps en temps.
- Laver la membrane 2 fois 10 minutes avec du PBS Tween 20 0,05%
- Recommencer l'étape de blocking, placer la membrane dans du PBS Tween 20 0,05% Lait 5% pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Par la suite, les étapes d'immunodétection et de révélation peuvent être réalisées.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- ALTO, N. M. (2008) Mimicking small G-proteins: an emerging theme from the bacterial virulence arsenal. *Cell Microbiol*, 10, 566-75.
- ARELLANO-REYNOSO, B., LAPAQUE, N., SALCEDO, S., BRIONES, G., CIOCCHINI, A. E., UGALDE, R., MORENO, E., MORIYON, I. & GORVEL, J. P. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*, 6, 618-25.
- ARNOULT, D., GAUME, B., KARBOWSKI, M., SHARPE, J. C., CECCONI, F. & YOULE, R. J. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*, 22, 4385-99.
- ARNOULT, D., PARONE, P., MARTINOU, J. C., ANTONSSON, B., ESTAQUIER, J. & AMEISEN, J. C. (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol*, 159, 923-9.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BARBIERI, J. T., RIESE, M. J. & AKTORIES, K. (2002) Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 315-44.
- BARQUERO-CALVO, E., CHAVES-OLARTE, E., WEISS, D. S., GUZMAN-VERRI, C., CHACON-DIAZ, C., RUCAVADO, A., MORIYON, I. & MORENO, E. (2007) Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, 2, e631.
- BARQUERO-CALVO, E., CHAVES-OLARTE, E., WEISS, D. S., GUZMAN-VERRI, C., CHACON-DIAZ, C., RUCAVADO, A., MORIYON, I. & MORENO, E. (2007) Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, 2, e631.
- BARRIO, M. B., GRILLO, M. J., MUNOZ, P. M., JACQUES, I., GONZALEZ, D., DE MIGUEL, M. J., MARIN, C. M., BARBERAN, M., LETESSON, J. J., GORVEL, J. P., MORIYON, I., BLASCO, J. M. & ZYGMUNT, M. S. (2009) Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against Brucella melitensis infection of sheep. *Vaccine*, 27, 1741-9.
- BARRIONUEVO, P., CASSATARO, J., DELPINO, M. V., ZWERDLING, A., PASQUEVICH, K. A., GARCIA SAMARTINO, C., WALLACH, J. C., FOSSATI, C. A. & GIAMBARTOLOMEI, G. H. (2008) Brucella abortus inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun*, 76, 250-62.
- BERGUER, P. M., MUNDINANO, J., PIAZZON, I. & GOLDBAUM, F. A. (2006) A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol*, 176, 2366-72.
- BHAVSAR, A. P., GUTTMAN, J. A. & FINLAY, B. B. (2007) Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*, 449, 827-34.
- BILLARD, E., CAZEVIEILLE, C., DORNAND, J. & GROSS, A. (2005) High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens Brucella suis, B. abortus, and B. melitensis. *Infect Immun*, 73, 8418-24.

- BILLARD, E., DORNAND, J. & GROSS, A. (2007) Brucella suis prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun*, 75, 4980-9.
- BILLARD, E., DORNAND, J. & GROSS, A. (2007) Interaction of Brucella suis and Brucella abortus rough strains with human dendritic cells. *Infect Immun*, 75, 5916-23.
- BLANCO, P., PALUCKA, A. K., PASCUAL, V. & BANCHEREAU, J. (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 41-52.
- BOELE, L. C., BAJRAMOVIC, J. J., DE VRIES, A. M., VOSKAMP-VISSER, I. A., KAMAN, W. E. & VAN DER KLEIJ, D. (2009) Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules. *Cell Immunol*, 255, 17-25.
- BONAZZI, M. & COSSART, P. (2006) Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett*, 580, 2962-7.
- BOSCHIROLI, M. L., FOULONGNE, V. & O'CALLAGHAN, D. (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, 4, 58-64.
- BOYER, L. & LEMICHEZ, E. (2004) Targeting of host-cell ubiquitin and ubiquitin-like pathways by bacterial factors. *Nat Rev Microbiol*, 2, 779-88.
- CELLI, J. (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol*, 157, 93-8.
- CELLI, J., DE CHASTELLIER, C., FRANCHINI, D. M., PIZARRO-CERDA, J., MORENO, E. & GORVEL, J. P. (2003) Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 198, 545-56.
- CERVANTES, J., NAGATA, T., UCHIJIMA, M., SHIBATA, K. & KOIDE, Y. (2008) Intracytosolic Listeria monocytogenes induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol*, 10, 41-52.
- CHAIN, P. S., COMERCI, D. J., TOLMASKY, M. E., LARIMER, F. W., MALFATTI, S. A., VERGEZ, L. M., AGUERO, F., LAND, M. L., UGALDE, R. A. & GARCIA, E. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect Immun*, 73, 8353-61.
- CHEN, L. M., HOBBI, S. & GALAN, J. E. (1996) Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science*, 274, 2115-8.
- CHU, W., GONG, X., LI, Z., TAKABAYASHI, K., OUYANG, H., CHEN, Y., LOIS, A., CHEN, D. J., LI, G. C., KARIN, M. & RAZ, E. (2000) DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell*, 103, 909-18.
- CIRL, C., WIESER, A., YADAV, M., DUERR, S., SCHUBERT, S., FISCHER, H., STAPPERT, D., WANTIA, N., RODRIGUEZ, N., WAGNER, H., SVANBORG, C. & MIETHKE, T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med*, 14, 399-406.
- DE JONG, M. F., SUN, Y. H., DEN HARTIGH, A. B., VAN DIJL, J. M. & TSOLIS, R. M. (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*, 70, 1378-96.
- DE TREZ, C., MAGEZ, S., AKIRA, S., RYFFEL, B., CARLIER, Y. & MURAILLE, E. (2009) iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog*, 5, e1000494.
- DENISON, A. M., MASSUNG, R. F. & THOMPSON, H. A. (2007) Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of Coxiella burnetii. *FEMS Microbiol Lett*, 267, 102-7.
- DI FIORE, B. & PINES, J. (2008) Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle. *Chromosoma*, 117, 333-8.
- FINLAY, B. B. & MCFADDEN, G. (2006) Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, 124, 767-82.

- FORESTIER, C., DELEUIL, F., LAPAQUE, N., MORENO, E. & GORVEL, J. P. (2000) Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol*, 165, 5202-10.
- FU, Y. & GALAN, J. E. (1999) A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 401, 293-7.
- GAN, H., LEE, J., REN, F., CHEN, M., KORNFELD, H. & REMOLD, H. G. (2008) Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol*, 9, 1189-97.
- GAO, L. & ABU KWAIK, Y. (2000) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes Infect*, 2, 1705-19.
- GE, Z., SCHAUER, D. B. & FOX, J. G. (2008) In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*, 10, 1599-607.
- GEE, J. M., VALDERAS, M. W., KOVACH, M. E., GRIPPE, V. K., ROBERTSON, G. T., NG, W. L., RICHARDSON, J. M., WINKLER, M. E. & ROOP, R. M., 2ND (2005) The Brucella abortus Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun*, 73, 2873-80.
- GIAMBARTOLOMEI, G. H., DELPINO, M. V., CAHANOVICH, M. E., WALLACH, J. C., BALDI, P. C., VELIKOVSKY, C. A. & FOSSATI, C. A. (2002) Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J Infect Dis*, 186, 252-9.
- GONZALEZ, D., GRILLO, M. J., DE MIGUEL, M. J., ALI, T., ARCE-GORVEL, V., DELRUE, R. M., CONDE-ALVAREZ, R., MUNOZ, P., LOPEZ-GONI, I., IRIARTE, M., MARIN, C. M., WEINTRAUB, A., WIDMALM, G., ZYGMUNT, M., LETESSON, J. J., GORVEL, J. P., BLASCO, J. M. & MORIYON, I. (2008) Brucellosis vaccines: assessment of Brucella melitensis lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One*, 3, e2760.
- GORVEL, J. P. (2008) Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect*, 10, 1010-3.
- GORVEL, J. P. & MORENO, E. (2002) Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 90, 281-97.
- HAGHJOO, E. & GALAN, J. E. (2004) Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4614-9.
- HALLING, S. M., PETERSON-BURCH, B. D., BRICKER, B. J., ZUERNER, R. L., QING, Z., LI, L. L., KAPUR, V., ALT, D. P. & OLSEN, S. C. (2005) Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. *J Bacteriol*, 187, 2715-26.
- HAMON, M. A. & COSSART, P. (2008) Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*, 4, 100-9.
- HENDERSON, S. T. & PETES, T. D. (1992) Instability of simple sequence DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*, 12, 2749-57.
- HERSH, D., MONACK, D. M., SMITH, M. R., GHORI, N., FALKOW, S. & ZYCHLINSKY, A. (1999) The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2396-401.
- HEYWOOD, W., HENDERSON, B. & NAIR, S. P. (2005) Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J Med Microbiol*, 54, 207-16.
- HUBER, B., SCHOLZ, H. C., LUCERO, N. & BUSSE, H. J. (2009) Development of a PCR assay for typing and subtyping of Brucella species. *Int J Med Microbiol*.
- IWAI, H., KIM, M., YOSHIKAWA, Y., ASHIDA, H., OGAWA, M., FUJITA, Y., MULLER, D., KIRIKAE, T., JACKSON, P. K., KOTANI, S. & SASAKAWA, C. (2007) A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell*, 130, 611-23.

- JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- JIMENEZ DE BAGUES, M. P., DUDAL, S., DORNAND, J. & GROSS, A. (2005) Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immunol*, 114, 227-38.
- JIN, Z. & EL-DEIRY, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4, 139-63.
- JOZA, N., KROEMER, G. & PENNINGER, J. M. (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet*, 18, 142-9.
- JUBIER-MAURIN, V., BOIGEGRAIN, R. A., CLOECKAERT, A., GROSS, A., ALVAREZ-MARTINEZ, M. T., TERRAZA, A., LIAUTARD, J., KOHLER, S., ROUOT, B., DORNAND, J. & LIAUTARD, J. P. (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun*, 69, 4823-30.
- KAISHO, T. & AKIRA, S. (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 979-87; quiz 988.
- KAISHO, T. & AKIRA, S. (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 979-87; quiz 988.
- KHOSRAVI-FAR, R. & ESPOSTI, M. D. (2004) Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*, 3, 1051-7.
- KIM, D. W., CHU, H., JOO, D. H., JANG, M. S., CHOI, J. H., PARK, S. M., CHOI, Y. J., HAN, S. H. & YUN, C. H. (2008) OspF directly attenuates the activity of extracellular signal-regulated kinase during invasion by *Shigella flexneri* in human dendritic cells. *Mol Immunol*, 45, 3295-301.
- LAPAQUE, N., MORIYON, I., MORENO, E. & GORVEL, J. P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 8, 60-6.
- LESTRATE, P., DELRUE, R. M., DANESE, I., DIDEMBOURG, C., TAMINIAU, B., MERTENS, P., DE BOLLE, X., TIBOR, A., TANG, C. M. & LETESSON, J. J. (2000) Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol*, 38, 543-51.
- LOCHNER, M., KASTENMULLER, K., NEUENHAHN, M., WEIGHARDT, H., BUSCH, D. H., REINDL, W. & FORSTER, I. (2008) Decreased susceptibility of mice to infection with *Listeria monocytogenes* in the absence of interleukin-18. *Infect Immun*, 76, 3881-90.
- LY, K. T. & CASANOVA, J. E. (2007) Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol*, 9, 2103-11.
- MARTINON, F. & TSCHOPP, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*, 26, 447-54.
- MARTINON, F. & TSCHOPP, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*, 26, 447-54.
- MEDZHITOV, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-26.
- MEIER, P., FINCH, A. & EVAN, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- MEYLAN, E., TSCHOPP, J. & KARIN, M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442, 39-44.
- MOGENSEN, T. H., BERG, R. S., OSTERGAARD, L. & PALUDAN, S. R. (2008) *Streptococcus pneumoniae* stabilizes tumor necrosis factor alpha mRNA through a pathway dependent on p38 MAPK but independent of Toll-like receptors. *BMC Immunol*, 9, 52.
- MORENO, E., CLOECKAERT, A. & MORIYON, I. (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, 90, 209-27.
- NEWMAN, R. M., SALUNKHE, P., GODZIK, A. & REED, J. C. (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun*, 74, 594-601.

- NIJSKENS, C., COPIN, R., DE BOLLE, X. & LETESSON, J. J. (2008) Intracellular rescuing of a *B. melitensis* 16M virB mutant by co-infection with a wild type strain. *Microb Pathog*, 45, 134-41.
- NOUGAYREDE, J. P., TAIEB, F., DE RYCKE, J. & OSWALD, E. (2005) Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol*, 13, 103-10.
- OCHOA-REPARAZ, J., SENTISSI, J., TRUNKLE, T., RICCARDI, C. & PASCUAL, D. W. (2007) Attenuated *Coxiella burnetii* phase II causes a febrile response in gamma interferon knockout and Toll-like receptor 2 knockout mice and protects against reinfection. *Infect Immun*, 75, 5845-58.
- OGAWA, M. & SASAKAWA, C. (2006) Intracellular survival of *Shigella*. *Cell Microbiol*, 8, 177-84.
- OLIVEIRA, S. C., DE OLIVEIRA, F. S., MACEDO, G. C., DE ALMEIDA, L. A. & CARVALHO, N. B. (2008) The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect*, 10, 1005-9.
- O'LOUGHLIN, E. V. & ROBINS-BROWNE, R. M. (2001) Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect*, 3, 493-507.
- O'NEILL, L. A. & BOWIE, A. G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7, 353-64.
- OSWALD, E., NOUGAYREDE, J. P., TAIEB, F. & SUGAI, M. (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol*, 8, 83-91.
- PATEL, J. C. & GALAN, J. E. (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol*, 8, 10-5.
- PETERS, J. M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 644-56.
- PFLEGER, C. M., SALIC, A., LEE, E. & KIRSCHNER, M. W. (2001) Inhibition of Cdh1-APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes Dev*, 15, 1759-64.
- PIETERS, J. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*, 3, 399-407.
- PIZARRO-CERDA, J. & COSSART, P. (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124, 715-27.
- RADHAKRISHNAN, G. K., YU, Q., HARMS, J. S. & SPLITTER, G. A. (2009) *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J Biol Chem*, 284, 9892-8.
- RAJASHEKARA, G., GLASNER, J. D., GLOVER, D. A. & SPLITTER, G. A. (2004) Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol*, 186, 5040-51.
- RASOOL, O., FREER, E., MORENO, E. & JARSTRAND, C. (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect Immun*, 60, 1699-702.
- ROOP, R. M., 2ND, BELLAIRE, B. H., VALDERAS, M. W. & CARDELLI, J. A. (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol*, 52, 621-30.
- ROY, C. R. (2002) Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens. *Trends Microbiol*, 10, 418-24.
- ROY, C. R. & MOCARSKI, E. S. (2007) Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol*, 8, 1179-87.
- SABROE, I., PARKER, L. C., DOWER, S. K. & WHYTE, M. K. (2008) The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol*, 214, 126-35.
- SABROE, I., PARKER, L. C., DOWER, S. K. & WHYTE, M. K. (2008) The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol*, 214, 126-35.
- SALCEDO, S. P. & HOLDEN, D. W. (2005) Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Microbiol*, 8, 92-8.

- SALCEDO, S. P., MARCHESINI, M. I., LELOUARD, H., FUGIER, E., JOLLY, G., BALOR, S., MULLER, A., LAPAQUE, N., DEMARIA, O., ALEXOPOULOU, L., COMERCI, D. J., UGALDE, R. A., PIERRE, P. & GORVEL, J. P. (2008) Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog*, 4, e21.
- SCHMECK, B., LORENZ, J., N'GUESSAN P, D., OPITZ, B., VAN LAAK, V., ZAHLTEN, J., SLEVOGT, H., WITZENRATH, M., FLIEGER, A., SUTTORP, N. & HIPPENSTIEL, S. (2008) Histone acetylation and flagellin are essential for Legionella pneumophila-induced cytokine expression. *J Immunol*, 181, 940-7.
- SCHMECK, B., N'GUESSAN, P. D., OLLOMANG, M., LORENZ, J., ZAHLTEN, J., OPITZ, B., FLIEGER, A., SUTTORP, N. & HIPPENSTIEL, S. (2007) Legionella pneumophila-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *Eur Respir J*, 29, 25-33.
- SCHROEDER, G. N., JANN, N. J. & HILBI, H. (2007) Intracellular type III secretion by cytoplasmic Shigella flexneri promotes caspase-1-dependent macrophage cell death. *Microbiology*, 153, 2862-76.
- SHANNON, J. G., HOWE, D. & HEINZEN, R. A. (2005) Virulent Coxiella burnetii does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8722-7.
- SMITH, J. L. & BAYLES, D. O. (2006) The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*, 32, 227-48.
- SPANO, S. & GALAN, J. E. (2008) A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. *Curr Opin Microbiol*, 11, 15-20.
- SPANO, S., UGALDE, J. E. & GALAN, J. E. (2008) Delivery of a Salmonella Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*, 3, 30-8.
- STARR, T., NG, T. W., WEHRLY, T. D., KNODLER, L. A. & CELLI, J. (2008) Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 9, 678-94.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*, 34, 73-82.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*, 34, 73-82.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16, 3-9.
- THIBAUT, S., FROMENTIN, R., TARDIF, M. R. & TREMBLAY, M. J. (2009) TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology*, 6, 42.
- TUMURKHUU, G., KOIDE, N., TAKAHASHI, K., HASSAN, F., ISLAM, S., ITO, H., MORI, I., YOSHIDA, T. & YOKOCHI, T. (2006) Characterization of biological activities of Brucella melitensis lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol*, 50, 421-7.
- VAN VLIET, S. J., DEN DUNNEN, J., GRINGHUIS, S. I., GEIJTENBEEK, T. B. & VAN KOOYK, Y. (2007) Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 19, 435-40.
- VOTH, D. E. & HEINZEN, R. A. (2007) Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of Coxiella burnetii. *Cell Microbiol*, 9, 829-40.
- VRIONI, G., PAPPAS, G., PRIAVALI, E., GARTZONIKA, C. & LEVIDIOTOU, S. (2008) An eternal microbe: Brucella DNA load persists for years after clinical cure. *Clin Infect Dis*, 46, e131-6.
- WATARAI, M., MAKINO, S., FUJII, Y., OKAMOTO, K. & SHIRAHATA, T. (2002) Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol*, 4, 341-55.
- WEISS, D. S., TAKEDA, K., AKIRA, S., ZYCHLINSKY, A. & MORENO, E. (2005) MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of Brucella abortus. *Infect Immun*, 73, 5137-43.

- WESSON, C. A., DERINGER, J., LIOU, L. E., BAYLES, K. W., BOHACH, G. A. & TRUMBLE, W. R. (2000) Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun*, 68, 2998-3001.
- YAMAMOTO, M., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004) TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*, 40, 861-8.
- YU, H. (2002) Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 706-14.
- ZAMBONI, D. S., CAMPOS, M. A., TORRECILHAS, A. C., KISS, K., SAMUEL, J. E., GOLENBOCK, D. T., LAUW, F. N., ROY, C. R., ALMEIDA, I. C. & GAZZINELLI, R. T. (2004) Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem*, 279, 54405-15.
- ZENEWICZ, L. A. & SHEN, H. (2007) Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect*, 9, 1208-15.
- ZHOU, D., CHEN, L. M., HERNANDEZ, L., SHEARS, S. B. & GALAN, J. E. (2001) A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol*, 39, 248-59.
- ZURAWSKI, D. V., MUMY, K. L., FAHERTY, C. S., MCCORMICK, B. A. & MAURELLI, A. T. (2009) *Shigella flexneri* type III secretion system effectors OspB and OspF target the nucleus to downregulate the host inflammatory response via interactions with retinoblastoma protein. *Mol Microbiol*, 71, 350-68.
- ZYGMUNT, M. S., HAGIUS, S. D., WALKER, J. V. & ELZER, P. H. (2006) Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect*, 8, 2849-54.