



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude comparative de LDL modifiées dans la partie lipidique et/ou protéique sur l'activation induite des monocytes/macrophages humains et murins en culture, stimulés ou non

Fretin, David

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Caractérisation du gène encodant un régulateur
du système à deux composants chez *Brucella*.**

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

biologiques

Fretin David

1996

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

**CARACTÉRISATION DU GÈNE ENCODANT UN RÉGULATEUR DU SYSTÈME À
DEUX COMPOSANTS CHEZ *BRUCELLA***

Fretin David

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude de la régulation transcriptionnelle dans le genre *Brucella*. Nous avons cloné et séquencé un régulateur du système de transduction du signal à deux composants. La séquence protéique déduite présente 80% d'identité avec la protéine CtrA de *Caulobacter crescentus* (CtrAC). Chez *C. crescentus*, cette protéine est essentielle et régule de nombreuses étapes de la différenciation (système des flagelles) et du cycle cellulaire (méthylase de l'ADN: gène *ccrM*). Par southern blotting, nous avons montré que ce gène est présent chez 4 espèces de *Brucella* et nous n'avons pas mis en évidence de polymorphisme de restriction dans cette région génomique. Le résultat d'un essai de délétion par remplacement du gène suggère que ce gène très conservé est essentiel à la survie de *Brucella*. Une expérience préliminaire de mise en évidence du gène homologue à *ccrM* de *Caulobacter* a été réalisée chez *Brucella*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1996

Promoteur: J.Vandenhautte

Copromoteur: E.Feytmans et J.J. Letesson

Je tiens à remercier le professeur Vandenhoute de m'avoir conseillé pendant ce mémoire et le professeur Letesson de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie particulièrement Anne pour sa grande disponibilité et les judicieux conseils dispensés au cours de ce mémoire.

Je remercie tous les autres membres du laboratoire pour la bonne ambiance qu'ils ont su entretenir et pour leurs conseils.

TABLES DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCTION..... | 1 |
| 1. RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE CHEZ LES PROCARYOTES | 1 |
| 1.1 La transcription | 1 |
| 1.1.1 Description de la machinerie transcriptionnelle..... | 1 |
| 1.1.2 Régulation de l'initiation par la sous-unité s | 1 |
| 1.1.3 Étapes de la transcription | 1 |
| 1.2 Le point fondateur : L'étude de l'opéron lactose | 2 |
| 1.3 Les systèmes multigéniques..... | 3 |
| 1.3.1 Paradigme des systèmes multigéniques..... | 3 |
| 1.3.2 Un exemple de système multigénique: la répression catabolique..... | 3 |
| 1.4 Un système multigénique particulier: le système à 2 composants..... | 4 |
| 1.4.1 Paradigme du système à deux composants..... | 4 |
| 1.4.2 Structure du complexe senseur | 4 |
| 1.4.3 Structure du complexe régulateur..... | 4 |
| 1.4.4 Relation entre la structure et la fonction..... | 5 |
| 1.4.5 Complexité et efficacité du système | 6 |
| 1.5 Autres mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle..... | 6 |
| 1.5.1 Régulation par la structure secondaire de l'ARN-messager..... | 6 |
| 1.5.1.1 La terminaison de la transcription..... | 6 |
| 1.5.1.2 L'antiterminaison..... | 6 |
| 1.5.1.3 Phénomènes d'atténuation..... | 7 |
| 1.5.1.4 Synthèse d'ARN antisens | 7 |
| 1.5.2 Les protéines H-NS et le superenroulement | 8 |
| 1.5.3 Les boucles dans le génome..... | 8 |
| 2. LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ <i>Caulobacter crescentus</i> | 9 |
| 2.1. Le genre <i>Caulobacter</i> | 9 |
| 2.2 Le cycle cellulaire..... | 9 |
| 2.3 Aspects moléculaire du cycle..... | 9 |
| 2.3.1 Mise en évidence de la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire..... | 10 |
| 2.3.2 Mise en évidence d'autres éléments du système à deux composants impliqués dans la division cellulaire..... | 11 |
| 2.3.3 Localisation des protéines dans la cellule prédivisionnelle..... | 12 |
| 3. LE GENRE <i>Brucella</i> | 14 |
| BUT DU TRAVAIL | 16 |
| II. MATERIEL ET METHODES | 17 |
| 1. Souches bactériennes et plasmides..... | 17 |
| 1.1 Souches bactériennes..... | 17 |
| 1.1.1 <i>E. coli</i> XL1-blue..... | 17 |
| 1.1.2 <i>E. coli</i> S17/1..... | 17 |
| 1.1.3 <i>Brucella</i> sp..... | 17 |
| 1.1.4 Identification de <i>Brucella</i> sp. par agglutination..... | 18 |
| 1.1.5 <i>Caulobacter crescentus</i> | 18 |
| 1.2 Plasmides bactériens..... | 18 |
| 2. Milieux de culture..... | 19 |
| 3. Conjugaison..... | 19 |
| 4. Techniques d'ADN recombinant..... | 21 |

| | |
|--|--------|
| 4.1. Extraction d'ADN plasmidique..... | 21 |
| 4.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i> | 21 |
| 4.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i> | 21 |
| 4.1.3. Restriction de l'ADN..... | 22 |
| 4.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose..... | 23 |
| 4.1.5. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose..... | 23 |
| 4.1.6. Réaction de ligation..... | 24 |
| 4.1.7. Réaction de fill in et de rognage..... | 24 |
| 4.1.8. Transformation bactérienne..... | 24 |
| 4.1.9. Electroporation bactérienne..... | 26 |
| 5. Amplification d'ADN par PCR..... | 27 |
| 6. Purification des fragments obtenus par PCR..... | 27 |
| 7. Séquençage d'ADN..... | 28 |
| 8. Analyse de l'ADN génomique de <i>Brucella sp.</i> par Southern blot..... | 29 |
| 8.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Brucella sp.</i> | 29 |
| 8.2. Restriction de l'ADN génomique par <i>Hind</i> III..... | 29 |
| 8.3. Electrophorèse en gel d'agarose..... | 30 |
| 8.4. Transfert et immobilisation..... | 30 |
| 8.5. Obtention de la sonde..... | 31 |
| 8.6. Marquage de la sonde et vérification..... | 31 |
| 8.7. Hybridation..... | 32 |
| 8.8. Détection et révélation..... | 32 |
| 9. Western blot..... | 34 |
| 9.1. Principe..... | 34 |
| 9.2. Solutions, tampons & matériel..... | 36 |
| 9.3. Protocole..... | 36 |
| 9.4. Mise en évidence d'une protéine par dot blot..... | 37 |
| III. RESULTATS..... | 38 |
| 1. Clonage d'un gène encodant le régulateur d'un système de transduction du signal chez <i>Brucella</i> | 38 |
| 1.1. Mise en évidence par PCR de régulateurs de systèmes à deux composants chez <i>Brucella abortus</i> et <i>Brucella melitensis</i> | 38 |
| 1.2. Construction d'une banque génomique de <i>Brucella abortus</i> | 39 |
| 1.3. Clonage du gène de <i>Brucella</i> encodant le régulateur identifié par PCR..... | 40 |
| 2 Caractérisation du gène de <i>Brucella</i> encodant le régulateur..... | 41 |
| 2.1. Clonage de l'insert du phage positif en plasmide..... | 41 |
| 2.2 Séquençage du gène encodant le régulateur..... | 41 |
| 3. Mise en évidence du gène <i>ctrA</i> chez 4 espèces de <i>Brucella</i> | 43 |
| 4. Construction d'un délétant du gène <i>ctrAB</i> chez <i>B. melitensis</i> 16M..... | 43 |
| 5. Mise en évidence de la protéine CtrA chez <i>Brucella</i> | 46 |
| 6. Tentative de détection du gène <i>ccrM</i> chez <i>Brucella</i> | 48 |
| IV. CONCLUSIONS..... | 50 |
| V. PERSPECTIVES..... | 52 |
| VI. BIBLIOGRAPHIE..... | 54 |

INTRODUCTION

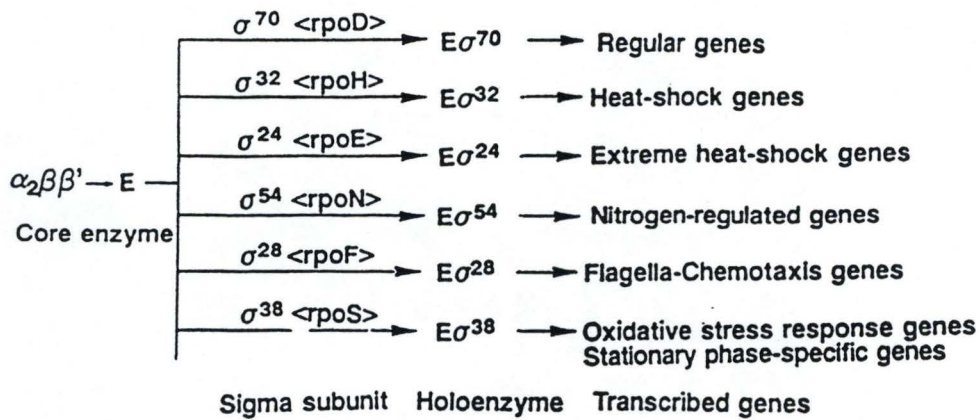
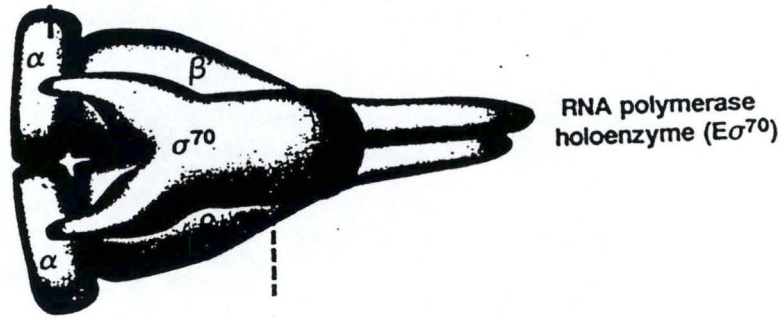


fig.1.1 et 1.2: Représentation schématique des sous-unités de l'ARN Polymérase.

Présentation des différentes sous-unités σ d' *E. coli* et des gènes qu'elles régulent(Ishihama., 1993).

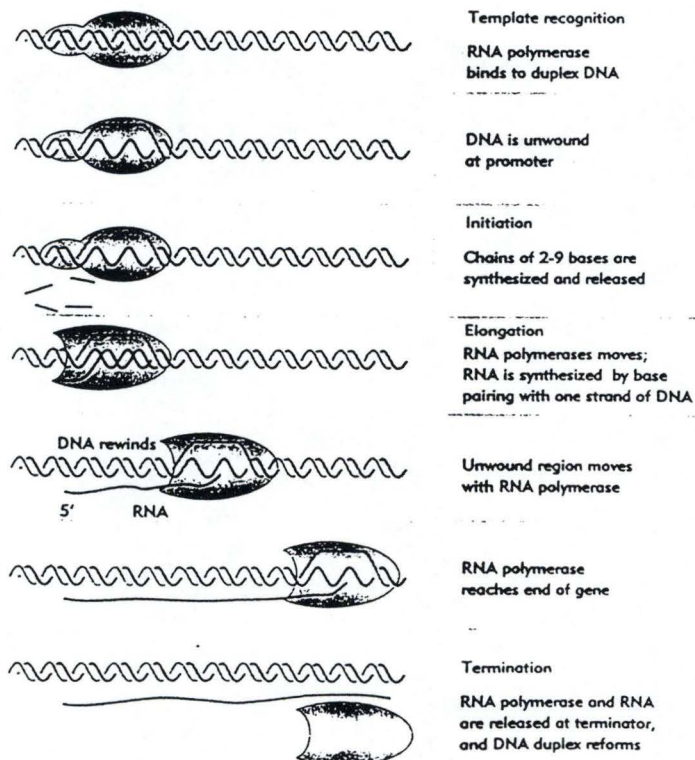


fig.1.3: Etapes de la transcription (Lewin., 1994).

I. INTRODUCTION

1. RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE CHEZ LES PROCARYOTES

Le génome est généralement considéré comme le plan de construction de la cellule. A travers les divers programmes de séquençage, on commence à connaître les éléments qui le composent. Son inventaire est une étape, terminée pour certains organismes, l'étape suivante est de comprendre comment ces divers éléments interagissent pour conduire à l'élaboration de l'organisme et l'adapter à son milieu. Cette recherche est entreprise depuis une trentaine d'années chez les procaryotes et plus particulièrement chez *Escherichia coli*.

C'est principalement à travers la régulation transcriptionnelle et plus précisément à travers son initiation que je vais illustrer l'expression génomique chez les procaryotes.

1.1 La transcription

1.1.1 Description de la machinerie transcriptionnelle

La machinerie transcriptionnelle (l'ARN-polymérase) est une enzyme qui catalyse la polymérisation de ribonucléotides tri-phosphates en ARN (Lewin, 1994). L'enzyme est constituée de deux parties: une partie dont la structure ne varie pas selon les gènes traduits et une autre partie variable (Ishihama, 1993). La partie constante est constituée par les sous-unités $\alpha_2\beta\beta'$, elle est le siège catalytique de l'enzyme (fig.1.1). La partie variable est constituée par le facteur σ qui permet la reconnaissance spécifique des sites promoteurs. Si l'on regarde plus en détail la partie catalytique, on remarque que la sous-unité β' est le site de liaison à l'ADN, β est le site catalytique et les deux sous-unités α_2 ont un rôle structural (Ishihama, 1993).

1.1.2 Régulation de l'initiation par la sous-unité σ

Le facteur σ est la sous-unité responsable de l'initiation. Elle induit une liaison spécifique avec un site promoteur donné de l'ADN. Chez *E. coli* six facteurs σ différents sont connus. Ils sont associés aux sous-unités $\alpha\beta\beta'$ selon les conditions du milieu (fig.1.2), par exemple σ_{70} s'y trouvera associé quand la cellule est en phase de croissance exponentielle (Ishihama, 1993).

1.1.3 Étapes de la transcription

La synthèse de l'ARN messager peut être résumée comme suit: l'holoenzyme commence par reconnaître un promoteur grâce à sa sous-unité σ (fig.1.3). Après sa liaison à l'ADN, l'enzyme change la topologie de l'ADN: elle désenroule et déshybride l'ADN double brin sur environ 8 paires de bases. La polymérase va ensuite se déplacer sur la chaîne d'ADN. Des débuts de polymérisation s'opèrent, des chaînes comprenant 2 à 9 paires de bases sont synthétisées et sont relâchées par le complexe enzymatique. Quand une chaîne d'ARN de plus de 9 paires de bases est synthétisée, l'élongation commence: le facteur σ est relâché, 10 paires de bases sont alors en simple brin et l'enzyme polymérise l'ARN en avançant le long de l'ADN complémentaire. L'ARN

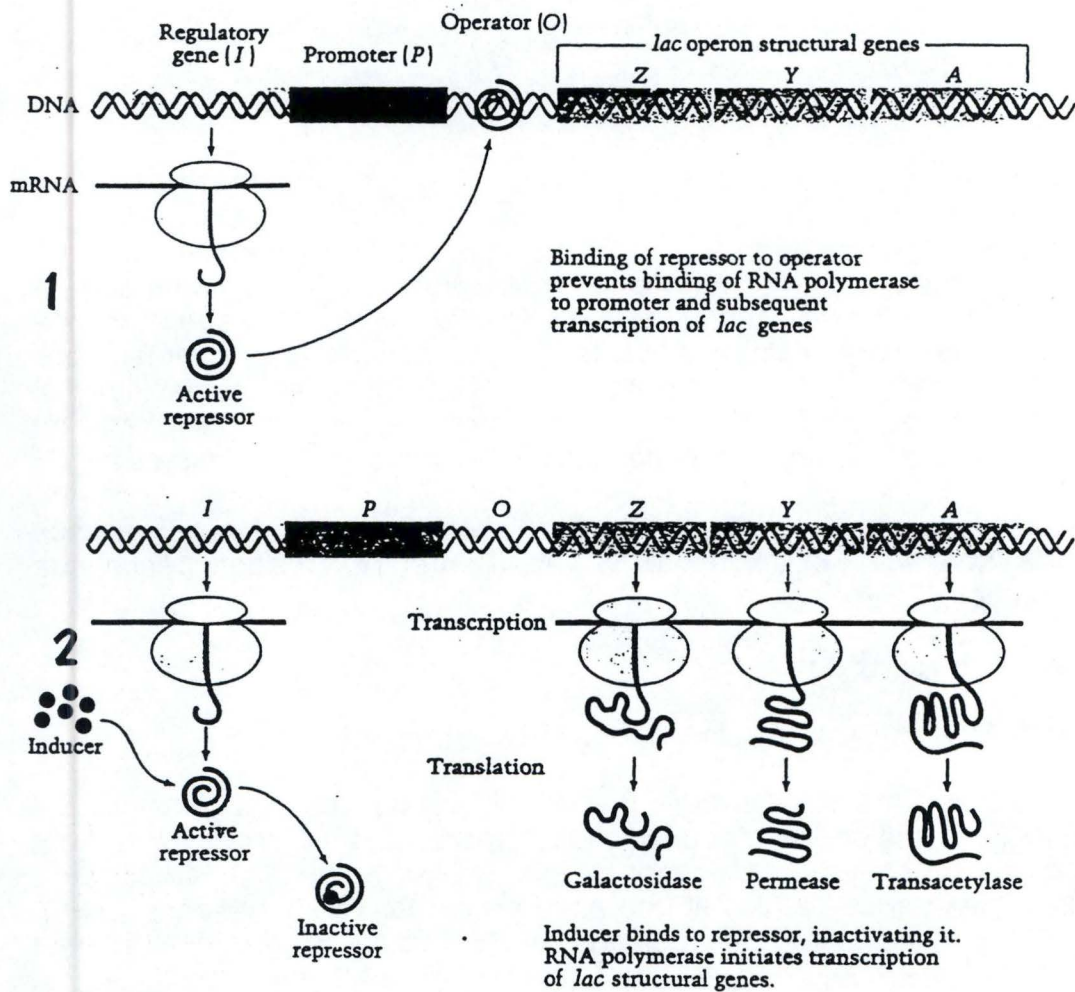


fig.1.4: Schéma représentant la carte de l'opéron lactose et les événements de transcription en absence(1) et en présence(2) de glucose.(Neidhart et al., 1990).

néosynthétisé est directement accessible pour la machinerie traductionnelle. La terminaison de la transcription sera développée dans un point ultérieur.

1.2 Le point fondateur : l'étude de l'opéron lactose

La façon dont l'organisme appréhende son milieu et s'y adapte est une question fondamentale en biologie moléculaire. Un début de réponse a été apporté par le modèle de l'opéron lactose que Jacob et Monod ont proposé en 1961. Ce modèle, central en biologie moléculaire, a été réalisé en étudiant le métabolisme du lactose chez *E. coli* (Neidhardt *et al.*, 1990).

A travers des expériences biochimiques et génétiques Jacob et Monod ont démontré que la cellule pouvait, dans un premier temps, détecter la présence du lactose dans le milieu et, dans un second temps, adapter la synthèse des enzymes de son catabolisme.

Deux observations permettent d'élaborer le modèle:

Premièrement, les gènes codant pour le catabolisme du lactose sont regroupés spatialement dans le génome: il s'agit des gènes encodant la galactosidase, la perméase et la transacétylase. Ces gènes sont précédés de la séquence encodant le régulateur ainsi que d'un promoteur et d'un site opérateur.

La seconde observation est que la cellule peut appréhender la présence de lactose dans le milieu. Quand le lactose est présent, il induit un changement allostérique du régulateur en s'associant avec lui. Ce changement occasionne une diminution de l'affinité du régulateur pour la région opératrice de l'ADN, et par là-même permet une initiation de la transcription des gènes (fig 1.4).

Ces constatations ont permis de définir le concept d'opéron: il s'agit d'une unité génétique comprenant un gène régulateur, des séquences régulatrices et des gènes structuraux qui sont soumis ensemble à ce régulateur.

Après cette réussite, de nombreux chercheurs ont transposé et transposent toujours ce modèle à d'autres voies métaboliques. Des variantes ont été ajoutées au modèle, par exemple: dans le cadre de l'anabolisme, la régulation est négative. Ainsi, dans l'opéron tryptophane, la présence de cet acide aminé dans le milieu inhibe l'expression des gènes encodant les enzymes responsables de sa synthèse.

Le modèle de l'opéron a ses limites. Il ne permet pas d'expliquer la régulation de manière globale mais il garde toute sa pertinence en tant que petite unité de régulation. Ces limites sont illustrées à travers les observations suivantes: certaines exigences métaboliques demandent de nombreux gènes qui ne peuvent être regroupés en un seul opéron, ainsi la formation de la machinerie traductionnelle qui demanderait un opéron comprenant 150 gènes. De plus, un niveau d'organisation supérieur doit exister car certains opérons sont régulés de manière opposée vis-à-vis d'un même stimulus, par exemple: la croissance en présence de certains nutriments devra augmenter la transcription d'opérons et en réprimer certains autres. Ajoutons encore que l'amplification du signal ne peut pas être expliquée par le modèle de l'opéron. Ces trois observations ont permis aux biologistes de mettre en évidence un niveau supérieur d'organisation: les systèmes multigéniques (Neidhardt *et al.*, 1990).

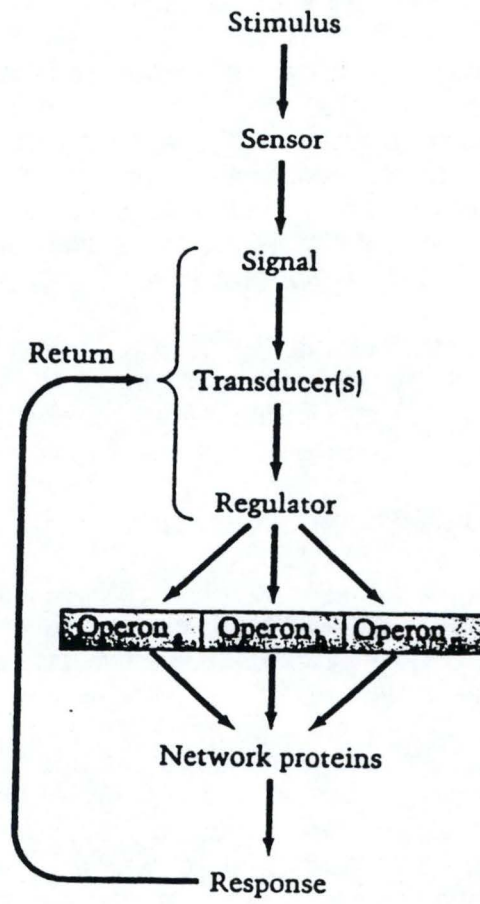


fig.1.5: Schéma des étapes la transduction du signal dans les systèmes multigéniques(Neidhart *et al.*, 1990).

1.3 Les systèmes multigéniques

Une centaine de systèmes multigéniques ont été mis en évidence chez les procaryotes. Ces systèmes sont impliqués dans quasiment toute la physiologie cellulaire, par exemple: dans le métabolisme, en réponse à une carence en nutriments, à divers stress (oxidatif, choc thermique), dans la sporulation, la virulence, la division cellulaire.

1.3.1 Paradigme des systèmes multigéniques

Ces systèmes sont constitués d'un senseur, d'un ou de plusieurs transducteurs, d'un ou de plusieurs régulateurs et de différents opérons régulés. Le flux d'informations passe du senseur au régulateur via le transducteur (fig.1.5).

Ce type de systèmes permet une amplification: une molécule de senseur peut activer plusieurs molécules de transducteur, ce qui augmente l'intensité du signal. Les systèmes multigéniques permettent aussi de réguler différemment plusieurs opérons.

1.3.2 Un exemple de système multigénique: la répression catabolique

La répression catabolique permet de comprendre comment les entérobactériacées vivent sur un milieu ne comportant qu'une seule source de carbone et comment elles donnent priorité au catabolisme du glucose.

Le nombre total d'opérons touchés par ce système n'est pas connu, néanmoins des études sur différents opérons (lactose, galactose, arabinose, maltose, tryptophane, D-sérine et histidine) ont montré qu'ils possèdent une séquence consensus reconnue par le régulateur CAP (pour Catabolic Activator Protein).

Le système peut être décrit comme suit: le régulateur est constitué de l'association entre l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la CAP, tandis que le senseur est la protéine gIII du système de phosphotransfert (PTS).

La réponse du système face à un changement de l'environnement, par exemple l'absence de glucose, peut être modélisée de cette façon: le phosphate du phosphoénolpyruvate est transféré des protéines du PTS à l'adénylate cyclase associée à la protéine gIII. Ce transfert de phosphate active l'adénylate cyclase qui forme de l'AMPc. L'AMPc formé s'associe avec la protéine CAP. Ce complexe CAP-AMPc a une affinité nettement plus importante pour les séquences régulatrices de l'opéron que la protéine CAP seule. La liaison du complexe avec le domaine régulateur a pour effet d'augmenter la transcription des gènes de l'opéron (fig.1.6).

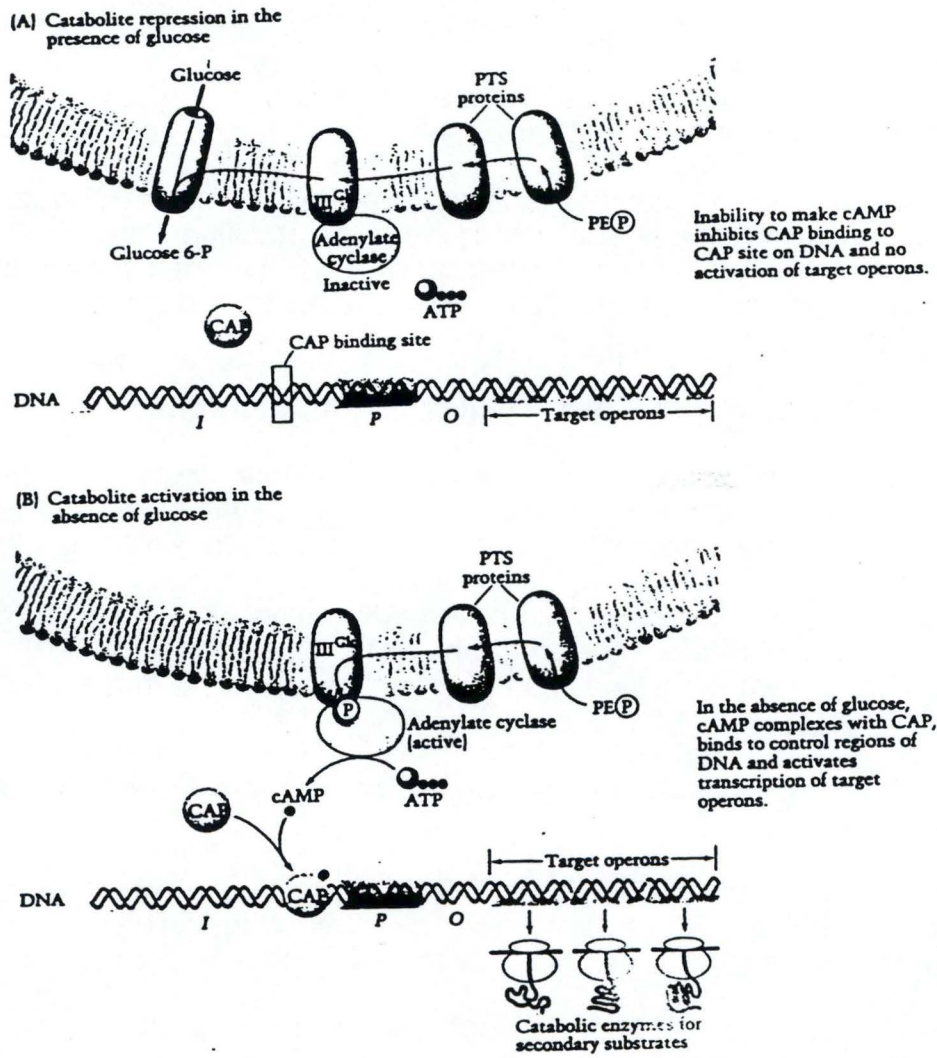


fig.1.6: Repression catabolique par le glucose (Neidhart *et al.*, 1990).

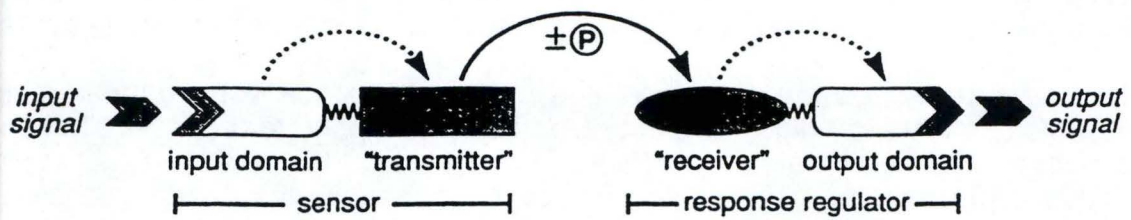


fig.1.7: Présentation du système à deux composants. (Parkinson & kofoid, 1992)

1.4 Un système multigénique particulier: le système à deux composants

Il y a environ une dizaine d'années la recherche sur les systèmes multigéniques mettait en évidence un nouveau groupe de protéines responsables de la transduction du signal chez les procaryotes: le système à deux composants. Ce système est important puisqu'on en décrit actuellement une cinquantaine dans 40 genres bactériens (Swanson *et al.*, 1994).

1.4.1 Paradigme du système à deux composants

Le flux de l'information à travers ce système se fait via deux intermédiaires protéiques, un senseur (ou histidine-kinase) et un régulateur de réponse. Le senseur, généralement membranaire, perçoit un stimulus qu'il transmet au régulateur, cytoplasmique, et dont le rôle consistera le plus souvent à moduler l'expression de gènes (Stock *et al.*, 1990; Stock *et al.*, 1995).

En général, quatre domaines constituent le système. Les domaines senseur et transmetteur forment le senseur proprement dit, de même que les domaines receveur et effecteur constituent le régulateur. Les éléments conservés entre les différents systèmes sont le domaine transmetteur et le domaine receveur.

La transduction du signal à travers ce système peut être schématisée comme suit: le domaine senseur, lorsqu'il perçoit un stimulus, transmet l'information à son domaine transmetteur qui se phosphoryle au niveau d'une histidine. Ce transmetteur phosphorylé active le régulateur en transférant son groupe phosphate sur un aspartate du domaine receveur qui modulera en retour le domaine effecteur (fig.1.7).

1.4.2 Structure du complexe senseur

Ce complexe est formé par l'association d'un domaine senseur et d'un domaine transmetteur. Les différents domaines senseurs ne présentent pas d'homologie de séquence. Cette observation s'explique par le fait que chacun des systèmes est adapté à son propre stimulus. Par contre, une similarité significative est observée en comparant les domaines transmetteurs. Elle se concentre logiquement au niveau du site fonctionnel du domaine, c'est-à-dire au niveau du résidu histidine, généralement situé à environ 110 résidus de l'extrémité N-terminale de la protéine et des résidus nécessaires à l'activité kinasique (Stock *et al.*, 1995).

1.4.3 Structure du complexe régulateur

L'étude du domaine receveur est facilitée par le travail réalisé par Volz (1993) sur la protéine CheY. Cette protéine comporte un seul domaine, receveur, et intervient dans la régulation du chémotactisme chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Amsler & Maturama, 1995).

La structure de CheY a été déterminée par diffraction aux rayons X et par RMN. Cette protéine est composée de 128 acides aminés qui forment 5 brins β parallèles entourés de 5 hélices α , reliés entre eux par différents "loops". La structure tridimensionnelle de CheY (fig.1.8) ressemble à un tonneau. Les trois

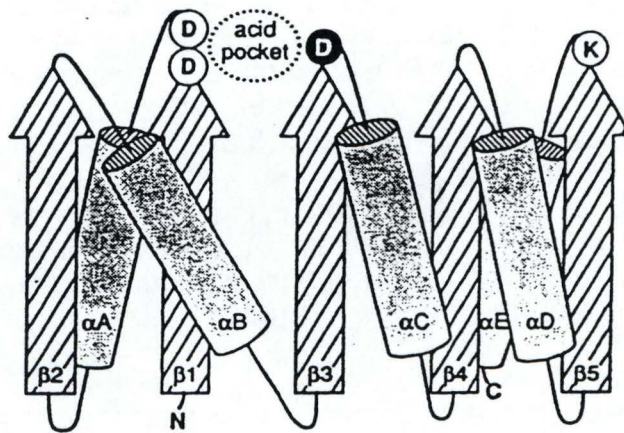


fig.1.8: Modèles topologiques de la protéine Che Y. (Parkinson & kofoid, 1992)

brins β situés au centre de cette structure constituent le site fonctionnel de la protéine, ils contiennent les résidus qui forment le site catalytique (une poche acide) et l'aspartate qui est phosphorylé lors du transfert du phosphate (Volz, 1995).

Connaissant la structure de CheY, Volz a recherché si celle-ci se retrouvait au niveau d'autres régulateurs de réponse. La comparaison des séquences de 79 domaines a révélé une similarité significative entre eux ainsi qu'avec CheY. Une famille de protéines a donc été définie. CheY étant la protéine la mieux connue de cette famille, elle s'est imposée comme modèle au niveau de la relation structure-fonction et est toujours la référence en matière de modélisation de domaines receveurs.

L'étude des différents complexes régulateurs a donc montré que leurs domaines receveurs présentent des similarités. A l'opposée, l'autre domaine, l'effecteur, présente des variations qui ont permis de subdiviser la famille des complexes régulateurs en quatre sous-familles: la première est composée des complexes qui ressemblent à CheY c'est-à-dire qui ne sont composés que du seul domaine receveur. La seconde s'apparente aux complexes de type OmpR composés d'un domaine régulateur et d'un domaine effecteur qui se lie à l'ADN. La sous-famille suivante est composée des régulateurs de type Ntrc c'est-à-dire composée d'un domaine régulateur et de domaines effecteurs d'environ 460 acides aminés. La quatrième sous-famille est constituée par le régulateur FixJ qui comprend un domaine accolé au domaine régulateur, qui se lie probablement à l'ADN. Une famille de protéines hybrides présente les complexes senseur et régulateur associés sur une même molécule (Parkinson *et al.*, 1992; Stock *et al.*, 1995).

1.4.4 Relation entre la structure et la fonction

L'effet du stimulus sur le complexe régulateur est encore peu connu. Néanmoins, l'hypothèse la plus fréquemment avancée est une oligomérisation du senseur suite à l'activation par le stimulus. Cette hypothèse est confortée par des expériences de mutagenèse dirigée contre les résidus nécessaires à la formation d'une structure quaternaire (Tatsuno *et al.*, 1996). Cette oligomérisation faciliterait la phosphorylation de l'histidine d'un des monomères par le site catalytique de l'autre. La cinétique de la phosphorylation peut être caractérisée comme suit: 1°) oligomérisation (le plus souvent une dimérisation), 2°) liaison à un nucléotide (ATP) et 3°) phosphorylation de l'histidine (Stock *et al.*, 1995).

Étant donné son instabilité, le groupement phosphate aura rapidement tendance à se lier à l'aspartate du domaine receveur. Il est intéressant de noter que peu de "cross-talks", c'est-à-dire de phosphorylations aspécifiques, surviennent dans la cellule. La phosphorylation semble être catalysée par le régulateur lui-même: des expériences de phosphorylation *in vitro*, où le régulateur est mis en présence de petites molécules phosphodonneuses (acétyl-phosphate, imidazole phosphate, carbamyl phosphate,...) ont montré qu'il y avait phosphorylation, et ce en l'absence du senseur.

La phosphorylation sur le domaine régulateur induirait un changement conformationnel (Swanson *et al.*, 1994). Néanmoins le transfert de l'information vers le domaine effecteur reste moins compris mais un changement

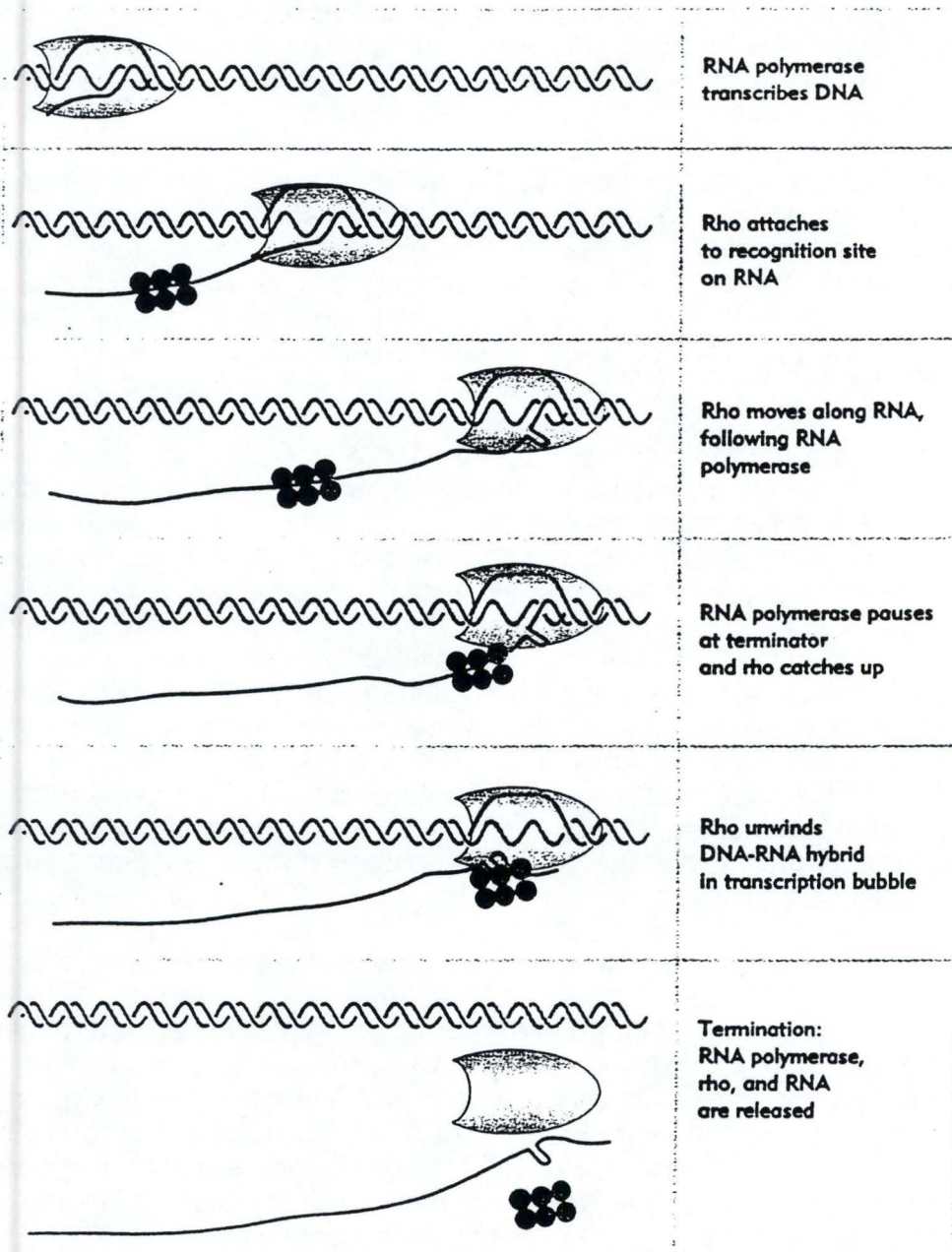


fig.1.9: Mécanisme moléculaire de la terminaison Rho dépendante. (Lewin, 1994).

conformationnel du complexe entier engendré par le changement du domaine régulateur reste l'hypothèse la plus probable.

1.4.5 Complexité et efficacité du système

L'agencement du système en 4 domaines interagissant entre eux permet l'adaptation, la spécificité et l'efficacité. L'adaptation et la spécificité du système se marquent surtout au niveau des domaines senseur et effecteur qui par leur variabilité permettent d'adapter une réponse spécifique suite à la perception d'un signal spécifique lui-aussi.

L'efficacité du système provient des domaines transmetteur et receveur, conservés au sein des senseurs et des régulateurs. La présence du système et plus particulièrement de ces domaines chez de nombreux genres procaryotes mais aussi eucaryotes prouve que ce paradigme est un des meilleurs compromis biochimiques pour la communication entre protéines (Chang *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1994; Zhang, 1996).

1.5 Autres mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle

1.5.1 Régulation par la structure secondaire de l'ARN messenger

1.5.1.1 La terminaison de la transcription

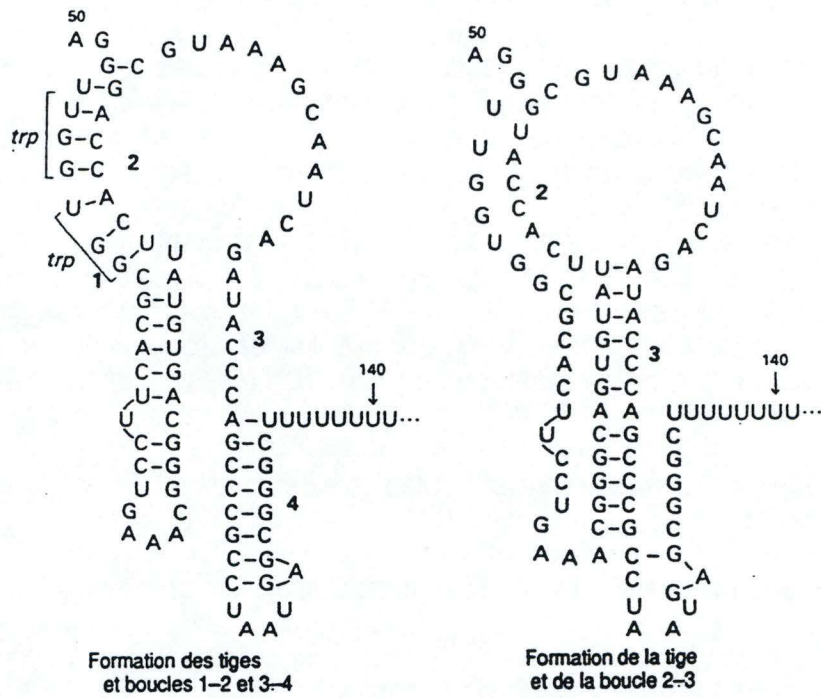
La terminaison et l'antiterminaison sont réalisées grâce à la séparation de l'hétéroduplexe ARN-ADN présent au coeur de la polymérase (Lewin, 1994).

La terminaison peut être soit intrinsèque, c'est-à-dire simplement liée à la structure de l'ADN ou bien réalisée par l'intermédiaire de facteurs protéiques. Dans le premier cas, c'est la formation d'une "hairpin" dans l'ARN qui provoquera la dissociation de l'hétéroduplexe ARN-ADN. Une hairpin est constituée d'une tige dans laquelle deux séquences d'ARN complémentaires souvent riche en G-C sont appariées, cette structure est suivie en général d'une région riche en U dont l'énergie de liaison avec les A de l'ADN est faible. La dissociation de l'hétéroduplexe sera donc facilitée.

La terminaison Rho dépendante a été mise en évidence expérimentalement. La protéine Rho de 46 kDa est active sous forme d'hexamère et a besoin d'ATP. Le facteur Rho agit en reconnaissant un site sur l'ARN situé à environ 50 ou 90 paires de bases du site de terminaison. Le facteur Rho lorsqu'il se trouve sur l'ARN va se déplacer le brin vers le site de terminaison. Lorsque l'ARN-polymérase fait une pause au niveau d'un site terminateur, il la rattrape et grâce à l'énergie contenue dans sa molécule d'ATP, il dissocie les molécules de l'hétéroduplexe (fig.1.9).

1.5.1.2 L'antiterminaison

L'antiterminaison est un phénomène connu surtout chez les bactériophages. Ce mécanisme permet au phage d'exprimer différents ARN messagers en supprimant l'effet de séquences terminatrices. L'étude réalisée sur le phage λ est la plus complète. Lorsque ce phage a intégré son génome dans celui de la cellule hôte, la polymérase de la bactérie transcrit deux gènes viraux,



Tryptophane abondant

Tryptophane rare

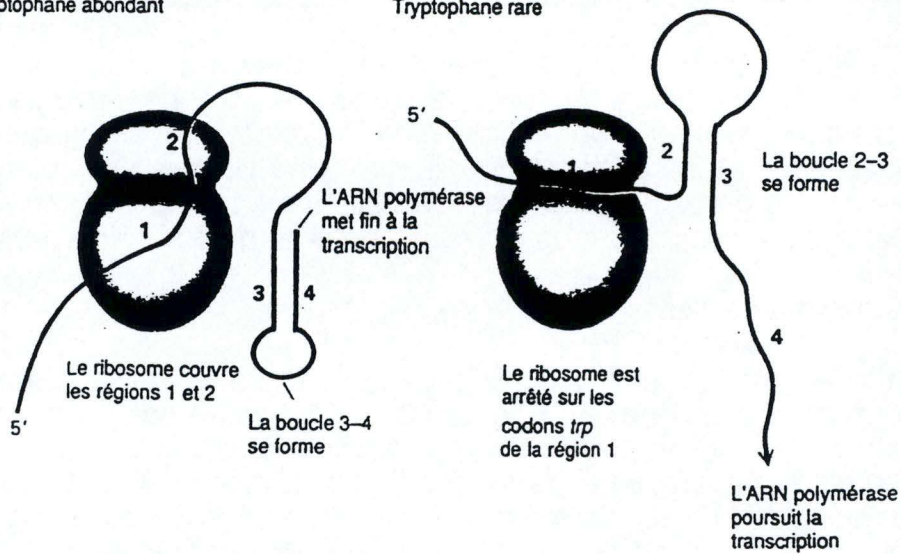


fig 1.10: Séquence des différentes hairpines responsables de la régulation de l'opéron tryptophane.

dits gènes immédiats, dont l'un encode la protéine pN, facteur d'antitermination. Cette protéine aura un rôle physiologique en s'associant avec la polymérase. L'association de pN avec l'ARN-polymérase empêchera la reconnaissance de la séquence de terminaison située après les gènes immédiats. La suppression de la terminaison par pN permet donc l'expression du génome phagien.

1.5.1.3 Phénomènes d'atténuation

L'atténuation est un phénomène de régulation faisant intervenir la traduction. L'exemple le plus connu est celui de la régulation de l'opéron tryptophane (Darnell *et al.*, 1993).

La traduction de cet opéron est sensible à la quantité de tryptophane cellulaire. Quand la concentration de tryptophane cellulaire est élevée, seul le début de l'opéron, appelé "peptide leader", est transcrit. Par contre, quand le tryptophane devient un facteur limitant, 25 à 50% des ARN-polymérases dépassent le site de terminaison du "peptide leader" et l'opéron en entier est transcrit. Le mécanisme moléculaire de cette régulation peut être compris sur base de la séquence du "peptide leader". Deux codons tryptophane sont présents ainsi que quatre séquences pouvant former différentes "hairpins". En présence d'une quantité suffisante de tryptophane, le ribosome qui traduit l'ARN messager en cours de transcription passe rapidement au-dessus des deux codons tryptophane car les ARN de transfert sont disponibles, et seule "l'hairpin" constituée des séquences 3 et 4 a le temps de se former et représente un terminateur de transcription. En présence d'une quantité plus faible de tryptophane, le ribosome marquera une pause au niveau des 2 codons tryptophane, permettant à "l'hairpin" 2-3 de se former. Celle-ci ne présente pas les caractéristiques d'une structure de terminaison (fig.1.10).

Des mécanismes d'atténuation ont aussi été mis en évidence dans les opérons *his* (biosynthèse de l'histidine) et *ilv* (biosynthèse de l'isoleucine, leucine et valine).

1.5.1.4 Synthèse d'ARN antisens.

Ce mécanisme de régulation est, entre autres, présent dans le système à deux composants responsable de l'osmorégulation chez *E. coli*. Ce système module la physiologie de la manière suivante: en réponse à une osmolarité élevée, le senseur membranaire EnvZ phosphoryle le régulateur OmpR. Le taux de phosphorylation de ce régulateur influencera son action en temps qu'activateur de la transcription des gènes des porines OmpC et OmpF. En condition de forte osmolarité, EnvZ va phosphoryler OmpR. Celui-ci, ainsi modifié, agira positivement sur la transcription des gènes *ompC* et *micF* (Mizuno *et al.*, 1984; Delihias, 1995) et négativement sur *ompF*. L'ARN de *micF* a la particularité d'être le brin complémentaire du début de l'ARN messager d'*ompF* (fig.1.11). L'association entre *micF* et l'ARNm de *ompF* rend impossible la traduction car le complexe ainsi formé recouvre le site de liaison du ribosome. Cette nouvelle structure créée par *micF* permet donc de compléter la régulation de l'expression des porines en favorisant l'expression d'OmpC.

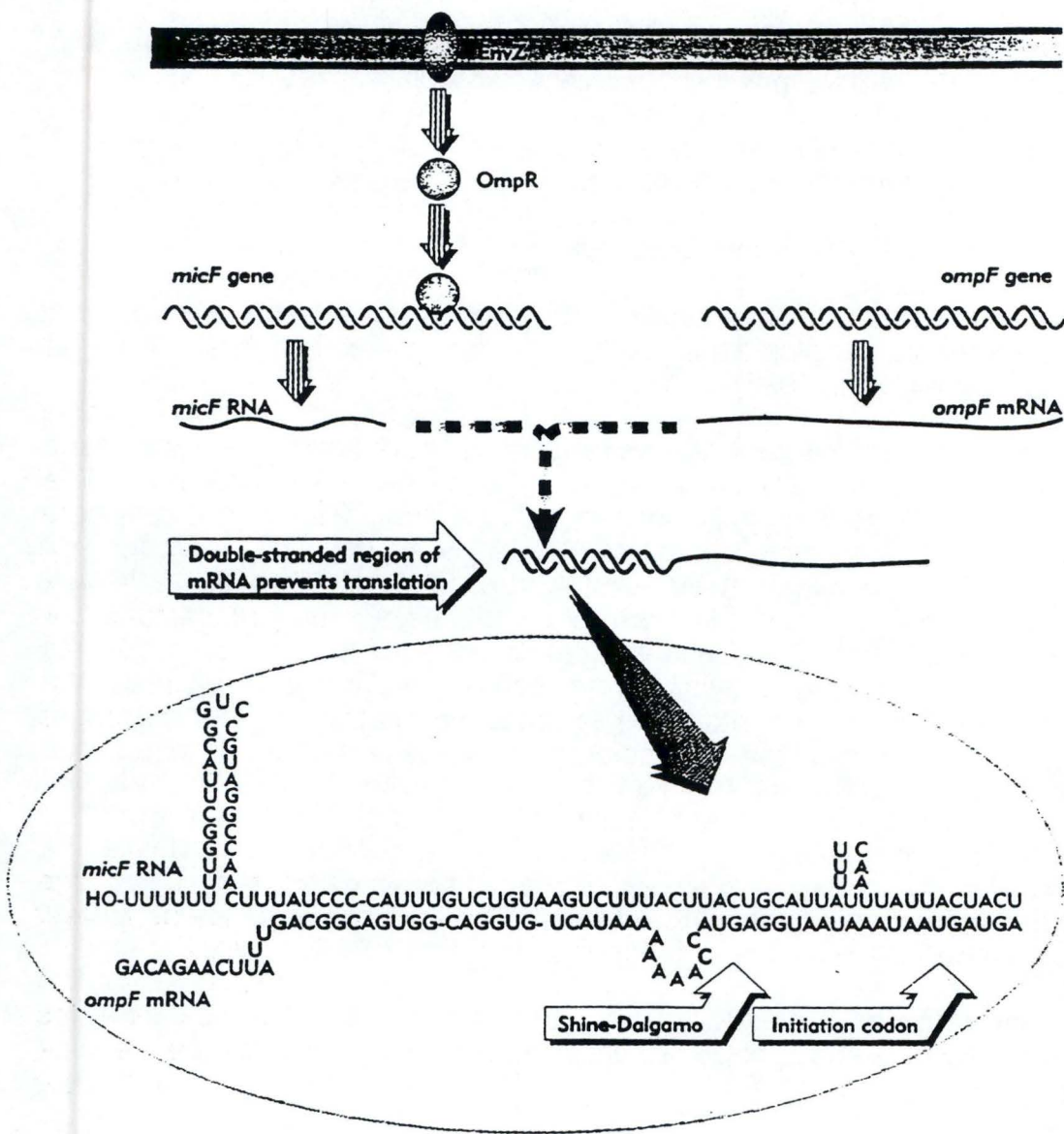


fig.I.11: Synthèse d'ARN antisens dans le cadre de la régulation des opérons par le système OmpR-EnvZ. (Lewin., 1994).

1.5.2 Les protéines H-NS et le superenroulement

Les protéines H-NS (Histones-like Nucleoid Structuring Protein) sont une composante majeure de la chromatine des procaryotes (Higgins, 1992). Elles ont un rôle structural et fonctionnel. D'un point de vue structural, elles permettent à la cellule d'agencer son ADN dans un faible volume en gardant les gènes accessibles. Par exemple, chez *E. coli*, le chromosome mesure 1 millimètre (mm) de long, la cellule mesure 1 mm sur 0,25 mm de diamètre et 20% des gènes doivent être accessibles puisqu'ils sont transcrits ensemble. Dans ce cadre, le rôle de H-NS est fondamental (Ussery *et al.*, 1994; Owen-Hughes *et al.*, 1992).

Les protéines H-NS jouent aussi un rôle fonctionnel. Chez les bactéries dont le gène H-NS a été muté, un phénotype pléiotropique apparaît: la transcription des gènes est perturbée tant au niveau chromosomique que plasmidique. Le rôle fonctionnel des protéines H-NS peut difficilement être dissocié de leur rôle structural. Leur mode d'action peut être soit direct ou bien indirect. Elles peuvent agir directement en encombrant stériquement le site promoteur ou bien indirectement en influençant le superenroulement de l'ADN (Thomas *et al.*, 1992).

Il semble donc que H-NS joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle et dans l'organisation du génome mais son rôle régulateur n'est pas direct.

1.5.3 Les boucles dans le génome

L'hypothèse de l'existence de boucles dans l'ADN a d'abord été posée chez les eucaryotes. En effet, on ne comprenait pas comment un promoteur pouvait être influencé par une séquence régulatrice qui se localisait à plusieurs centaines de paires de bases en amont ou en aval. La seule hypothèse plausible était que l'ADN puisse former des boucles qui permettent le contact entre promoteur et séquences régulatrices. Des séquences activatrices de ce type furent ensuite trouvées chez *E. coli* notamment dans les opérons arabinose, galactose et lactose.

Les boucles furent mises en évidence physiquement par micrographie électronique et ensuite fonctionnellement par l'étude de l'opéron arabinose (Schleif, 1988).

Ce type de régulation présente deux avantages: il permet d'augmenter la spécificité des sites par la coopération de plusieurs séquences spécifiques et d'affiner la régulation en faisant interagir plusieurs protéines.

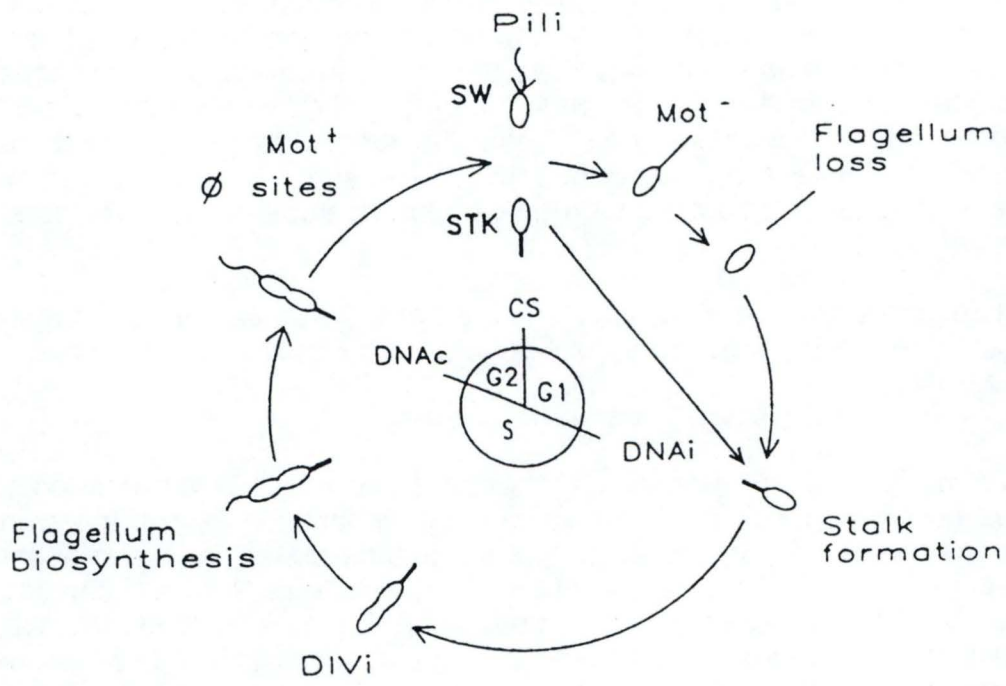


fig.1.12: Cycle cellulaire de *C.crescentus*. (Fla: formation du flagelle, Mot+:acquisition de la mobilité, Mot-:perte de la motilité, Stk: formation du pied)(Newton &.Ohta, 1996)

2. LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ *CAULOBACTER CRESCENTUS*

La découverte d'un gène similaire à CtrA de *C. crescentus* (Quon *et al.*, 1996) chez *Brucella* nous a amené à nous intéresser au système de transduction du signal dans lequel ce gène régulateur est impliqué.

2.1. Le genre *Caulobacter*

Le genre *Caulobacter* regroupe des bactéries gram négative non-pathogènes vivant dans l'eau douce ou salée. La particularité la plus intéressante de ce genre est d'avoir deux formes cellulaires résultant d'un cycle de division asymétrique. A ce titre, *Caulobacter* et plus particulièrement *C. crescentus*, est utilisé comme modèle pour étudier le développement des organismes pluricellulaires supérieurs chez qui la division asymétrique est un processus embryologique fondamental.

De plus, d'un point de vue méthodologique, des outils sont disponibles pour permettre l'étude de *Caulobacter*. Le transfert d'ADN par conjugaison et la mutagenèse par transposition sont des techniques génétiques applicables chez *C. crescentus*. Une carte chromosomique est également disponible.

2.2 Le cycle cellulaire

Les deux formes cellulaires de *Caulobacter* sont morphologiquement très distinctes: l'une est mobile grâce à un flagelle et l'autre est munie d'un pied qui la fixe au substrat (Newton & Ohta, 1990). Ces deux formes permettent à *Caulobacter* de s'adapter à son milieu pauvre en nutriments. La forme flagellée est mobile et chémotactique. Ces deux caractéristiques permettent de considérer quelle est la forme de dispersion du cycle. La forme fixe permet la croissance et la prolifération, celle-ci étant facilitée par la présence du pied qui fixe la cellule dans un milieu riche qui augmente la surface d'absorption (Lane *et al.*, 1995).

La division asymétrique s'opère sur une cellule fixée. Cette division donnera une cellule identique à la cellule mère et une cellule flagellée.

Les grandes étapes de la division cellulaire peuvent être décrites comme ceci: une cellule non-mobile entre en division et forme une cellule prédivisionnelle. Cette cellule formera un flagelle au pôle opposé à celui de son pied. Après cette étape, la cellule prédivisionnelle complétera sa division en se contractant en son centre. Une nouvelle cellule flagellée sera libérée dans le milieu. A ce moment, le flagelle deviendra mobile. Le cycle de cette cellule mobile se terminera par la formation des pili, la perte de sa mobilité, de son flagelle et la synthèse du pied (fig.I.12.).

2.3 Aspects moléculaires du cycle

D'un point de vue moléculaire trois questions doivent être résolues: Comment la cellule établit-elle une polarité dans la cellule prédivisionnelle? Comment contrôle-t-elle la séquence des différents événements du cycle et comment adresse-t-elle les nouveaux produits des gènes au pôle correct ?

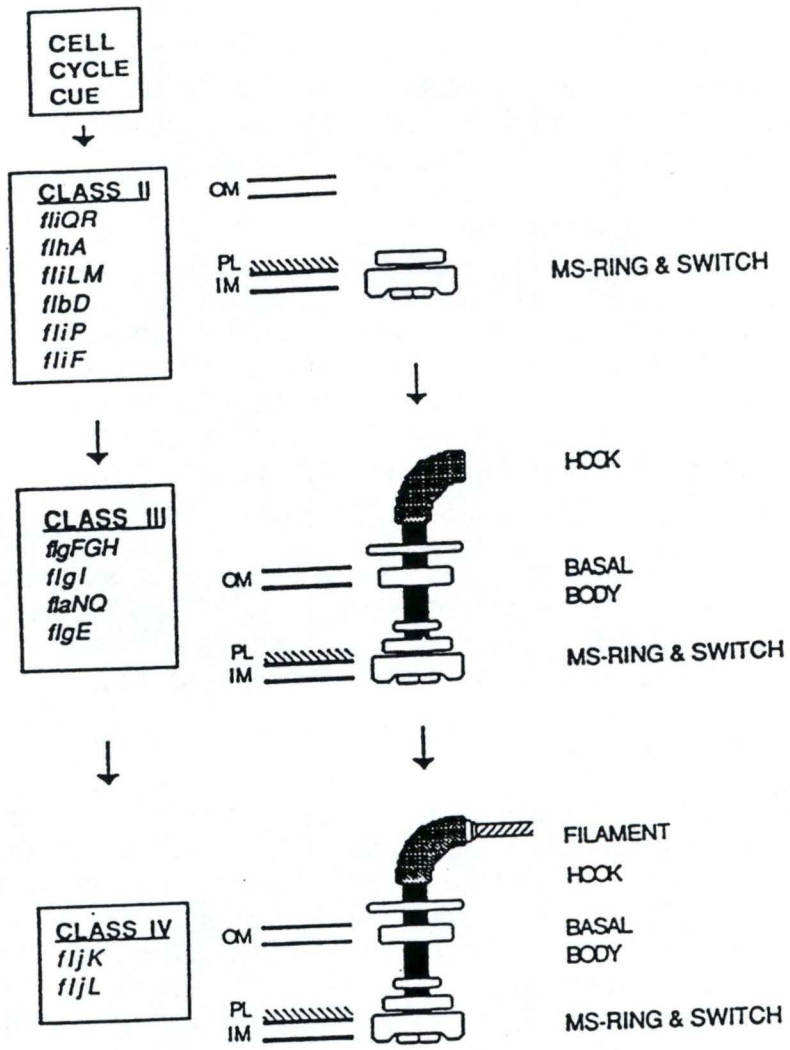


fig.1.13: Biogénese flagellaire et classification des gènes flagellaires. (Gober & Marques, 1995)

2.3.1 Mise en évidence de la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire

L'étude moléculaire la plus précise réalisée chez *Caulobacter* concerne la biogenèse du flagelle. La morphologie du flagelle de *Caulobacter* ressemble à celle de *E. coli* et de *S. typhimurium*. Trois éléments composent le flagelle: le corps basal qui fixe le flagelle dans la membrane, un coude flexible et un filament attaché au coude (Aizawa, 1996). Outre son rôle structural, le corps basal (ou ring) a un rôle fonctionnel: il est le siège de la mobilité (Macnab, 1996). Etant donné son apparition à un moment précis, l'étude de la biogenèse du flagelle s'est révélée pertinente pour comprendre la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire (fig. I.13).

Les gènes encodant le flagelle sont organisés en 4 classes: les gènes de classe II encodent les protéines nécessaires à la formation du corpuscule basal interne. Les gènes de classe III sont responsables de la formation du corpuscule basale externe et du coude. Les gènes de classes IV sont responsables de la synthèse de la flagelline (Gober & Marques, 1995). Cette classification repose sur la hiérarchisation des différents groupes de gènes. Cette hiérarchie permet la régulation de gènes les uns par rapport aux autres: les gènes d'une classe ne s'expriment que si les produits des gènes de la classe précédente sont présents. La hiérarchisation dans le cadre de la biogenèse du flagelle a été prouvée par des expériences de délétion: l'absence d'expression de gènes de classe III a été observée dans des souches délétées pour les gènes de classe II. Ce type d'organisation reflète une adaptation du génome à un événement physiologique: l'ordre d'expression des gènes reflète l'ordre d'assemblage des protéines flagellaires en membrane.

Un élément dans la biogenèse flagellaire restait inconnu jusqu'il y a peu: les gènes de classe I. Cette dénomination est réservée au régulateur situé au sommet de la hiérarchie et qui agirait en réponse à un ou des stimulus cellulaires, tels que la réplication de l'ADN.

L'équipe de L. Shapiro a été la première à isoler un gène qui possède toutes les caractéristiques d'un gène de classe I (Quon *et al.*, 1996). La démarche expérimentale suivie pour cloner ce gène a consisté à isoler des mutants conditionnels thermosensibles qui, à température permissive (28°C), présentent des troubles de la régulation négative d'un gène de classes II (dans ce cas, le gène *fliQ*) et qui sont non-viables à 37°C. Un mutant présentant ce phénotype a été découvert et le gène muté a été cloné: ce gène a été nommé *ctrA* (pour Cell transcription regulator).

Différentes expériences ont été réalisées pour caractériser le gène *ctrA* et pour étudier son action. La première expérience montra qu'il n'y avait pas d'autre mutation et que seule la mutation dans *ctrA* conférait ce phénotype. L'analyse de la séquence protéique déduite de la séquence codante a montré que la protéine CtrA est similaire à un régulateur du système à deux composants. Au niveau protéique, CtrA présente respectivement 33% et 24% d'identité avec le domaine N-terminal et le domaine de liaison à l'ADN d'OmpR. Des expériences de phosphorylation *in vivo* ont montré que CtrA peut comme OmpR s'autophosphoryler à partir de petites molécules donneuses de groupes phosphates. Sur base d'alignements de séquence, l'aspartate 51 est très

A

```

          ***      ****      *
flhQ    ccctaacgcccctgttaaccatatttctgt-ccatctctcgagcc
flhD    gcaaaacacatcgttaaccatgcttctgc-gcatgagtacgggtg
ccrM    ggttaacggcccgctaaccacgtctctcaacaccggatttag
hemE PS tcttaatttcttattataatatatgttagaaagatcttag
consensus ttaa -N7- ttaac
          -40      -30      -20      -10      +1
  
```

fig.I.14: Analyse des séquences promotrices des gènes susceptibles d'être reconnus par CtrA. (Quon *et al*, 1996)

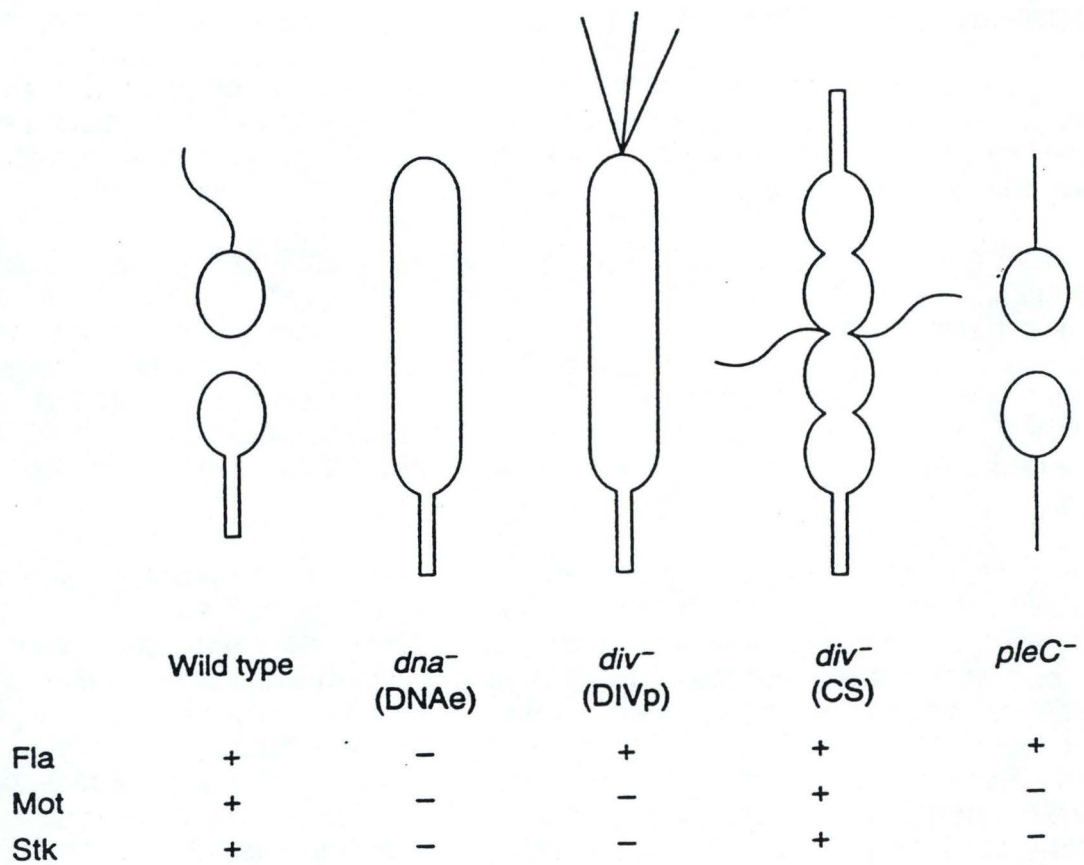


fig.I.15: Différents phénotypes des mutants étudiés (Newton & Ohta, 1996).

probablement le site de phosphorylation. Une mutagenèse sur l'aspartate 51 (modifié en glutamate) a démontré qu'il était essentiel à la fonction de la protéine.

Une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de CtrA et le gène rapporteur *LacZ* a permis de montrer que l'expression de CtrA est régulée au cours du cycle cellulaire. Son expression est parallèle à celle des gènes de classes II.

Après avoir caractérisé CtrA, son rôle au niveau de la régulation transcriptionnelle a été étudié. Des comparaisons de séquences des promoteurs de gènes flagellaires de classe II mais aussi de gènes impliqués dans la division cellulaire (le gène de l'ADN méthyltransférase *ccrm* (Stephens *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1996) et le promoteur fort du gène *hemE*) ont montré la présence d'une séquence consensus (fig.I.14). L'analyse de fusions transcriptionnelles entre ces promoteurs et un gène rapporteur placées dans des souches de *Caulobacter* mutants conditionnels a démontré que CtrA régulait l'expression de ces gènes en se liant à une séquence consensus.

Sur base de ces résultats le groupe de L. Shapiro propose que CtrA soit un élément clef de la régulation du cycle cellulaire qui contrôle de nombreux événements cellulaires tels que la méthylation de l'ADN via CcrM, sa réplication via hemEPs et la biogenèse du flagelle. La découverte de CtrA est une étape importante dans la compréhension du système, mais ce régulateur doit être intégré dans un schéma de transduction, les recherches se concentrent donc maintenant sur les stimuli qui doivent l'affecter. Des hypothèses sont avancées par L. Shapiro pour répondre à cette question. CtrA étant un régulateur de multiples événements indépendants intervenant à différents moments du cycle, il devrait être influencé par de multiples signaux. Plusieurs signaux sont suspectés. Par exemple, l'inhibition de la réplication de l'ADN, ou l'irradiation par des U.V. influencent la transcription de promoteurs régulés par CtrA et donc peut être CtrA lui-même. L'assemblage du flagelle semble aussi influencer son expression.

2.3.2 Mise en évidence d'autres éléments du système à deux composants impliqués dans la division cellulaire.

L'équipe de A. Newton a mis en évidence d'autres composants de la régulation du cycle cellulaire. Pour réaliser leurs études, des mutants thermosensibles ont été utilisés. Leurs recherches se sont centrées sur les clones présentant des phénotypes anormaux au niveau de la réplication de l'ADN ou la division cellulaire (Ohta & Newton, 1996).

Cinq mutants ont particulièrement attirés leur attention (fig.I.15):

- 1) les mutants nommés *ADN-* qui présentent une réplication incomplète de l'ADN,
- 2) les mutants *DIVp* bloqués dans la progression de la division,
- 3) les mutants *CS* présentant un défaut dans la séparation cellulaire,
- 4) les mutants *pleC* bloqués dans les étapes du développement qui suivent la biogenèse du flagelle mais qui se divisent normalement.

Une première conclusion a été tirée de l'observation de ces mutants: il existe des étapes critiques dans la division cellulaire: 1°) la synthèse de l'ADN est nécessaire pour que la biogenèse du flagelle se réalise, 2°) l'achèvement de la division est indispensable pour la mobilité et la formation du pied et 3°) la séparation cellulaire est nécessaire à la formation des pili.

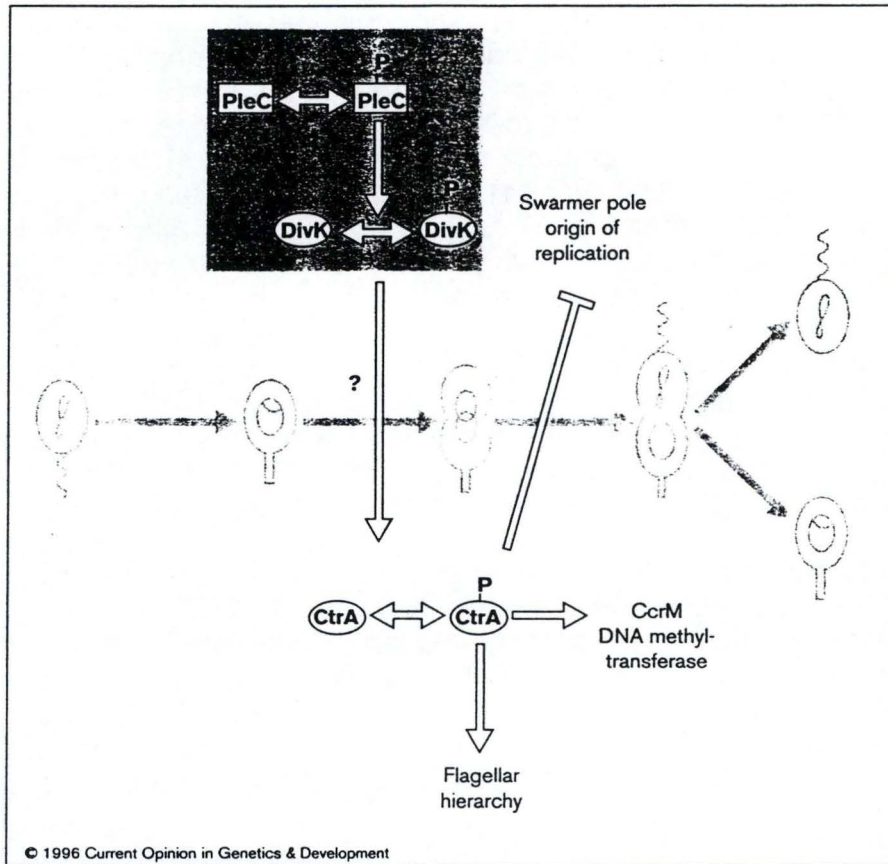


fig.I.16: Schéma de transduction hypothétique (Newton & Ohta, 1996).

L'observation des mutants *PleC*- et *DivP* a été la plus informative. Ces deux mutants sont bloqués à la même étape du développement, après l'assemblage du flagelle, avant d'avoir acquis la mobilité et avant la formation du pied. Les gènes mutés chez ces clones ont été identifiés grâce à des expériences de suppression du phénotype muté. Il s'agissait des gènes *divK*, *divJ* et *divL* (Ohta *et al.*, 1992). Une dernière protéine doit être décrite si l'on veut donner un aperçu global du système: la protéine *PleD*. Cette protéine qui s'apparente aux régulateurs a été découverte car elle supprimait le défaut de mobilité du mutant *PleC*. Une mutation dans *PleD* n'influence pas la division cellulaire mais engendre un défaut dans les événements du développement avant la perte de la mobilité. Les mutants *PleD* restent donc mobiles et sans pied tout au long du cycle cellulaire.

L'analyse des séquences de ces différents gènes révèle que *PleC* et *DivJ* s'apparentent aux histidines kinases (Wang *et al.*, 1993) tandis que *DivK* et *PleD* s'apparentent aux régulateurs. Un schéma de transduction du signal peut être proposé chez *C. crescentus*. *DivK* et *PleC* constituent un système à deux composants intervenant dans le gain de mobilité et la formation du pied. Une évidence expérimentale permet cette affirmation: une mutation dans *DivK* supprime le phénotype non-mobile du mutant *PleC*. Le fait qu'une mutation dans une protéine annule l'effet d'une mutation dans une autre suggère leur interaction. Le stimulus activant *PleC* semble être la progression de la division puisque cette étape qui doit être franchie pour que la cellule continue son cycle. Néanmoins, on n'explique toujours pas comment un événement morphologique activerait *PleC* localisé en membrane.

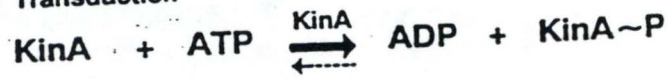
Le régulateur *DivK* intervient aussi à un autre moment du cycle cellulaire. En effet, des mutants *DivK* sont déficients pour l'initiation de la division. Si *DivK* intervient dans ce phénotype, elle est activée par une autre kinase que *PleC*, car il n'est pas requis pour la division cellulaire. Plusieurs expériences suggèrent qu'il s'agit de *DivJ*. Le stimulus de cette seconde kinase pourrait être une autre étape critique de la division. Cette seconde partie du schéma de transduction reste plus hypothétique car aucune mutation permettant de contourner la mutation de *DivJ* n'a encore été isolée. La cible du système *DivK*-*DivJ* n'a pas encore été identifiée mais il pourrait s'agir de *CtrA*, une hypothèse soulevée de plus en plus souvent (Ohta & Newton, 1996; Domian *et al.*, 1996) (fig.1.16).

2.3.3 Localisation des protéines dans la cellule prédivisionnelle.

Les schémas de transduction étudiés dans les points précédents permettent de comprendre en partie comment une cellule génère deux cellules différentes. Mais ils ne permettent pas d'expliquer comment l'expression des gènes flagellaires et des récepteurs chémo-tactiques est localisée dans le pôle de la cellule qui deviendra la forme mobile.

Des expériences d'inhibition de la transcription (avec de la rifampicine) sur des cellules synchrones ont montré que l'expression des gènes flagellaires s'opère bien dans la cellule prédivisionnelle: le ciblage des produits des gènes flagellaires n'est donc pas dû à l'expression de ces gènes dans la nouvelle cellule mobile.

Signal Transduction



Phosphotransfer



Phosphotransfer



Phosphotransfer



fig.1.17: Différents étapes du phosphotransfert chez *B. subtilis*. (Burbulys et al, 1991)

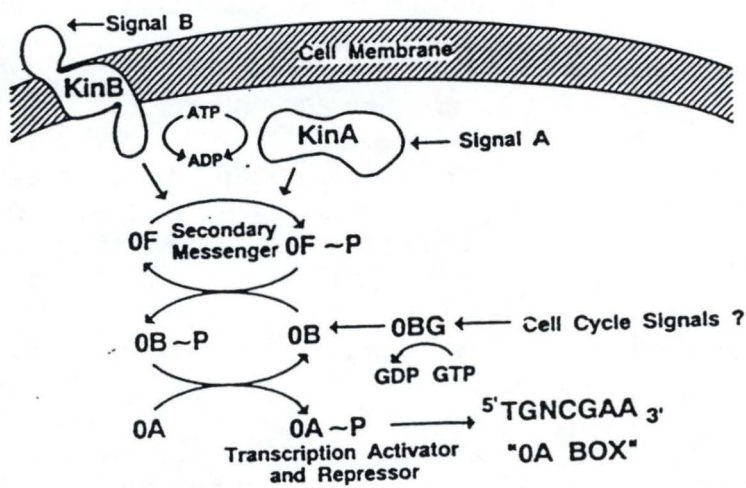


fig 1.18: Représentation de la transduction du signal.(Burbulys et al, 1991)

Trois mécanismes sont envisageables pour expliquer cette expression des gènes du flagelle dans la cellule prédivisionnelle: 1°) les ARNm seraient synthétisés dans les deux pôles de la cellule et positionnés ensuite dans le pôle flagellé, ou 2°) ils seraient sélectivement dégradés dans le pôle fixe de la cellule ou encore 3°) les gènes sont préférentiellement transcrits dans le pôle flagellé.

Des expériences de fusion transcriptionnelle avec le promoteur *fliQ* ont permis de montrer que le mécanisme de distribution asymétrique des produits des gènes était dû à une activation préférentielle de ce promoteur dans le futur pôle "flagellé".

Des comparaisons entre les séquences promotrices des gènes flagellaires de classe III et IV ont montré que le facteur σ_{54} était nécessaire à leur transcription. Un facteur de transcription nommé FldB, en interaction avec la polymérase contenant σ_{54} , joue un rôle important dans la compartimentation de l'expression génique. Cet élément présente dans sa séquence toutes les caractéristiques d'un régulateur. Il est apparenté à la famille NtrC. Au cours du cycle cellulaire, cette protéine est phosphorylée préférentiellement dans le compartiment qui donnera la cellule flagellée. De récentes expériences ont permis d'identifier la kinase, nommée FldE qui phosphoryle FldB, mais le stimulus auquel elle répond reste inconnu (Wingrove *et al.*, 1996).

Au vu de ces résultats, il semble donc que la régulation du cycle cellulaire chez *C. crescentus* est réalisée grâce à une variante complexe du système de transduction à deux composants. Le schéma simplifié un senseur/un régulateur présenté au point 1.4 ne peut être appliqué pour la division chez *C. crescentus*. Le système de *Caulobacter* doit plutôt être assimilé à un phosphorelais. Le phosphorelais le mieux étudié est le système de la sporulation chez *Bacillus subtilis* (Burbulys *et al.*, 1991). La sporulation est aussi une division asymétrique. Une différence importante entre les cycles de *C. crescentus* et *B. subtilis* est que la sporulation est enclenchée quand les conditions du milieu sont défavorables. Il ne s'agit donc pas d'une étape toujours présente dans le cycle cellulaire. Comme chez *Caulobacter*, de nombreuses protéines régulatrices sont présentes pour assurer l'initiation de la sporulation. Les principaux acteurs de cette régulation sont deux kinases (KinA et KinB), des phosphotransférases (SpoOF et SpoB) et le régulateur SpoA. SpoA, une fois phosphorylé, réprime l'expression de AbrB, une protéine qui réprime l'expression des gènes de sporulation. L'ensemble de ces protéines s'organise en un phosphorelais (fig.1.17).

La raison de la complexification du système à deux composants réside peut être dans l'ampleur du processus physiologique à réguler. La mise en oeuvre de phénomènes cellulaires engendrant de grands changements physiologiques ne peut être enclenchée par un seul stimulus. Chez *Bacillus*, la sporulation est enclenchée lorsque des stimuli internes et externes ont été introduits dans le système de transduction par KinA et KinB, les deux senseurs (fig.1.18). De même, chez *Caulobacter*, la présence de plusieurs senseurs et régulateurs permet à la cellule d'adapter la transcription des gènes à l'étape du cycle cellulaire. Une différence au niveau des stimuli se remarque entre *C. crescentus* et *B. subtilis*. *B. subtilis* intègre des signaux externes de manière directe avec la protéine KinB tandis que *C. crescentus* ne semble pas intégrer de signaux externes de manière directe, les différents stimulus semblent plutôt provenir d'un état physiologique cellulaire interne.

3. LE GENRE *BRUCELLA*

En 1887, le médecin militaire anglais Bruce isole du corps de quatre soldats l'agent infectieux de la fièvre de Malte. Bruce appelle la bactérie qu'il a découverte *Micrococcus melitensis*. Suite à des travaux ultérieurs, elle sera nommée *Brucella melitensis*. La découverte d'autres agents infectieux et les liens que l'on retrouve entre eux permettent de créer le genre *Brucella* qui contient aujourd'hui 6 espèces: *Brucella melitensis* (1893), *Brucella abortus* (1901), *Brucella suis* (1929), *Brucella neotomae* (1956) et *Brucella canis* (1968). Cette classification repose sur leur spécificité d'hôte; en laboratoire elle est précisée par le typage sérologique et par le profil de sensibilité aux phages. En plus de cette classification en espèces, de nombreux biovars (ou biotype) (Alton *et al.*, 1988) sont aussi définis à partir de données épidémiologiques.

Néanmoins, cette classification est sujette à controverse car certains scientifiques estiment qu'il y a trop peu de différences génomiques entre les espèces actuelles pour garder la classification décrite ci-dessus (Allardet-Servent *et al.*, 1988; Verger *et al.*, 1985; De Ley *et al.*, 1987). Ils proposent de reconnaître une seule espèce: *Brucella melitensis* qui comprendrait plusieurs biovars. Remarquons d'autre part que des résultats expérimentaux semblent indiquer la présence de deux chromosomes indépendants chez *Brucella* (Michaux *et al.*, 1993). Signalons que la situation s'est encore compliquée par la mise en évidence de la présence de *Brucella* chez les mammifères marins (Ewalt, 1994).

Phylogénétiquement le genre *Brucella* est apparenté à la subdivision α_2 de la classe des Protéobactériacées (Moreno *et al.*, 1990). Dans cette subdivision on retrouve aussi *C. crescentus*.

Brucella est un coccobacille gram négatif, d'une taille de 0,5 à 0,7 mm de long sur 0,6 à 1,5 mm. Elle ne possède pas de capsule. Elle ne génère pas de spores. Elle est non-mobile. Les espèces sont naturellement "smooth" (lisses, elles possèdent une chaîne O sur le LPS) sauf *B. canis* et *B. ovis* qui sont "rough" (rugueuses, car absence de chaîne O).

Brucella est une bactérie chimioorganotrophe à aérobie stricte qui a une croissance optimale à 37°C. Sa culture ne peut s'effectuer sur des milieux minimums, certains composés doivent obligatoirement lui être fournis. *Brucella* est une bactérie pathogène facultative.

Brucella s'introduit dans l'organisme par une lésion d'une muqueuse, orale ou conjonctive par exemple. Après son entrée dans l'organisme elle se multipliera dans les cellules phagocytaires. Celles-ci vont transporter les bactéries jusqu'aux nodules lymphatiques. Là, certaines de ces cellules seront lysées et libéreront un grand nombre d'agents pathogènes (Smith & Ficht, 1990).

Chez les ongulés, *Brucella* présente un tropisme pour le placenta et provoque l'avortement. Chez les caprins et ovins mâles, l'infection brucellique occasionne des épидидymites et orchites qui rendent les animaux stériles. Chez l'homme, la brucellose cause des fièvre récurrentes, des troubles neurologiques, cardiaques et parfois de l'arthrite. Les traitements chez l'homme sont à base de tétracycline et de streptomycine. La transmission à l'homme s'effectue en général par l'ingestion de lait contaminé ou par contact direct avec des animaux infectés (Verger, 1993).

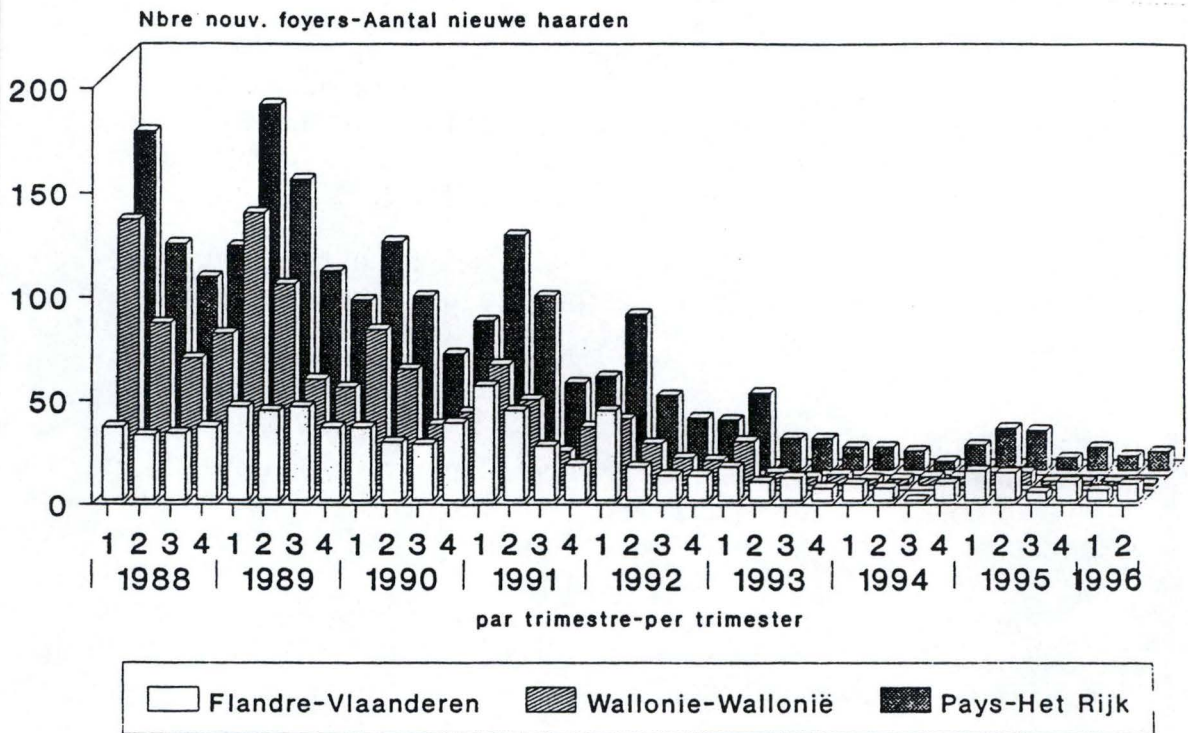


fig.I.19: Données épidémiologiques de la brucellose bovine en Belgique (Ministère de l'Agriculture).

La brucellose est considérée comme une zoonose majeure de répartition mondiale. Sur 149 pays recensés en 1993, 94 déclarent la présence de brucellose bovine sur leur territoire. Son impact économique et sanitaire a justifié des programmes d'éradication basés sur le diagnostic et l'abattage. Ces programmes ont permis quasiment l'éradication de la brucellose bovine en Belgique (fig.1.19), dans la plupart des pays du nord de l'Europe, aux USA et au Canada. La brucellose humaine dans cette partie du monde est généralement contractée par des personnes ayant une profession à risque ou bien par une contamination lors de voyages. La situation au sud de l'Europe est moins bonne, à titre d'exemple 7,25 cas sur 100000 habitants sont déclarés en Espagne en 1993 contre 0,2/100000 en France (Garin-Bastudji, 1995). Dans les pays en voie de développement, la brucellose humaine est en progression (Meslin, 1993).

BUT DU TRAVAIL

Actuellement la régulation transcriptionnelle est un phénomène relativement peu connu chez *Brucella* alors que chez d'autres pathogènes, des systèmes complexes de régulation des gènes de virulence ont été mis en évidence (Dzeijman & Mekalanos, 1995). Ce travail a pour objectif d'aborder cette régulation à travers le système à deux composantes.

Le clonage d'un régulateur de ces systèmes est donc la première étape du travail. Pour cloner un gène encodant un régulateur, nous criblerons des banques génomiques de *Brucella*. Nous utiliserons comme sonde une amplification PCR réalisée avec des amorces dégénérées définies sur les séquences de régulateurs du système à deux composants.

Après avoir cloné le gène en entier, nous caractériserons ce gène par diverses expériences: séquençage et analyse de la séquence, mise en évidence du gène dans différentes espèces de *Brucella* par southern blotting et détection des produits d'expression par Western blotting. L'obtention d'un mutant de délétion par remplacement permettra d'appréhender sa fonction physiologique.

MATERIEL ET METHODES

XL1 blue

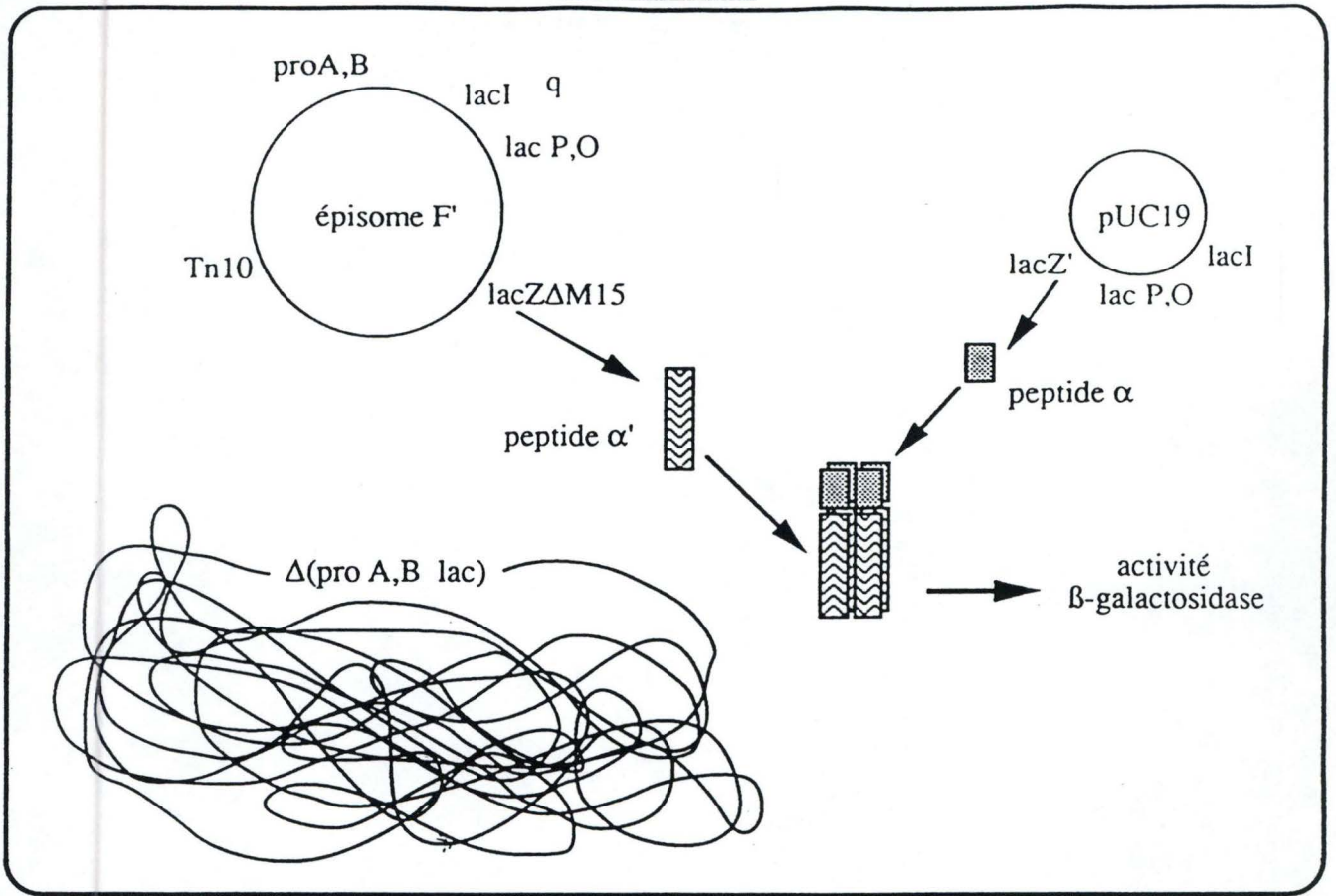


fig.II.1: Système de complémentation intragénique permettant le test bleu-blanc dans la souche XL1 Blue avec un plasmide pUC19

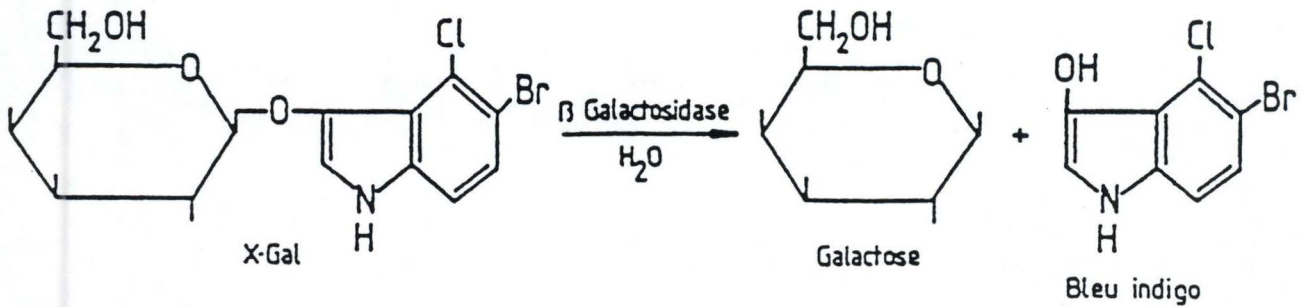


fig.II.2: Dégradation du X-gal, un analogue du lactose, en conditions inductrices IPTG.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes et plasmides

1.1 Souches bactériennes

1.1.1 *E. coli* XL1-blue

Quelques particularités intéressantes de son génotype.

recA1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

endA1: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

La souche XL1-blue(fig.II.1)délétée au niveau de l'opéron lactose (Δ lac), est incapable de métaboliser le lactose. L'épisome F' codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivant:

Tn10: contient un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^R) permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F'.

proAB: signifie que la souche a besoin de proline dans son milieu de culture.

LacI^q est une mutation renforçant la production du represseur de l'operon lactose.

Lac Δ M15 est synonyme d'une délétion du gène de la β -galactosidase dans sa partie N-terminale, produisant une protéine inactive.

Le test blanc-bleu

Les éléments génétiques portés par la souche ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacI(fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène lacZ(partie N-terminale de la β -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur l'X-gal substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé (fig.II.2) .Le test blanc met en évidence les bactéries présentant un plasmide contenant un insert car celui-ci est disruptive le gène lacZ' et la β -galactosidase n'est plus fonctionnelle. La colonie bactérienne apparaîtra donc blanche.

1.1.2 *E. coli* S17/1

La souche d'*E. coli* S17 λ pir est résistante à la streptomycine (Sm^R), à la spectinomycine (Sp^R) et au timéthoprim (Tp^R). Cette souche d'*E. coli* possède notamment les caractéristiques intéressantes suivantes,

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

1.1.3 *Brucella* sp.

Au niveau de la chaîne O du LPS de *Brucella* sp., des antigènes distincts sont présents à la surface des espèces *B. abortus* et *B. melitensis*. L'antigène de surface A est prédominant chez la souche *B. abortus* tandis que c'est l'antigène M qui est prédominant chez l'espèce *B. melitensis*.

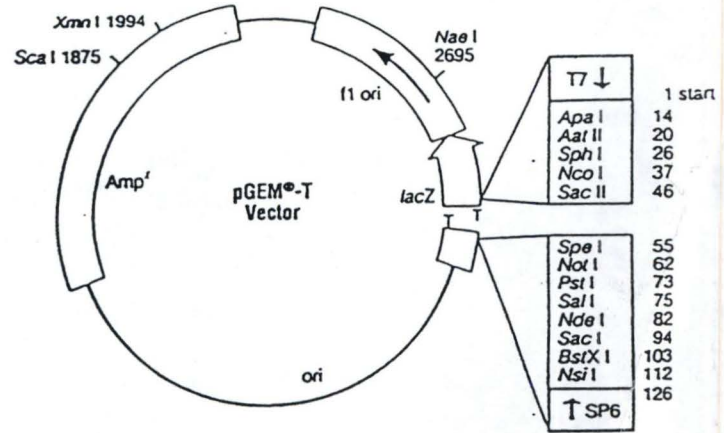
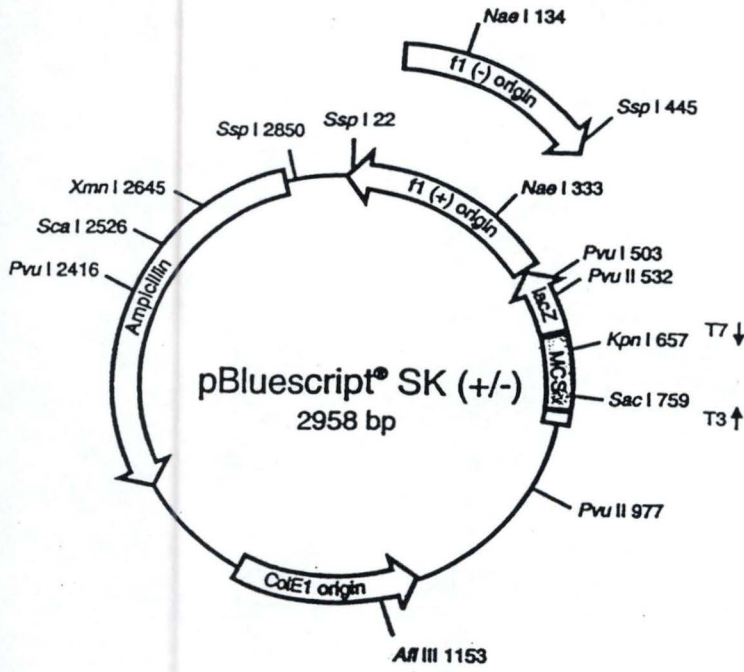


fig.II.5: Carte plasmidique du pGEM-T.

fig.II.3: Carte plasmidique du pBluescript(Stratagène)

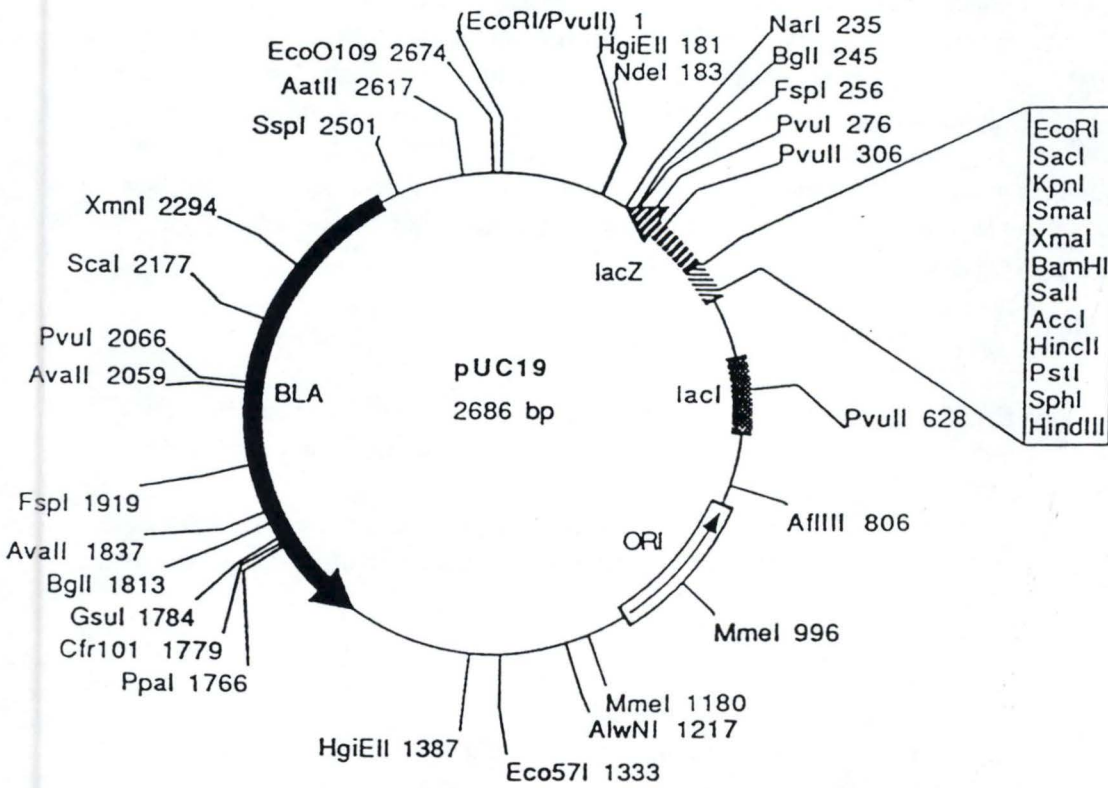


fig.II.4: Carte plasmidique du pUC19.

B. melitensis biovar 1 souche 16M est une souche de phénotype "S", l'agglutination se produit avec un sérum anti-M. La souche utilisée est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal^R).

Les autres souches utilisées sont:

B. abortus biovar 1 souche 544, souche S, l'agglutination se produit avec un sérum anti-A.

B. suis biovar 1330

B. ovis biovar Reo198

1.1.4 Identification de *Brucella sp.* par agglutination

Toutes les souches de *Brucella sp.* ayant une majorité d'antigènes de surface A sont agglutinées avec un sérum anti-A. Les souches de *Brucella sp.* où l'antigène M domine ne sont pas agglutinées par le sérum anti-A.

Méthode

- Une goutte de chaque sérum adéquatement diluée dans du NaCl 0,9% est placée sur une lame porte-objet.

- Amener avec une pipette boutonnée les *Brucella sp.* à tester, déposer les bactéries à proximité de la goutte de sérum.

- Homogénéiser doucement afin de ne pas surcharger le sérum en bactéries.

- Placer la lame dans une boîte de Pétri et après 20 secondes, examiner au binoculaire pour visualiser l'agglutination.

1.1.5 *Caulobacter crescentus*

La souche de *C. Crescentus* utilisée est la souche 19089 (N° ATCC). Elle ne reporte aucun marqueur de résistance à un antibiotique. La température optimale de croissance de *C. crescentus* est de 30°C.

1.2 Plasmides bactériens

pBluescript

pBluescript (Stratagène) (figure II.3) est un phagémide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2,964 kb. Il porte une origine de répllication pour *E. coli* mais qui n'est pas reconnue dans *Brucella*(colE1 ORI) et l'origine de répllication phagienne f1. Il porte aussi le gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline, afin de sélectionner des clones recombinants. C'est ce vecteur qui permet la complémentation intragénique de la souche de *E. coli* X11-blue. Ce gène possède une série de sites de restriction uniques (MCS) à l'extrémité N-terminale du gène LacZ'. Ces sites n'altèrent pas la complémentation mais si un fragment est cloné dans l'un d'entre eux, le gène LacZ' est disrupté et la complémentation est alors impossible.

pUC4K

Ce plasmide de 3914 pb (figure II.4) porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (Kan^R). Le gène Kan^R est bordé de part et d'autre par 4 sites de restriction.

pGEM-t (figure II.5)

Ce plasmide commercialisé par Promega est spécialement conçu pour le clonage de fragments PCR, il est linéarisé au niveau du MCS et porte une base T protrudante ce qui permet de liquer avec une grande efficacité un fragment PCR. En effet, plusieurs DNA polymérase thermostable dont la dynazyme ajoutent une base A aux extrémités 3' des fragments PCR. Ces

Tableau II. 1.

| Nom | Abbréviation / Solution de dissolution | Concentration finale |
|---|--|---|
| Acide nalidixique Kanamycine Ampicilline Streptomycine Tétracycline Chloramphénicol Isopropyl-b-D-thiogalactoside 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-b-D-galactopyrononide | Nal / NaOH 0,2 N Km / H ₂ O Amp / H ₂ O Sm / H ₂ O Tet / EtOH Cm / EtOH IPTG / H ₂ O Xgal / DMF | 25 microg/ml 25 microg/ml 100 microg/ml 10 microg/ml 12,5 microg/ml 20 microg/ml 0,1 mM 0,004% |

fragments sont donc compatibles avec les extrémités du vecteur p-GEMT. De plus, ce dernier ne peut pas de se liguer sur lui-même. Le site de clonage se trouve dans le gène codant pour l' α -peptide la β -galactosidase ce qui permet de détecter les plasmide recombinant avec le test blanc-bleu. Le plasmide pGEM-t porte le gène *b/a* encodant la résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection.

2. Milieux de culture

Milieu Luria Bertani (LB)

- Hydrolysate de caséine (peptone) 1 g/100 ml.
- NaCl 0,5 g/100 ml.
- Yeast extract 0,5 g/100 ml.

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

Milieu LB solide

De même composition que le LB liquienvironde, ce milieu contient 2% d'Agar. Le milieu autoclavé est refroidi à 55°C, il est additionné d'antibiotiques ou autres additifs mentionnés et coulé dans des boîtes de Pétri.

Solutions stock,

décrites dans le tableau II.1.

Milieu TSAYE

- Tryptic soy agar 4 g/100ml.
- Yeast extract 0.1 g/100 ml.

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

Pour les brucella on utilise aussi du milieu 2yt qui correspond au milieu LB additionné de 0.5gr de Yeast extract/100ml. Le milieu autoclavé est refroidi à 55°C, il est additionné d'antibiotiques ou autres additifs mentionnés et coulé dans des boîtes de Pétri ou coulé en pente dans des tubes en verre avec un bouchon d'ouate.'

Milieu pour *C. crescentus*

- Hydrolysate de caséine (peptone) 2 g
 - Yeast extract 1g
 - MgSo₄.7H₂O 0.2g
 - Agar 10g
 - Amener à un litre avec de l'eau minérale
- Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C).

3. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries gram-négatives est un transfert de matériel génétique où la bactérie donneuse transfère un plasmide mobilisable vers la bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries impliquant des pili. La souche donneuse *E. coli* S17 possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines Tra nécessaires au transfert conjugal. Le transfert conjugal commence à l'Orité (origine de transfert) reconnue par la machinerie de transfert sur le plasmide mobilisable.

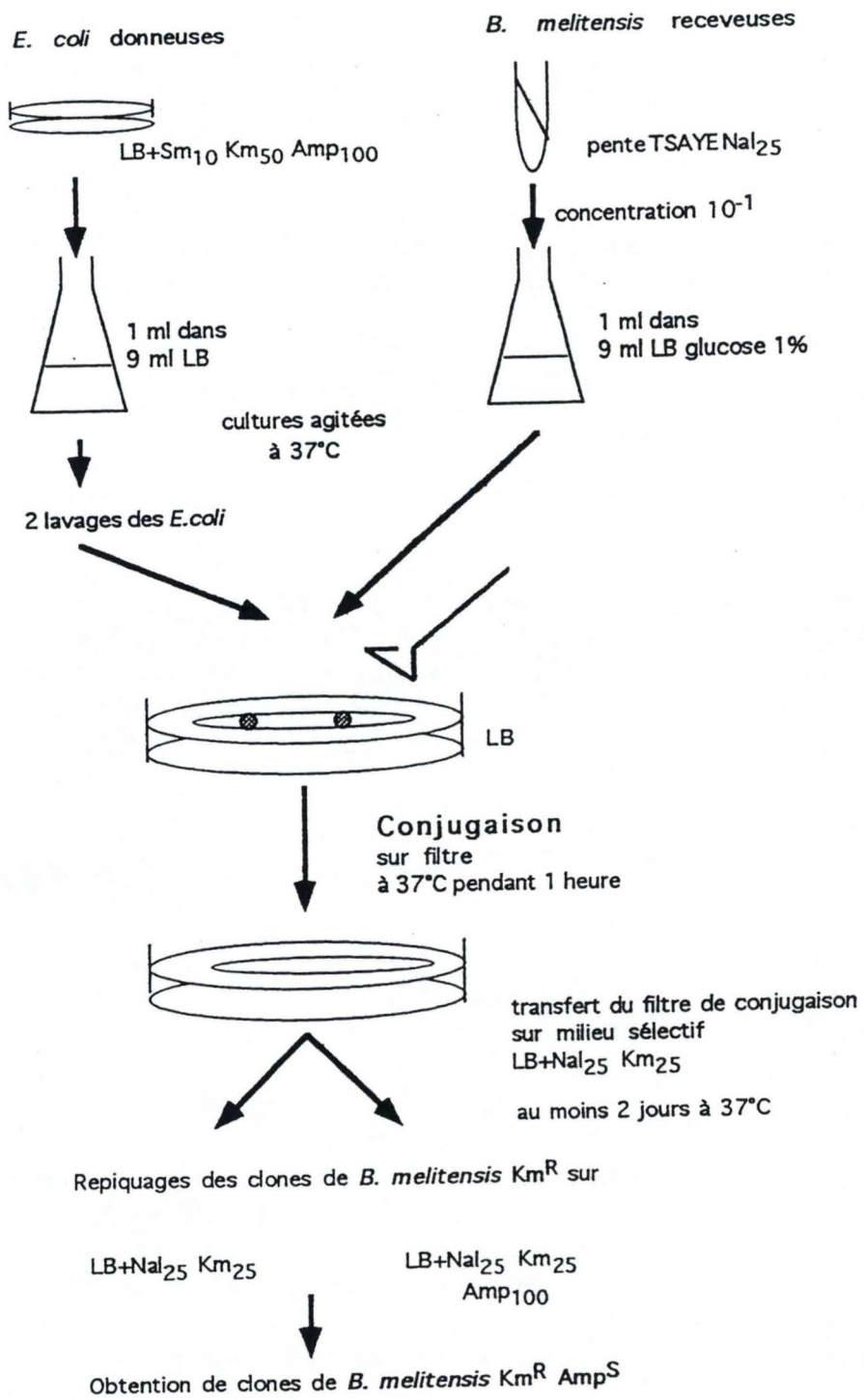


fig.II.6: étapes expérimentales de la conjugaison bactérienne

- Les souches bactériennes utilisées sont:

- *E. coli* S17 : Sm^R, Sp^R, Tp^R
- *Brucella melitensis* 16M NaI^R

L'acide nalidixique est utilisé(25ng:ml) après la conjugaison pour sélectionner les *B. melitensis* et éliminer les *E. coli* donneuses qui sont sensibles à ce composé.

Les témoins:

- Sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique, les bactéries *E. coli* S17 étalées ne montrent pas de croissance alors que les bactéries *B. melitensis* doivent se multiplier sur ce milieu.

- Sur milieu sélectif contenant de la kanamycine les *B. melitensis* receveuses ne doivent pas croître contrairement aux bactéries *E. coli* S17.

Méthode (figure II.6)

- Au jour J-2 préparer une culture d'*E. coli* S17 donneuses (contenant le plasmide mobilisable Amp^R Kan^R sur boîtes LB Sm₁₀ Amp₁₀₀ Km₅₀ et une culture fraîche de *B. melitensis* 16M. receveuses (NaI^R) sur pente TSAYE NaI₂₅.

- Au jour J-0 déposer 3 ml de NaCl 0,9% sur la pente de *B. melitensis*, râcler, transférer dans un tube contenant 7 ml de NaCl 0,9%, homogénéiser.

- Prélever 1 ml et le transférer dans 9 ml de NaCl 0,9% (dilution 1/10).

- Dans un erlen de 100 ml ensemencer 9 ml de LB-glucose 1% avec 1 ml de dilution 1/10 de *B. melitensis* (dilution 1/100).

- Ensemencer 10 ml de LB avec une colonie de la souche *E. coli* donneuse.

- Incuber les cultures de *B. melitensis* et d'*E. coli* environ 12 heures à 37°C sous agitation.

- Au jour J-1 dès le matin, ensemencer une 10ml LB +Sm₁₀ Amp₁₀₀ Km₅₀ avec une colonie S17 donneuse.

- Laver les bactéries *E. coli* S17 et *B. melitensis* dans du milieu LB pour éliminer les antibiotiques du milieu de culture:

- Centrifuger les 100 ml de culture pendant 15 minutes à 3000 tours/min

- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 100 ml de LB (sans antibiotique). Resuspendre les S17 dans 1ml de LB et les *Brucella* dans 10ml de LB.

- Placer un filtre stérile 0,22 µm de 45 mm de diamètre un milieu LB -glucose 0.1%, y déposer 100 µl de resuspension de *B. melitensis* et 100 µl de resuspension d'*E. coli* S17.

- Avec une pipette pasteur boutonnée, mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.

- Incuber 1 heure à 37°C.

- Transférer le filtre sur un milieu sélectif LB+NaI₂₅ Km₂₅.

- Incuber quelques jours à 37°C. Les colonies de *B. melitensis* apparaissent sur le filtre après au moins 3 jours.

- Repiquer au cure-dent les colonies de *B. melitensis* sur deux milieux sélectifs, 2YT+NaI₂₅ Km₂₅ et 2YT+NaI₂₅ Km₂₅ Amp₁₀₀ afin de différencier les clones intégrants et délétants (voir résultats).

4. Techniques d'ADN recombinant

4.1. Extraction d'ADN plasmidique

4.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'E.coli

Une miniprep comprend 5 étapes:

la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1.5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12 500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1(avec RNase A)
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser.
- Centrifuger 15 minutes à température ambiante (à 12500 rpm) , éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, c'est-à-dire ajouter 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm à 4°C. Eliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher sous vide quelques minutes.
- Resuspendre dans 20 à 50 µl d'H₂O distillée stérile (suivant le nombre de copies du plasmide récupéré).

Solutions et tampons:

- Tampon P1 (stocké à 4°C):
RNase A 100 µg/ml
Tris-HCl 50 mM, pH 8.0
EDTA 10 mM
- Tampon P2:
NaOH 200 mM
SDS 1% (stocké à température ambiante)
- Tampon P3: KAc 3.0 M pH 5.5 (stocké à 4°C)

4.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'E.coli

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

- Préculture: ensemencer 5 ml de milieu liquide sélectif (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne.
- Ensemencer 50 à 100 ml de milieu liquide sélectif avec la préculture. Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.

- Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes(jouan), éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 4 ml de P1.
- Ajouter 4 ml de P2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de P3 et agiter doucement, laisser 15 minutes sur glace. Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.
- Centrifuger environ 20 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34), à 4°C et récupérer le surnageant. Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée et laisser couler.
- Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5 et aliquoter par 500 µl en eppendorf. Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser
- Laisser 10 minutes sur table et centrifuger 15 minutes à température ambiante à 12500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Laver à l'éthanol 70%, c'est-à-dire ajouter 1 ml d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant.
- Sècher le culot quelques minutes sous vide.
- Resuspendre dans 50 à 200 µl d'H₂O distillée stérile.(en fonction du nombre copie du plasmide préparé)

Solutions et tampons

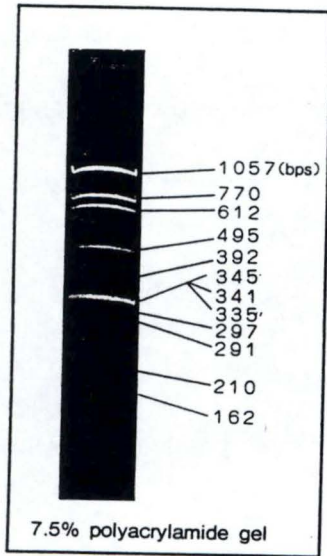
- La composition des tampons P1, P2 et P3 est présentée au point Minipréparation d'ADN plasmidique.
- Tampon d'éliquibration N2:
NaCl 50 mM
MOPS (3-N-Morpholinopropan-sulfonic acid) 50 mM
Ethanol 15%
Triton X-100 0,15%
- Tampon de lavage N3:
NaCl 1 M
MOPS 50 mM pH 7,0
Ethanol 15%
- Tampon d'élution N5:
NaCl 1,25 M
Tris-HCl 50 mM pH 8,2
Ethanol 15%

4.1.3. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN. En pratique, la réaction se fait par incubation de l'ADN avec une ou des enzymes de restriction commerciale.

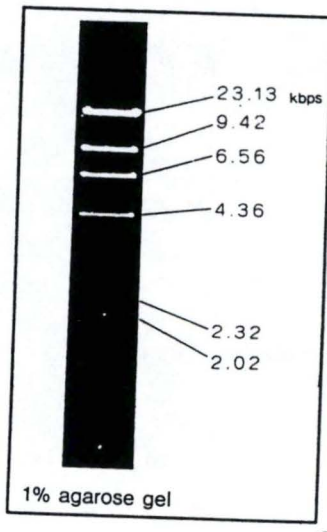
Mélange de restriction:

- x ngd'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- Tampon de restriction 10 x : 1/10 du volume final (tampon commercial fourni avec l'enzyme).Enzyme de restriction: au maximum 1/10 du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN et de l'efficacité de l'enzyme).
- Eau distillée stérile pour atteindre le volume final.
- Incubation d'1 h30 à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).
- Analyse par électrophorèse en gel d'agarose.
- La réaction peut aussi être stoppée (enzyme inactivée) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction en phénol/chloroforme.



MARKER 5

ϕ X174 DNA / HINC II DIGEST



MARKER I

LAMBDA DNA /
HIND III DIGEST

fig.II.7: Marqueurs de poids moléculaire en gel d'agarose.

4.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leurs tailles. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. Le pourcentage habituel est de 0,8%.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille: l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III et le marqueur V (Eurogenetec) (figure II.7)

Les fragments sont visualisés grâce à du bromure d'éthidium . Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est donc visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, mais aussi à la quantité d'ADN présente. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Méthode:

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionner d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°), ajouter 2 μ l de BrEth (2 mg/ml). Couler l'agarose sur le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Après solidification immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE, auquel on a ajouté quelques μ l d'une solution de bromure d'éthidium.
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser l'ADN du gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

Solutions, tampons et fournitures:

- Solution d'alourdisseur:
 - sucrose 50%
 - EDTA 100 mM
 - SDS 1%
 - Bleu de bromophénol 0.1%
- Tampon TAE (50 fois concentré)
 - Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM
 - EDTA 0.002 M
 - Acide acétique glacial 57.1 ml

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

Pour récupérer des fragments d'ADN d'un gel d'agarose nous avons utilisé le kit jetsorb (Genomed,intech). Le principe de ce kit est basé sur l'affinité de l'ADN pour des billes de silice en solution saline concentrée. Le morceau du gel d'agarose contenant le fragment d'intérêt est découpé, l'agarose est ensuite refondu en présence des billes de silice auxquelles se fixe l'ADN. La silice est récupérée par centrifugation, lavée plusieurs fois et l'ADN est élué dans de l'H₂O.

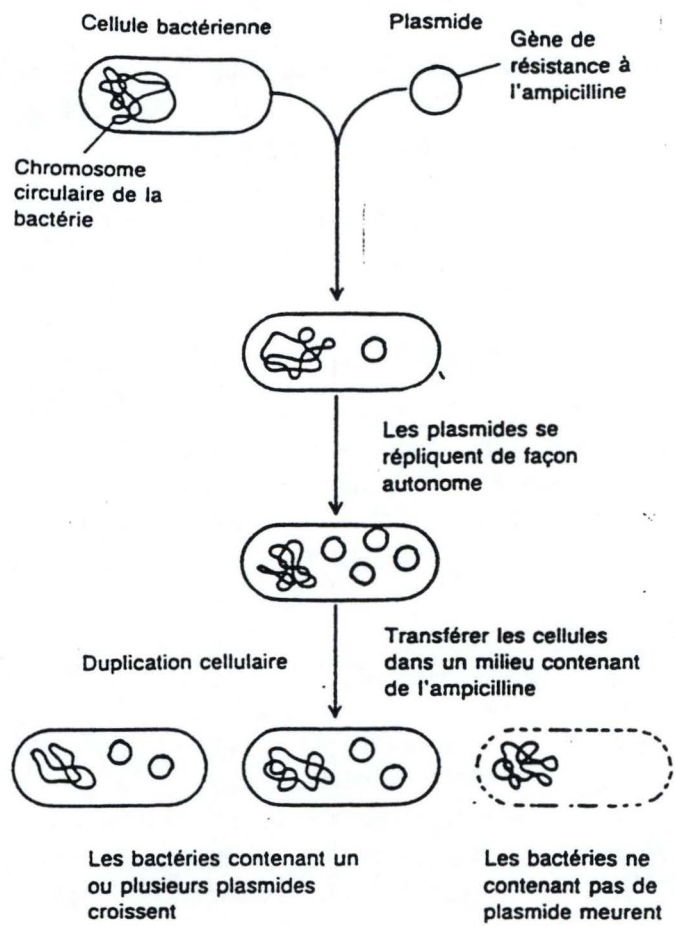


fig.II.8: Transformation bactérienne.

4.1.6. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN d'un gel d'agarose, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Méthode:

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liguier(de 1 à 100ng le plus souvent).
- Ajouter 1 μ l d'ADN ligase T4.
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation (10x, commercial).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à environ 25° si les extrémités sont à bouts francs.
- La ligase est inactivée 15' à 78°C.
- Conserver le mélange de ligation à -20°C.

Témoins à utiliser:

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

4.1.7. Réaction de fill in et de rognage

Pour passer d'une extrémité d'ADN cohésive(issu d'une restriction enzymatique) à une extrémité à bouts francs, on utilise l'ADN polymérase du phage T4.

Cette polymérase, possède une activité 3'-5' exonucléase élevée mais est dépourvue d'activité 5'-3' exonucléase. Les extrémités 5' protrudantes sont complétées (fill in) et les extrémités 3' protrudantes sont rognées (figure II.6).

Méthode:

Le volume réactionnel final est souvent de 40 μ l.

x μ g d'ADN restreint

4 μ l de tampon de T4DNA polymérase 10X

2 μ l d'une solution 2mM en dATP dCTP, dTTP et dGTP

2 μ l de DNA polymérase T4 (1 U/ μ l), amené à 40 μ l avec de l' H_2O

incubation de 20 minutes à 11°C.

La polymérase est inactivée 15min à 75°C

4.1.8. Transformation bactérienne

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans le microorganisme (figure II.8). A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent être perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont isolés par culture sur milieu sélectif contenant l'antibiotique dont le gène de résistance est apporté par le plasmide.

Méthode:

1. Préparation de cellules *E. coli* S17 (Sm^R) ou XL1-blue (Tet^R) compétentes

- Culture de la souche d'*E. coli* S17 à 37°C sur milieu solide LB+ Sm10 (ou Tet12 afin de sélectionner les bactéries XL1-blue contenant l'épisome F').
- A partir d'une de ces colonies, ensemercer 10 ml de LB+ antibiotique. Agiter fortement la préculture à 37°C pendant la nuit.
- A partir de cette préculture ensemercer 100 ml de LB+ antibiotique. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0.3 à 550 nm (début de phase de croissance exponentielle).
- Arrêter la croissance dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C (JOUAN). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1/2 volume de CaCl₂ 50 mM. Répéter cette étape une seconde fois.
- Laisser la solution 20 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm (JOUAN) à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide de CaCl₂ 50 mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial.
- Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C.

2. Transformation des cellules compétentes

- A 100µl de cellules compétentes, ajouter 10 µl de mélange de ligation ou <1 à 10 ng d'ADN.
- Déposer 30 minutes sur glace.
- Choc thermique de 2 minutes à 37°C ou 42°C.
- Ajouter 500 µl de LB liquide (sans antibiotique).
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C.
- Etaler la suspension bactérienne sur milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Témoins de transformation:

- Transformer des bactéries avec un vecteur non-restreint afin de vérifier la compétence des cellules.
- Cellules compétentes subissant les conditions de transformation mais sans ADN, étalées sur un milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules compétentes et sur un milieu sélectif pour tester la validité de ce milieu et évaluer la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

4.1.9. Electroporation bactérienne

L'électroporation est une méthode de transformation de bactéries, où le taux de survie et le taux de transformation bactérienne dépendent de l'intensité et de la durée du choc électrique.

Méthode

1. Préparation des cellules électrocompétentes

- Inoculer 1 L de LB liquide sélectif avec 1/100 du volume d'une culture fraîche de bactéries *E. coli*.XL1-blue
- Incuber les bactéries à 37°C sous forte agitation jusqu'à une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance).
- Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, centrifuger à 4°C à 3000 rpm pendant 15 minutes (JOUAN).
- Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 L d'eau distillée stérile (d.s.) froide. Centrifuger comme précédemment.
- Resuspendre dans 0,5 L d'eau d.s. froide et centrifuger.
- Resuspendre dans 20 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger.
- Resuspendre dans un volume final de 2 à 3 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. La concentration cellulaire est d'environ $1 \text{ à } 3 \cdot 10^{10}$ cellules/ml.
- Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C (pendant environ 6 mois).

2. Electroporation

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans un eppendorf stérile et froid (sur glace), 1 μ l d'ADN plasmidique et au maximum 3 μ l d'un mélange de ligation et y ajouter 100 μ l de cellules compétentes.
- Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace.
- Transférer dans la cuvette d'électroporation (0,2 cm) (se trouvant dans la glace) le contenu de l'eppendorf.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene PulserTM).
- Régler l'appareil sur:
 - capacité 25 μ F
 - résistance 200 Ohms
 - différence de potentiel 22,5 Kv/cm
- Faire le choc électrique.
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
- Transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C.
- Etaler sur milieu sélectif (100 à 250 μ l/boîte) et incuber une nuit à 37°C.

SOC:

- 0,5% Yeast extract
- 2% Tryptone
- 10 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM glucose

5. Amplification d'ADN par PCR

La PCR permet l'amplification de fragments d'ADN.

L'ADN doit être dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 bases complémentaires des séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable (Dynazyme) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting T_m des amorces. Ce T_m se calcule de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. De plus, les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter l'amplification non spécifique, que l'amorce contienne un excès de G/C à l'extrémité 5' et au centre et que les 2 ou 3 dernières bases de l'extrémité soient A/T.

Méthode

- Mélange de réaction réalisé dans un microtube:
 - 10 ng de tampon d'ADN polymérase (Dynazyme)10X
 - 2 μ l de dNTP 10 mM
 - 1 μ l de primer 1 100 pmole/ μ l
 - 1 μ l de primer 2 100 pmole/ μ l
 - 1 μ l de Dynazyme (2 U/ μ l)
 - Porter à 100 μ l avec de l'eau distillée stérile
 - Déposer 100 μ l d'huile minérale ultra-pure au-dessus du mélange de réaction afin d'empêcher toute évaporation.
- Programmer l'appareil à PCR comme suit:
 - Dénaturation de 5' à 95°C.
 - 36 cycles d'amplification présentés comme suit:
 - 1 min. à 95°C pour la dénaturation
 - 1 min. à 55°C pour l'hybridation
 - 30 sec. à 72°C pour la polymérisation
 - Elongation finale de 10 minutes à 72°C.
 - Eliminer l'huile minérale.
 - Déposer 10 μ l sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C.

6. Purification des fragments obtenus par PCR

Cette purification a été menée en utilisant le kit Wizard PCR Preps (Promega).

- Transférer la phase aqueuse dans un eppendorf propre et stérile, car la présence de l'huile minérale peut entraîner une diminution du rendement de la purification.
- Ajouter 100 μ l de "Direct Purification Buffer". Vortexer.
- Ajouter 1 ml de résine (PCR Preps DNA purification resin) et vortexer 3 fois 20 secondes.
- Préparer une minicolonne "Wizard" pour chaque produit PCR.
- Retirer le piston d'une seringue de 3ml et y attacher la minicolonne.
- Injecter le mélange ADN/tampon/résine dans la minicolonne à l'aide du piston (très lentement).
- Détacher la seringue de la minicolonne et retirer le piston. Réajuster le corps de la seringue à la minicolonne et injecter 2 ml de la solution de lavage (isopropanol 80%).

- Transférer la minicolonne sur un eppendorf. Centrifuger le tout 20 secondes à 12000 rpm pour éliminer la solution de lavage et sécher la résine.
- Placer la minicolonne sur un nouvel eppendorf et ajouter 50 µl d'eau distillée.
- Centrifuger 20 secondes à 12000 rpm pour éluer l'ADN.
- Stocker l'ADN purifié à -20°C.

7. Séquençage d'ADN

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est une Amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN

- Une réaction de PCR est réalisée sur le fragment d'ADN .

* La concentration de l'ADN matrice doit être de 0.1 µg/µl si c'est un fragment monocaténaire, 0.2 µg/µl si il est bicaténaire et 10 à 30 ng/µl de produit PCR. Si on se sert d'un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage

* La quantité d'amorce doit être de 3.2 pmoles

* 8 µl de terminator ready reaction mix sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didésoynucléotides marqués à la fluorescéine, du Tris-HCl (pH 9), du MgCl₂, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaq ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP ce qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse. L'ampliTaq ADN polymérase FS remplace la Taq polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués.

- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale (voir point 5).

- Après la réaction de PCR, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant

* Ajouter 2 µl de NaAc 3M pH 4.8

* Ajouter 50 µl d' EtOH 95%

* Mettre 10 ' sur glace

* Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale

* Eliminer le surnageant

* Ajouter 250 µl d'EtOH 70% à 4°C

* Centrifuger pendant 20 minutes

* Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air

- Les produits PCR sont séparés suivant leurs tailles par électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377).

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

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

- Repiquer la souche de *Brucella sp.* sur une pente TSAYE+antibiotiques et incubé 24 h à 37°C.
- En utilisant une pipette pasteur boutonnée et repliée, prélever des bactéries et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 13500 rpm en minifuge.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 5000 rpm. Répéter cette extraction si un nodule blanc est visible à l'interface.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C).
- Mélanger en inversant l'eppendorf. L'adn génomique forme un amas visible.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C).
- Centrifuger 5 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et ajouter dans 100 µl d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incubé l'eppendorf à 37°C pendant quelques heures.

Solutions et tampons

- TENa:
Tris 50 mM à pH 8
EDTA 50 mM
NaCl 0.1 M
- Protéinase K 20 mg/ml dans du tampon:
Tris pH 7.5 1mM
CaCl₂ 1mM
conservé à 4°C.
- Phénol saturé en TENa

8.2. Restriction de l'ADN génomique par *Hind III*

L'enzyme *Hind III* clive l'ADN bicaténaire en un site précis de 6 nucléotides (A/AGCTT). Le clivage de l'ADN génomique de *B. melitensis* montre par *Hind III* de très nombreux fragments dont les tailles sont très diverses (allant de plus de 8500 pb à moins de 700 pb). L'enzyme utilisée est l'enzyme *Hind III* concentrée (40 unités par µl).

Méthode

- 10 µl d'ADN génomique de *Brucella sp. melitensis* (ou 1 µl de maxipréparation d'ADN génomique).
- 1 à 2 µl d'enzyme *Hind III* concentrée (40U/µl).
- 2,5 µl de tampon B de restriction 10x (Boehringer).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile pour obtenir 40µl au total.
- Mélanger avec une pipette pasteur boutonnée.

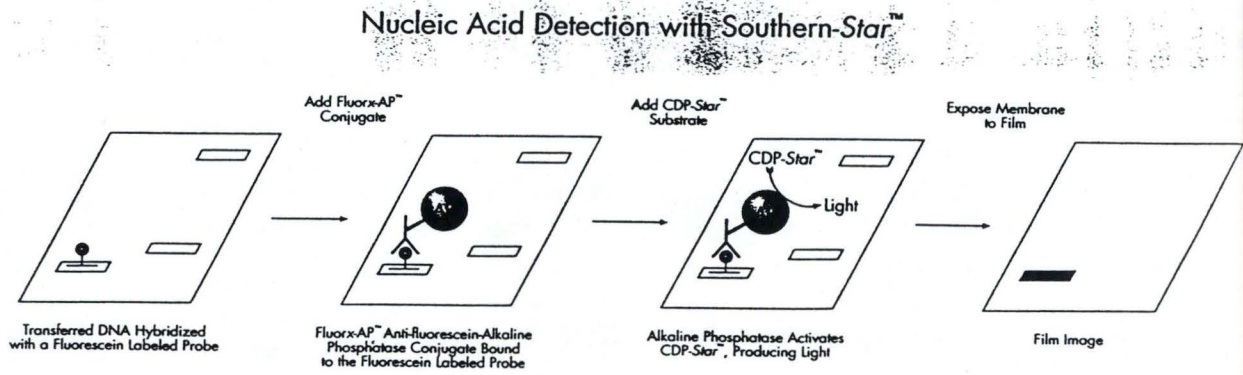


fig.II.9: Processus expérimental de détection du Kit southern-Star.

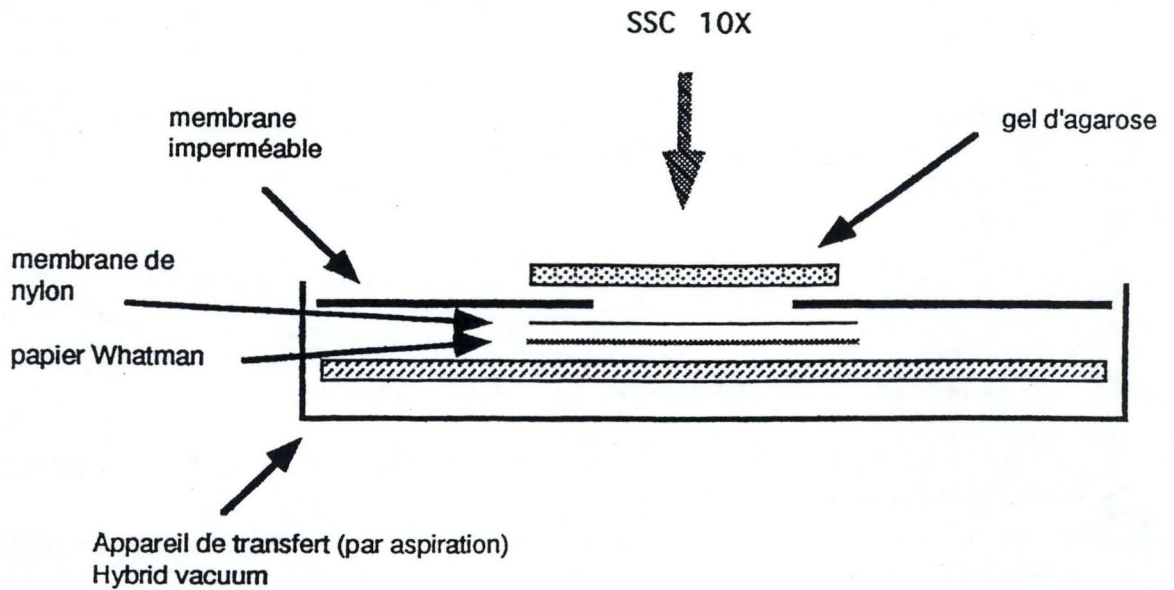


fig.II.10: Schéma du transfert d'ADN sur une membrane.

- Incuber quelques heures à 37°C (*Hind* III).
- Vérifier que la restriction est complète par électrophorèse en gel d'agarose d'1/10 du mélange de restriction.

8.3. Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN génomique de *Brucella sp.* restreint par *Hind* III se fait dans un gel d'agarose de 0.8%. Ces marqueurs permettent également d'évaluer l'efficacité du transfert et de la détection.

Méthode

- Marqueur de taille prébiotinylé:
- 1 µl de marqueur biotinylé (Biolabs).
- 1.5 µl de solution d'alourdiseur
- 12.5 µl de TE.

Incuber à 60°C pendant 3 minutes avant de charger sur le gel d'agarose.

- L'électrophorèse se fait lentement (environ 55 volts).

8.4. Transfert et immobilisation

Après avoir séparé les fragments d'ADN sur gel d'agarose, on transfère les acides nucléiques sur une membrane de nylon. Pour ce Southern blot nous suivons le protocole du kit Southern star Detection (Tropix) (fig.II.9).

Méthode

- Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Pendant ce temps, le gel peut être photographié. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.

- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 30 minutes sous faible agitation.

- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 15 minutes.

- Répéter le bain de neutralisation.

- Découper un morceau de membrane torpillon de taille un peu supérieure à celle du gel (porter des gants sans talc pour manipuler la membrane pour éviter de la tacher) et un morceau de papier Whateman.

- Immerger la membrane dans du SSC 2X.

- Par un système de transfert sous vide, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 10X pendant 1 heure. Suivre le schéma ci-contre utilisant le système de transfert MilliBlot-V Vacuum (figure II.10).

- Après le transfert, sécher correctement la membrane (jusqu'à ce que les bords de la membrane s'incurvent) entre deux feuilles de papier Whateman 3MM (le séchage peut se faire rapidement dans un four à une température comprise entre 42°C et 80°C ou plus lentement à température ambiante).

- Immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 10".

Solution

20X SSC:

-3M NaCl

-0.3 M NaCitrate pH 7

solution de dénaturation
-0.5 M NaOH
-1.5 M NaCl

Solution de neutralisation
-1M Tris pH 7.5
-1.5M de NaCl

8.5 Obtention de la sonde

Le fragment d'ADN encodant un gène utilisé comme sonde est obtenu par PCR ou par restriction d'un plasmide. Le plasmide PCR est purifié par Wizard avant marquage, un échantillon restreint avec l'enzyme choisie. Les fragments obtenus sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose et le fragment intéressant est récupéré du gel par jetsorb. Après avoir mesuré la concentration du fragment récupéré, le marquage de la sonde peut se faire.

8.6. Marquage de la sonde et vérification

Le Random Primer Fluorescein DNA Labeling Kit est utilisé pour générer une sonde marquée à la fluoréscéine à partir d'un fragment d'ADN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I catalyse *in vitro* l'addition de nucléotides marqués à la fluoréscéine à partir de primers aléatoires (nonamers) marqués à la fluoréscéine. Les éléments du kit (stockés à -20°C) sont placés dans de la glace durant la manipulation.

- Préparer le tampon de réaction en mélangeant 1ml de dUTP-fluorescéine avec 11,5µl de Nucléotide buffer 5x dans un eppendorf stérile.
- Dans un eppendorf, mélanger les réactifs suivants:
 - . 100 ng d'ADN template (1 à 29 ml)
 - . 10 µl de random 9-mer primers
 - . de l'eau stérile attendre à un volume de 39 µl
- Chauffer à 95°C pendant 5' puis mettre immédiatement sur glace.
- Ajouter les réactifs suivant dans le tube de réaction:
 - . 10µl de tampon de réaction
 - . 1µl de Klenow (5U)
- Mélanger et incuber à 37°C pendant 30 à 60 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 2µl de Stop Solution
- Conserver à 4°C à l'obscurité.
- Les sondes marquées doivent être dénaturées avant d'être additionnées à la solution d'hybridation.

Réactifs livrés avec le kit

* 5X Nucleotide Buffer

- Solution aqueuse
- dATP, dCTP, dGTP 100mM
- dTTP 20mM

* Random 9-mer Primers

- Tris HCl 10mM, pH 7,5
- EDTA 1mM
- random 9-mer oligonucleotides

* DNA Polymerase I Kleenow Fragment (Exo-) 5U/ml

- Solution au glycerol

* Fluorescein-12-dUTP 1mM

* Stop Solution

- EDTA 0,5M, pH8,0

Le marquage de la sonde est considéré comme efficace lorsque les spots des dilutions 10^{-3} à 10^{-6} sont visibles à la révélation.

8.7. Hybridation

Après avoir fixé l'ADN transféré sur la membrane et marqué la sonde, il faut hybrider la sonde aux fragments d'ADN de la membrane. Le protocole qui a été utilisé est le suivant:

Préhybridation de la membrane

- Immerger la membrane dans du SSC 6X pendant environ 2 minutes.
- Placer la membrane dans un hybritube de 15 ml (Gibco BRL) en l'enroulant autour du plongeur (la face ADN de la membrane vers le plongeur).
- Additionner 10 à 12 ml de solution de préhybridation dans l'hybritube.
- Laisser incuber pendant 1 heure à 68°C (sonde homologue) ou à une température inférieure (sonde hétérologue)

Hybridation de la sonde

- Dénaturer 2 µl de la sonde en la plaçant dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes. Centrifuger et la placer dans de la glace.
- Ajouter la sonde à 10ml d'une nouvelle solution de préhybridation préchauffée à 68°C dans l'hybritube.
- Mélanger en inversant l'hybritube quelques fois. Incuber à 68°C pendant la nuit (il faut un temps d'hybridation d'au moins 6 heures).

8.8. Détection et révélation

La détection avec le kit Southern-Star™ (Tropix) Chemoluminescent Systems" comprend le blocage, une incubation avec une phosphatase alcaline conjuguée à un anticorps anti-fluorescéine (le "Fluorx-AP conjugate") et une réaction finale de chémoluminescence. Le CDP-Star™ (Tropix) est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière, qui peut impressionner un film RX.

Le protocole suivant comprend des temps de lavage qui peuvent être adaptés pour une meilleure élimination du bruit de fond.

- Laver la membrane:

- . 2 x 5' à température ambiante avec du SSC 2x, 1% SDS
- . 2 x 5' à 64°C (ou inférieur si la sonde est hétérologue) avec du SSC 0,1x, 1% SDS
- . 2 x 5' à température ambiante avec du SSC 1x

- Laver la membrane 2 x 5' dans du "Blocking Buffer" (0.5 ml/cm²).
- Incuber 25' dans du "Blocking Buffer" (1 ml/cm²).

- Diluer le "Fluorx-AP conjugate" 1:5000 dans du "Blocking Buffer". Utiliser 2µl de "Fluorx-AP conjugate" dans 10ml de "Blocking Buffer" par 100 cm² (0.1 ml/cm²).

- Incuber la membrane 25' à température ambiante sous agitation constante dans la solution de conjugué.

- Laver :

. 5' dans du "Blocking Buffer" (0.5 ml/cm²).

. 3 x 5' dans du "Wash Buffer" (1 ml/cm²).

. 2 x 2' dans de l'"Assay Buffer" (0.5 ml/cm²).

- Eliminer le liquide en posant le coin de la membrane sur un papier Whateman, puis la poser à plat.

- Déposer une mince couche de CDP-Star sur la membrane (3 ml/ 100cm²) et incuber 5'.

- Eliminer l'excès de CDP-Star et placer la membrane dans un feuillet de développement.

- Enlever les bulles et les faux-plis.

- Eposer la membrane au film de 30" à plusieurs minutes.

- Immerger le film 5' dans le révélateur.

- Rincer le film à l'eau distillée et l'immerger 8' dans le fixateur .

- Rincer ensuite à l'eau de ville.

Réactifs livrés avec le kit

* CDP-Star™ Ready-to-use substrate solution 0,25mM(Conserver à 4°C)

* I-Block™ Reagent(Conserver à 4°C)

- Caséine hautement purifiée fournie sous forme de poudre sèche et protégée de la contamination par la phosphatase alcaline.

* Fluorx-AP(conserver à 4°C)

- Anticorps anti-fluorescéine conjugué avec une phosphatase alcaline.

* 10X Assay Buffer (Conserver à 4°C).

Tris HCl 200mM, pH 9,8

MgCl₂ 10mM

- Diluer 1:10 avec de l'eau MilliQ™ ou équivalent.

Solutions

* Solution de dénaturation

NaOH 500 mM

NaCl 1,5 M

* Solution de neutralisation

Tris 1 M

NaCl 1,5 M

* Solution de préhybridation

EDTA 1mM (0,25ml EDTA 0,2M)

SDS 7% (17,5ml de SDS 20%)

Disodium Phosphate, pH7,2 0,25M (25ml de disodium phosphate 0,5M, pH7,2)

-Ajouter de l'eau déionisée pour arriver à un volume final de 50ml

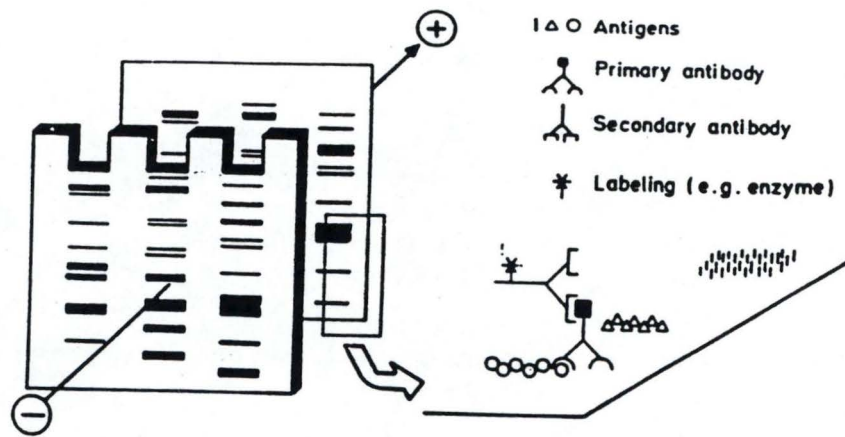


fig.II.11 Principe du western blot.

-Si le SDS précipite, mettre la solution dans un bain à 50°C pour le redissoudre.

* Blocking buffer

I-Block Reagent 0,2% (0,6g)

PBS 1X (30 ml PBS 10X)

SDS 0,5% (7,5 ml SDS 20%)

- Ajouter 30 ml de PBS 10X à 200 ml d'eau déionisée.

-Ajouter l'I-Block Reagent et passer au micro-onde environ 80" (35"/100ml) ou chauffer à 70°C 5', sans faire bouillir.

- Refroidir avant utilisation.

* Wash buffer

PBS 1X (50 ml PBS 10X)

SDS 0,5% (12,5 ml SDS 20%)

- Ajouter de l'eau déionisée pour atteindre un volume de 500 ml.

9. Western blot.

9.1. Principe.

Le western blot est une technique utilisée conjointement à l'électrophorèse en SDS-PAGE. Cette méthode allie le pouvoir de résolution du SDS-PAGE à la spécificité des anticorps.

Cette manipulation est divisée en trois parties (fig .II.11):

- Séparation des protéines par SDS-PAGE.
- Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.
- Détection immunologique.

Electrophorèse SDS-PAGE.

Principe:

En présence de SDS, les protéines sont chargées négativement et peuvent être séparées électrophorétiquement en gel de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation du monomère d'acrylamide en présence d'un agent bifonctionnel qui relie les chaînes entre elles (le N,N' méthylène bisacrylamide). La réaction est initiée par du persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par du TEMED (tétraméthyléthylidiamide). Les gels de polyacrylamide présentent l'avantage d'avoir une taille de pores sélectionnable., puisque la concentration totale en acrylamide et inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Protocoles:

Le stacking gel ou gel de tassement a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation.

| | |
|---------------|---------|
| acrylamide+ | 0.5ml |
| bisacrylamide | |
| Tampon | 1.25 ml |
| stacking | |
| eau distillée | 2.75 ml |
| APS | 0.5 ml |
| TEMED | 5µl |

La composition du gel de séparation ou running gel dépend de la densité de polymérisation désirée.

| | | |
|-------------------|--------|--------|
| %d'acrylamide | 12% | 15% |
| acrylamide | 4ml | 5ml |
| +bisacrylamide(1) | | |
| tampon running | 2.5ml | 2.5ml |
| eau distillé | 3.0 ml | 2.0 ml |
| APS | 0.5 ml | 0.5 ml |
| TEMED (2) | 10 µl | 10 µl |

(1) Solution stock commerciale BRL d'acrylamide 30%, bisacrylamide 0.8% dans l'eau distillée.

(2) Solution stock d'APS (Merck) 1% dans l'eau distillée, stockée a -20°C..

Electrotransfert sur nitrocellulose.

Le gel est tout d'abord placé dans un système de transfert où une différence de potentiel est appliquée entre le gel et la membrane. Les protéines chargées négativement sont donc transférées sur la membrane. Toute augmentation de température est nuisible au transfert des protéines. C'est le cas quand le courant électrique est élevé. Pour éviter cela, le transfert se fait sur glace, dans un tampon de " blotting " ayant une faible force ionique.

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

Détection & révélation immunologique.

La détection du western blot peut se faire de deux manières,

- Soit une détection directe avec un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt couplé à une enzyme de révélation (peroxydase ou phosphatase alcaline).
- Soit une détection indirecte avec un premier anticorps spécifique et un deuxième anticorps dirigé contre le premier. Le deuxième anticorps peut être couplé à la peroxydase (Fig. 9). Cette méthode a l'avantage d'une plus grande sensibilité car il y a une amplification du signal. C'est celle qui sera décrite dans le protocole.

La révélation se fait par colorimétrie avec la peroxydase. Pour le mode d'action, se reporter à la description du chloro-naphtol. C'est un composé qui sous la forme oxydée, forme un précipité coloré.

9.2. Solutions, tampons & matériel.

- Tampon de blotting :

- Tris-HCl 25mM.
- Glycine 192mM.
- Méthanol 20%.

- TBS 10x concentré :

- Tris-HCl 200mM.
- NaCl 5M.

Ajuster à pH 7,5.

- Tampon de saturation de la membrane :

- TBS + 3% de BSA.

- Tampon de dilution des anticorps :

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

- Tampon de lavage :

- TBS + Tween20 0,05%.

- Cuve d'électroblotting (Biorad).

- Membrane de nitrocellulose : Millipore HA 0.45 μ m (Millipore).

- Whatman chromatography paper (Whatman).

- Albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma).

- Anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase

- Solution de révélation :

- H₂O₂ 30 μ l.

- TBS 1x 50 ml.

- 4-chloro-1-naphtol 30 mg.
(réactif HRP, Biorad).

- Méthanol 100% 10ml.

9.3. Protocole.

Electrotransfert.

- placer la membrane de nitrocellulose humidifiée dans le tampon blotting sur le gel.
- Les placer entre deux watman humidifiés.
- Les protéines sont chargées négativement et vont donc migrer vers le pôle positif (l'anode).

On place donc la membrane du côté de l'anode pour assurer le transfert.

- Migration d'une heure à 100 volts dans un bac à glace.
- Changer la glace régulièrement pour limiter l'augmentation de température.

Immunodétection des protéines d'intérêt.

- Saturer la membrane pendant 1 heure à 37°C avec le tampon de saturation.
- Découper le marqueur de poids moléculaire et le révéler séparément (voir ci-dessous)
- Incubation O.N. des premiers anticorps spécifiques de la protéine cible: polyclonal de lapin anti-CtrAC. L'anticorps polyclonal est dilué 1/6000 dans le tampon de dilution.

- Laver 3x 10 minutes avec la solution de lavage.

- Incubation d'une heure avec l'anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (dilué 1:1000).

- Laver 3x 10 minutes avec la solution de lavage.

- Laver 1x 10 minutes avec du TBS, afin d'éliminer toute trace de Tween20. Celui-ci précipitant avec le chloro-naphtol.

- Préparer la solution de révélation.

- Laisser la réaction se poursuivre à l'obscurité.

- Rincer la membrane à l'eau de ville pour stopper la réaction.

Immunodétection du marqueur de poids moléculaire.

-Le marqueur est constitué de protéines marquées à la biotine. Incuber 1h en présence de streptavidine couplée à la peroxydase diluée 1:1000 dans le tampon de dilution et suivre le protocole décrit ci-dessus. La taille des protéines contenues dans ce marqueur est la suivante:

9.4. Mise en évidence d'une protéine par dot blot

Cette methode permet de rapidement mettre en évidence la présence de l'antigène, reconnu par l'anticorps polyclonal dans un lysat bacterien.

- les bacéries sont lysées à la la press de french ou pâr sonication
EDTA 50mM et Tris 50mM, pH8
- Nitrocellulose pour immunodétection.

- Réaliser sur de la nitrocellulose des dépôts séparés de 1 μ l, 2 μ l et 5 μ l pour chaque échantillon.
- Laisser sécher complètement la nitrocellulose.
- Saturer 30 minutes à 37°C avec du TTBS/BSA 3%.
- Suivre la démarche "Immunodétection des protéines d'intérêt" (point 9.3)

RESULTATS

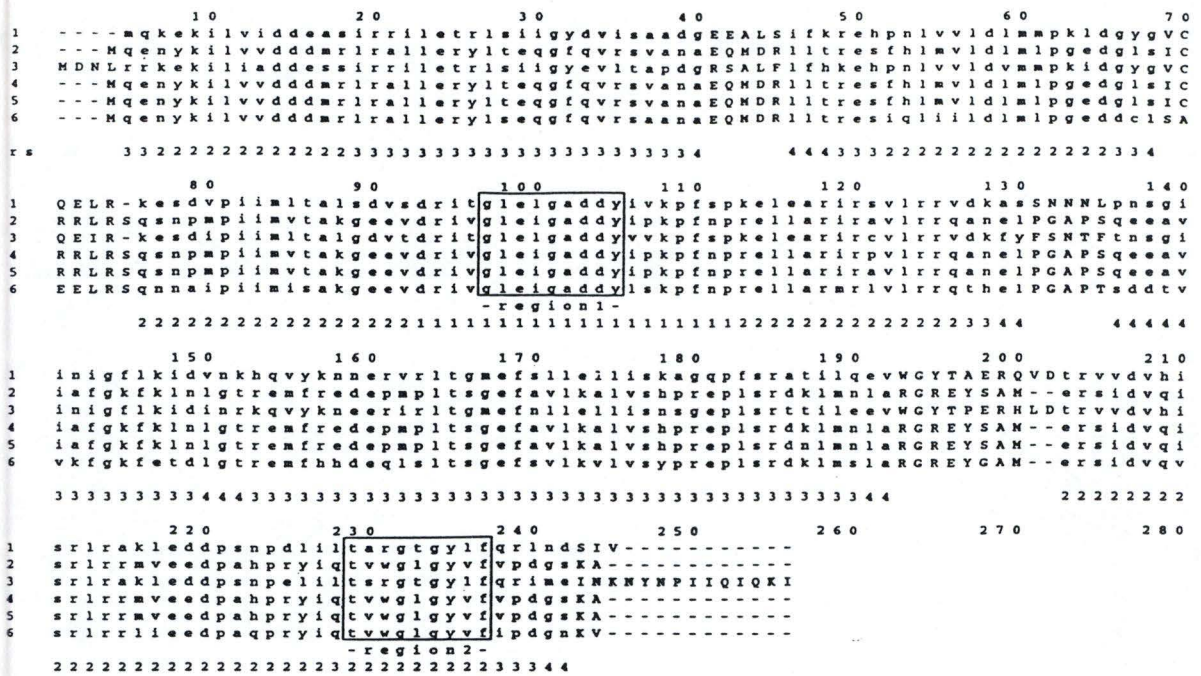


fig.III.1: Alignement multiple des protéines OmpR de 1) *Porphyridium aerugineum*, 2) *Escherichia coli*, 3) *Cyanidium caldarium*, 4) *Salmonella thyphimurium*, 5) *Salmonella thyphi* et 6) *Xenorhabdus nematophilus* d'après le serveur matchbox. Les régions choisies pour la détermination des oligonucléotides sont encadrées.

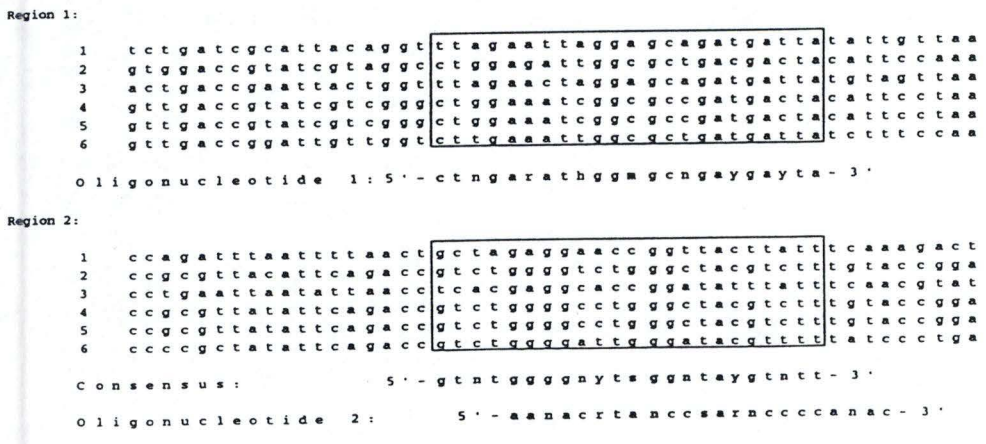


fig.III.1' Alignement nucléotidique des régions déterminées (fig.III.1). Les bases utilisées pour la détermination des oligonucléotides sont encadrées. La numérotation des séquences est identique à celle de la fig.III.1. Les abréviations utilisées dans cette figure sont: n=a,c,g,t; r=a,g; y=c,t; m=a,c; k=t,g; s=c,g; w=a,t; h=a,t,c,g; d=a,t,g; v=a,c,g.

III. RÉSULTATS

1. Clonage d'un gène encodant le régulateur d'un système de transduction du signal chez *Brucella*

La régulation transcriptionnelle est un phénomène qui n'a jamais été étudié chez *Brucella*. Le but de ce travail est de mettre en évidence un élément acteur de cette régulation.

Nos recherches se sont orientées vers la recherche d'un régulateur d'un système à deux composants. L'objectif initial était de cloner le régulateur OmpR responsable de l'osmorégulation chez *E. coli* et chez *Salmonella typhimurium* (Hall et Silhavy, 1981; Liljestrom *et al.*, 1988).

1.1. Mise en évidence par PCR de régulateurs de systèmes à deux composants chez *Brucella abortus* et *Brucella melitensis*.

Les paragraphes suivants présentent un état des lieux des expériences avant que ne débute ce mémoire.

Pour mettre en évidence le gène homologue à *ompR*, une PCR a été réalisée sur l'ADN génomique de *Brucella* à partir d'amorces oligonucléotidiques dégénérées définies sur base de séquences d'OmpR disponibles. Cinq séquences protéiques d'OmpR ont été retenues dans les banques de données: *Porphyridium aeruginum*, *E. coli*, *Cyanidium caldarium*, *S. typhimurium*, *Xenorhabdus nematophilus*. Un alignement multiple de ces 5 séquences protéiques a été réalisé de façon à définir les régions les plus conservées entre ces séquences (fig III.1.). Le domaine de liaison à l'ADN (le domaine effecteur) est le plus spécifique des séquences d'OmpR. Le domaine régulateur est conservé entre les différents systèmes, il est donc nettement moins intéressant pour définir des amorces spécifiques du gène *ompR*.

Pour définir des amorces, la dégénérescence du code doit être prise en compte. Celle-ci implique qu'un acide aminé peut être encodé par plusieurs codons. De façon à réduire le nombre de séquences nucléotidiques potentielles, on choisit parmi les fragments protéiques les plus conservés ceux pour lesquels la dégénérescence du code est la plus basse. Ces séquences nucléotidiques ont été synthétisées et constituent les deux sets d'oligonucléotides dégénérés utilisés dans l'amplification PCR. Le set défini sur le domaine régulateur est appelé CheY like et l'autre set est appelé OmpR like.

Avec ces amorces, une PCR sur l'ADN génomique de *B. abortus* et de *B. melitensis* a amplifié dans les 2 espèces un fragment d'environ 400pb. La séquence de ce fragment a été déterminée et comparée aux séquences disponibles dans les bases de données. A l'époque, une similarité significative a été mise en évidence entre cette séquence et plusieurs régulateurs de systèmes à deux composants dans différents genres bactériens: PhoP, OmpR, PhoB.

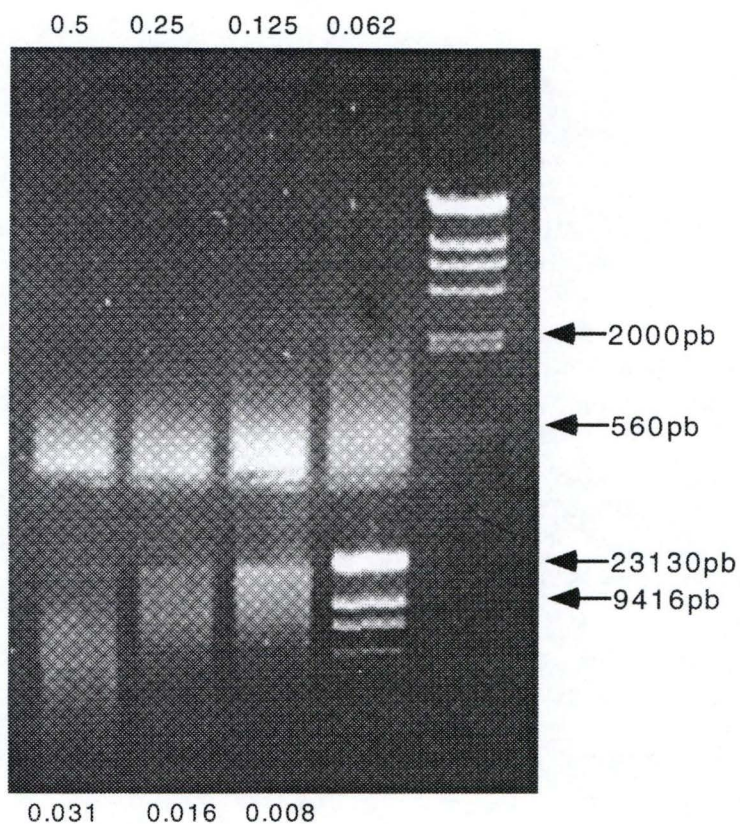


Fig.III.2: Electrophorèse en gel d'agorose (0.8%) des différentes restrictions partielles. Les concentrations d'enzymes sont indiquées en Unités pour 0.9 μ g d'ADN.

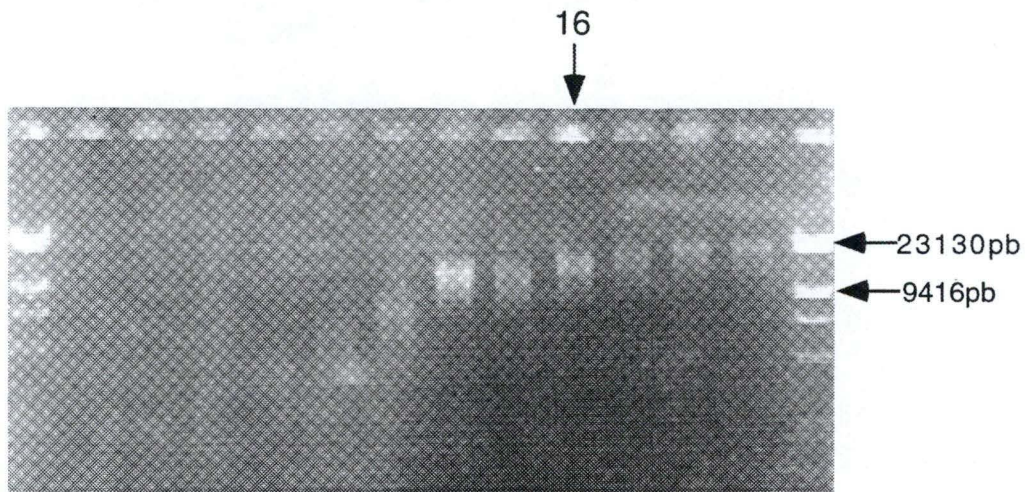


Fig.III.3: Electrophorèse en gel d'agarose 0.8% des différentes fractions du gradient de sucrose.

$$N = \ln(1 - 0.99) / \ln(1 - (I/G))$$

N: Nombre de clones indépendants

I: Taille des inserts

G: Taille du génome

0.99: probabilité d'isoler une séquence donnée

Fig.III.4: Formule permettant d'estimer le nombre de clones indépendants nécessaires pour qu'une banque soit une banque représentative d'un génome.

1.2. Construction d'une banque génomique de *Brucella abortus*

Le fragment amplifié par PCR sera utilisé comme sonde pour cribler des banques d'ADN génomique de *Brucella* afin de cloner la totalité du gène encodant le régulateur. Différents types de banque peuvent être utilisés. Le vecteur (plasmide, cosmide ou phage) utilisé ainsi que la taille des fragments d'ADN génomique sont les facteurs qui définissent une banque. Le criblage de deux types de banque, en phage λ et en plasmide avec des fragments de grande taille, a été envisagé dans le cadre du clonage du gène encodant le régulateur.

Le laboratoire ne possédant pas de banque génomique en vecteur plasmidique, la première étape de ce mémoire a consisté à construire ce type de banque.

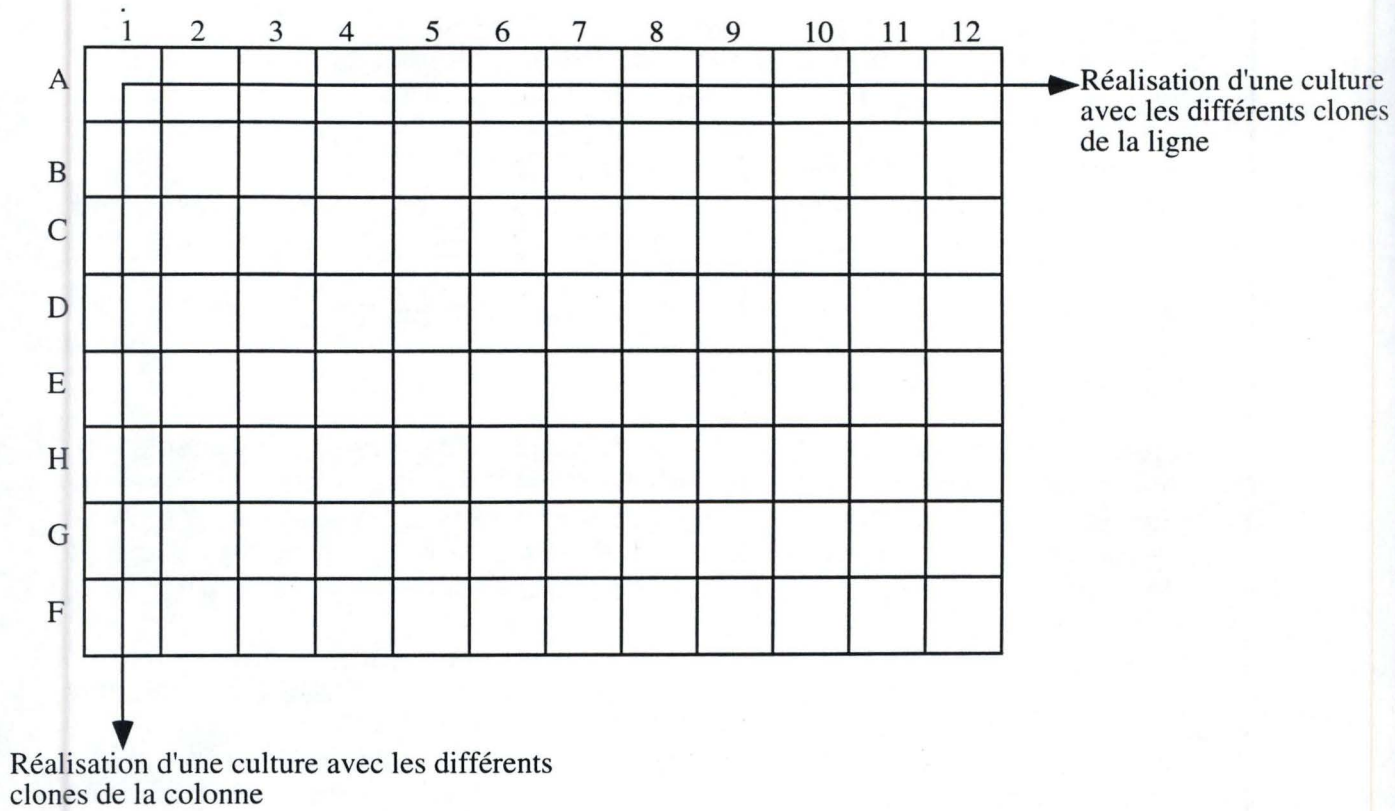
Nous avons décidé de construire une banque de grands fragments (en moyenne 10kb) dans le plasmide pBBR-MCS4. Ce plasmide présente un avantage pour la construction d'une banque: il est présent en relativement faible nombre de copies dans la bactérie (entre 30 et 40 copies chez *E. coli*) ce qui limite les risques de toxicité liés aux inserts de grande taille.

Les fragments d'ADN ont été obtenus par restriction partielle du génome de *Brucella abortus* 544 par *Sau* 3AI. La restriction partielle coupe de manière aléatoire le génome en fragments. Ces fragments sont représentatifs de l'ensemble du génome. La première étape dans la construction de la banque a été la mise au point des conditions de la restriction partielle. Lors d'une restriction partielle, le temps et la concentration en enzyme sont les deux paramètres que l'on peut faire varier pour obtenir les fragments de taille choisie. Nous avons fait varier la concentration de 2 en 2. Des essais ont été menés sur 7 échantillons de 0,9 μ g d'ADN avec 7 dilutions de *Sau*3A (ce qui représente de 1U /0,9 μ g à 0,008U/0,9 μ g). On remarque sur la fig III.2. que la concentration d'enzyme de 0,008U/0,9 μ g donne une majorité de fragments dans un intervalle de 10 à 20 kb. Cette concentration a donc été appliquée sur une plus grande quantité d'ADN génomique (0,9U d'enzyme sur 100 μ g). Cette restriction a été vérifiée par électrophorèse d'un échantillon en gel d'agarose.

Les conditions que nous avons appliquées ont généré une majorité de fragments supérieurs à 10kb, mais aussi, en moindre quantité, des fragments de taille différente. Une centrifugation sur un gradient de sucrose nous a permis de séparer les fragments selon leur taille. Les différentes fractions du gradient récupérées après la centrifugation ont été analysées par électrophorèse d'un échantillon en gel d'agarose (fig III.3.). La fraction 16 contient des fragments de 10kb et plus. Les fragments d'ADN de cette fraction ont été purifiés.

Parallèlement, le plasmide pBBR-MCS4 a été préparé par midiprep sur colonne Qiagen et restreint par *Bam*HI. Les sites *Bam*HI et *Sau*3AI sont compatibles. Une ligation a été réalisée en appliquant un rapport molaire de 4 entre la quantité d'insert (50ng de la fraction 16) et la quantité de plasmide (100ng). Cette ligation a été utilisée pour transformer la souche de *E. coli* XL1-blue. Cette suspension bactérienne a été étalée sur milieu sélectif contenant de la tétracycline (Tet), de l'ampicilline (Amp), de l'IPTG (l'inducteur de l'opéron

1°) Récupération du matériel plasmidique des différents clones



2°) Southern blotting avec ce matériel

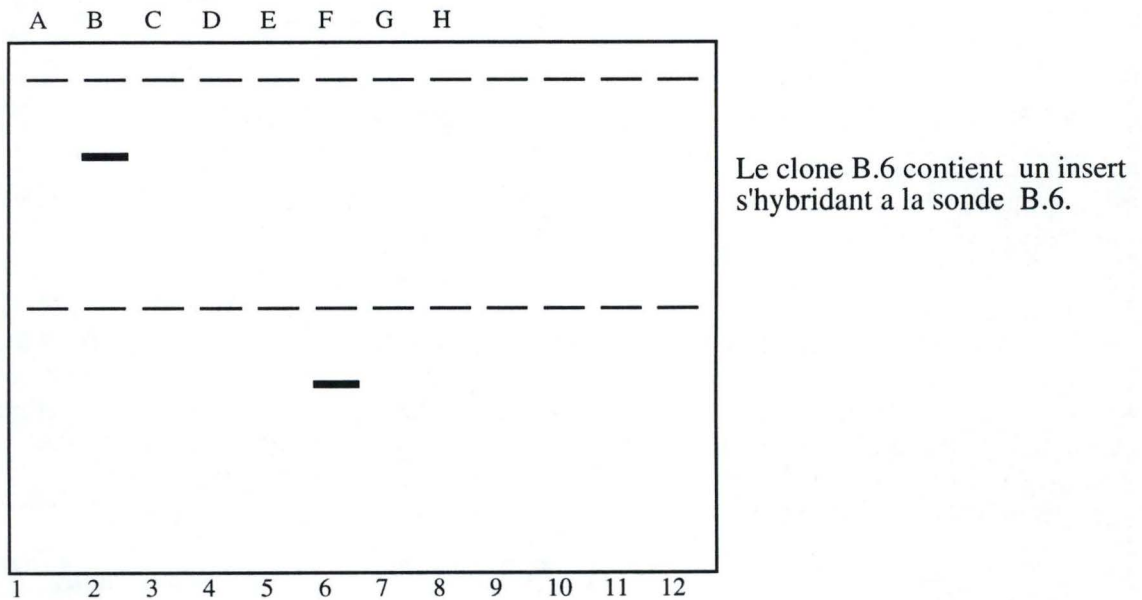


Fig. III.5: Etapes expérimentales d'un criblage en pools croisés.

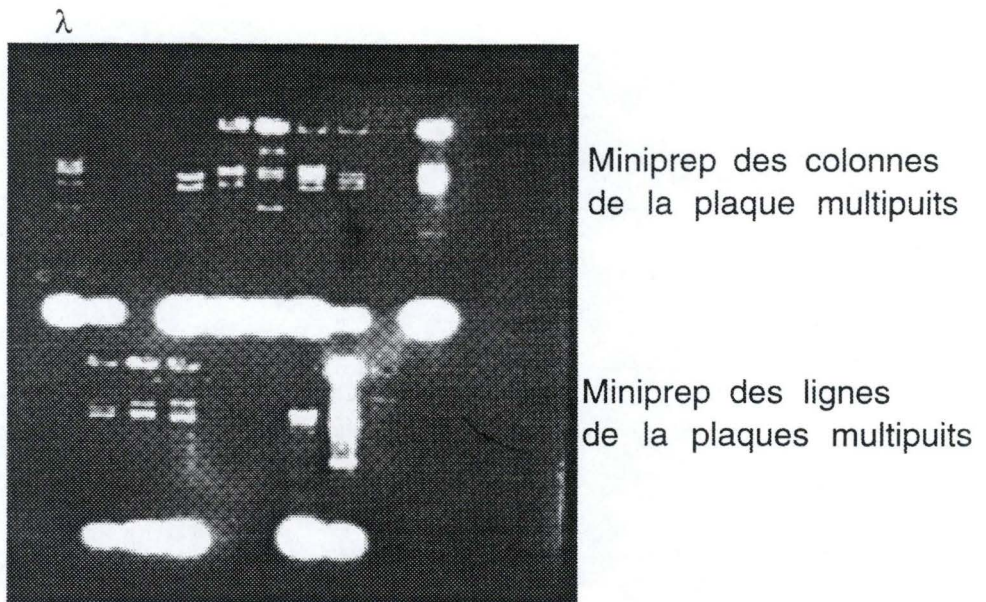


Fig.III.6: Électrophorèse en gel d'agarose de la restriction *EcoRI* de minipreps réalisés sur les pools croisés (la tâche intense est due à l'ARN).

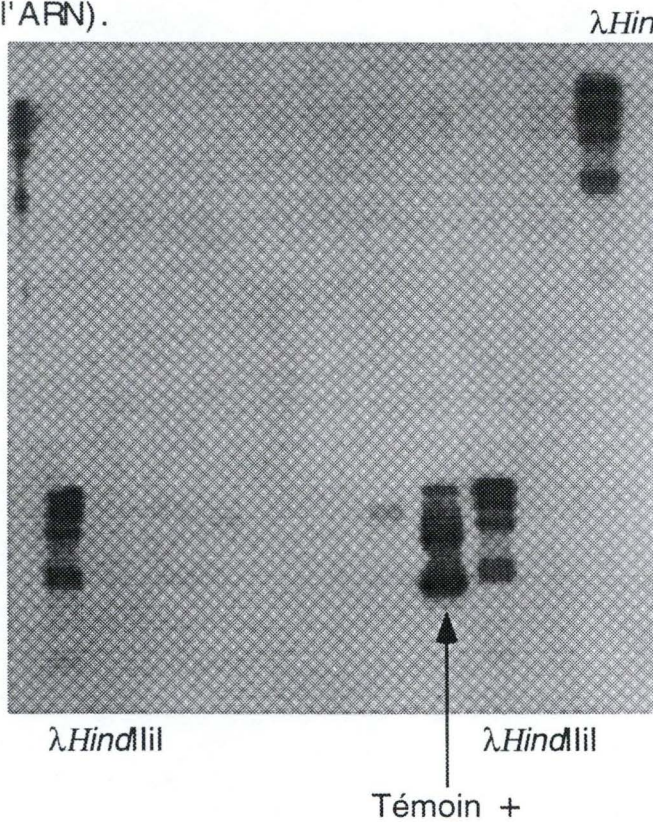


Fig.III.7: Résultat du sothern blot réalisé sur la restriction *EcoRI* des minipreps des pools croisés avec la sonde "régulateur".

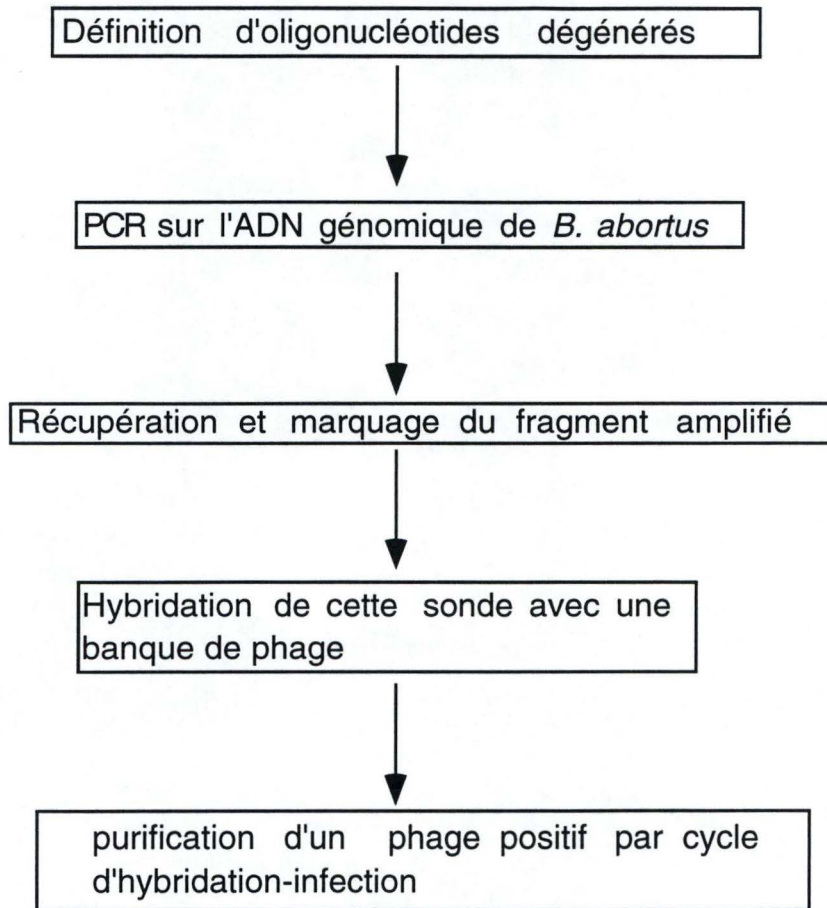


Fig.III.8: Principe du criblage d'un banque de phage avec une sonde nucléotidique.

lactose) et de l' X-Gal (substrat chromogène de la β -galactosidase). Ce milieu est destiné au test blanc-bleu par lequel le plasmide pBBR-MCS4 permet de distinguer les plasmides recombinants et non-recombinants. Dix pour cent des colonies apparues, soit 328 colonies, étaient blanches et donc susceptibles de contenir l'insert. L'ADN plasmidique de 20 clones blancs a été récupéré par miniprep et restreint pour vérifier la présence et la taille de l'insert. Nonante pour cent des clones possèdent un insert de grande taille.

Pour être représentative du génome de *Bucella*, la banque doit contenir au moins 1100 clones dont les inserts sont d'une taille moyenne de 10kb (fig III.4.). Des ligations et des transformations supplémentaires ont été réalisées pour agrandir cette banque mais le résultat obtenu lors de la première expérience n'a pu être reproduit.

Les 328 clones ont été repiqués en 4 microplaques de 96 puits pour permettre un criblage en pools croisés. Cette technique permet d'éviter le criblage des clones de manière individuelle. Ce criblage est réalisé en ensemençant une culture liquide à partir des clones de chaque ligne et de chaque colonne (fig III.5.). L'ADN plasmidique présent dans ces cultures est récupéré par miniprep et restreint par *EcoRI*. Un southern blotting est ensuite réalisé. Le protocole de southern blotting, détaillé au chapitre Matériels et Méthodes est résumé ici. Après restriction, l'ADN génomique est séparé par électrophorèse en gel d'agarose. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon. Cette membrane est incubée en présence de la sonde marquée par amorçage aléatoire et incorporation de nucléotides couplés à la fluorescéine. L'hybridation de cette sonde sur l'ADN de la membrane est détectée par chémoluminescence avec le kit Southern Star (Tropix).

Lors du criblage en pools croisés par southern blot, la ligne et la colonne dont une bande s'hybride à la sonde indiquent les coordonnées du clone contenant l'insert intéressant. Un criblage a été réalisé sur une des 4 microplaques. La sonde correspond au fragment PCR de 400 pb marqué à la fluorescéine. Le contrôle positif est constitué par le pBMO (pGEM-T contenant le fragment PCR). Le résultat de ce southern blot montre que la sonde est marquée puisqu'elle s'hybride au plasmide pBMO (fig III. 6. & 7.). Par contre, aucun des clones de cette microplaque ne semble contenir le gène régulateur.

Des résultats positifs ayant été obtenus en criblant une banque génomique établie en phage, la construction d'une banque plasmidique a été abandonnée.

1.3. Clonage du gène de *Brucella* encodant le régulateur identifié par PCR.

Une banque d'ADN génomique de *Brucella abortus* construite dans le site *EcoRI* du phage λ gt11 a été criblée en utilisant comme sonde le fragment de 400pb amplifié par PCR (Tibor *et al.*, 1994)(fig III.8.).

A partir des 2 plages de lyse positives dans ce criblage, le phage s'hybridant à la sonde a été purifié par plusieurs cycles d'infection-hybridation. L'ADN des 2 phages a été restreint par l'enzyme *EcoRI* de façon à séparer l'insert d'ADN génomique de *Brucella* et les bras d'ADN du phage. Par électrophorèse en gel d'agarose, on évalue à 1500pb la taille de l'insert .

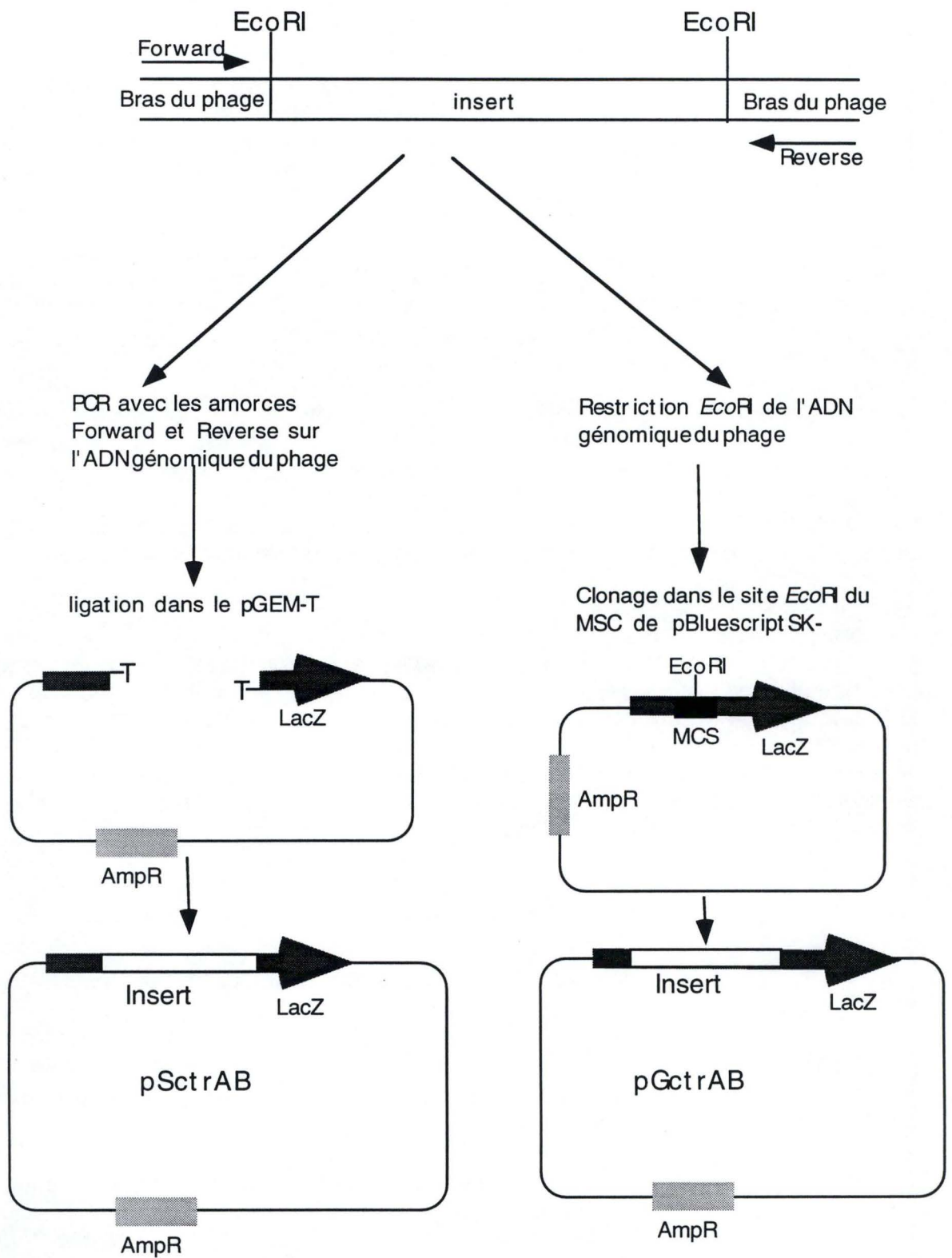


fig.III.9: Clonage de l'insert dans les vecteurs pSK et pGEM-t

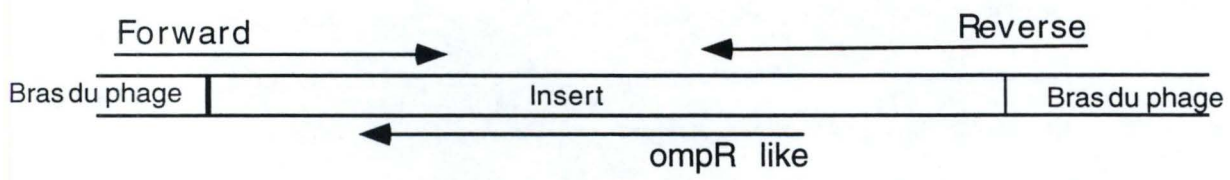


Fig.III.10: Représentation schématique des résultats du séquençage à partir des amorces OmpR like, forward et reverse.

```

1 MRVLLIEDDSAIAQSIELMLKSESNVYTTDLGEEGIDLGKLYDYDI ILL 50
  ||| ||| ||| ||| . ||| . ||| ||| ||| : ||| ||| ||| ||| : ||| ||| : ||| |||
1 MRVLLIEDDSATAQTIELMLKSEGFNVYTTDLGEEGVDLGKIYDYDLILL 50

51 DLNLPDMSGYEVLRTRLRLSKVKTPILILSGMAGIEDKVRGLGFGADDYMT 100
  ||| ||| ||| . : ||| ||| : . : ||| : ||| . : : ||| : : : ||| |||
51 DLNLPDMSGIDVLRTRLRVAKINTPIMILSGSSEIDTKVKTFAGGADDYMT 100

101 KPFHKDELIARIHAIVRRSKGHAQSVITTGDLVVNLDAKTVEVAGQRVHL 150
  ||| ||| : ||| ||| : ||| ||| ||| . ||| : ||| ||| ||| ||| . |||
101 KPFHKDEMIARIHAVVRRSKGHAQSVIKTGDIVVNLDAKTVEVNGNRVHL 150

151 TGKEYQMLELLSLRKGTTLTKEMFLNHLYGGMDEPELKIIDVFICKLRKK 200
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
151 TGKEYQMLELLSLRKGTTLTKEMFLNHLYGGMDEPELKIIDVFICKLRKK 200

201 LDAVSGNQSYIETVWGRGYVLRPDAEMRESAZ 233
  | . | . . . ||| ||| ||| ||| : ||| : : : . . .
201 LAASAHGKHHIETVWGRGYVLRDPNEQVNA.. 231

```

fig.III.12:Alignement des séquences protéiques de CtrAB et CtrAC. Un barre signifie que les acides aminés sont identiques. Un ou deux point qu'il sont similaire similaire. Nos séquences sont similaire à 89% et identique 80% sur 233 acides aminés..

2. Caractérisation du gène de *Brucella* encodant le régulateur

2.1. Clonage de l'insert du phage positif en plasmide

L'ADN plasmidique étant beaucoup plus manipulable que l'ADN de phage, nous avons cloné l'insert d'un des 2 phages positifs dans un vecteur plasmidique. Deux approches ont été suivies: 1° cloner l'insert du phage obtenu par restriction *EcoRI* et 2° à partir d'amorces s'hybridant sur les bras du phage, de part et d'autre du site *EcoRI* (ces amorces sont nommées forward et reverse), amplifier l'insert par PCR et cloner ce fragment amplifié (fig III.9.).

L'ADN du phage a été restreint par *EcoRI* et l'insert a été séparé des bras du phage par une électrophorèse en gel d'agarose. L'insert a été extrait du gel en utilisant le kit Jetsorb. Parallèlement, l'ADN plasmidique du vecteur pBluescript SK- a été restreint par *EcoRI*. Une réaction de ligation entre l'insert du phage et ce plasmide a été réalisée. Une partie de ce mélange de ligation a été électroporée dans *E. coli* XL1-blue. Cette suspension bactérienne a été étalée sur milieu sélectif (Tet, Amp, IPTG, Xgal) destiné au test blanc-bleu. Parallèlement à ce clonage, une amplification PCR a été effectuée sur l'ADN du phage à partir des amorces forward et reverse. Après purification sur colonne Wizard, ce produit PCR a été ligué dans le pGEM-T. Ce matériel a été utilisé pour transformer une souche d'*E. coli* XL1-blue. Comme dans la première approche, cette suspension a été étalée sur milieu sélectif (Tet, Amp, IPTG, Xgal).

Sept cultures liquides ont été ensemencées à partir des colonies blanches obtenues avec le matériel pSK-/insert et sept autres avec le matériel pGEM-T/insert. Après culture, le matériel plasmidique a été extrait des bactéries par miniprep. Ces minipreps ont été restreintes par *EcoRI* pour vérifier la présence de l'insert du phage dans la matrice plasmidique. Après électrophorèse en gel d'agarose, une miniprep de chacune des constructions présentait le profil de restriction adéquat: un fragment de la taille de l'insert (1,5kb) et un fragment de la taille de la matrice plasmidique (3kb). La construction dans le plasmide pSK- a été appelée pSctraB et celle dans le pGEM-T, pGctraB.

2.2 Séquençage du gène encodant le régulateur.

Parallèlement à ces constructions, l'amplification PCR de l'insert d'ADN génomique de *B. abortus* contenu dans le phage positif a été séquencée par séquençage automatique. Les amorces utilisées pour ce séquençage sont 1° les oligonucléotides forward et reverse définis sur les bras du phage et 2° les amorces dégénérées CheY like et OmpR like. Quatre réactions de séquençage ont donc été réalisées. La séquence obtenue à partir de l'amorce CheY like contenait trop d'incertitudes pour être utilisée. Par contre, la séquence réalisée à partir de l'amorce OmpR like chevauche, à son extrémité 5', la séquence obtenue avec l'amorce forward, et à son extrémité 3' la séquence débutant à l'oligo reverse (fig III.10.).

Nous disposons donc de la séquence de la totalité de l'insert (fig III.11.). La séquence a été comparée aux banques de données en utilisant le logiciel Blastx du serveur BLAST (NCBI). Le résultat de cette comparaison indique la présence

```

1      TCATTATGGCGGATTCGCTCGTGTGGTAACCATTTCCTTTACCGGCGGAGTTAATCATATG
61     CGTTAGGACTTAAGGCTCGGTAAACCAGGTGTGGTTTTTTGGGCAACAGGCGAAAAGATA
121    GAGTCCGATGAATCGCTTGCAGGAAGAGTCTTAAAGCGATGCATTAGAGTCAGGAGAATAG
181    GAATATTCGTGTTGATTCAATCGTGTATGAGATTTTTCTAAACGGAAACATAATTATGCTT
                                     -35                                     -10
241    GCCAACCCAGAATCATATTTTGTTAAACCATTTCCTTGCCTGGCACCTTCATACAAAGGCAACGATA

1          +1                                     RBS                                     MetArg
301    GTTCCGTGTGCTGCCGTGAGGGACATCTGGTTCGGCTGCGGAAAGGGGATAAAAGATGCGC

3      ValLeuLeuIleGluAspAspSerAlaIleAlaGlnSerIleGluLeuMetLeuLysSer
361    GTCCTTTTGATTGAAGACGACAGTGCTATCGCACAGAGCATTGAGTTGATGCTCAAGTCC

23     GluSerPheAsnValTyrThrThrAspLeuGlyGluGlyIleAspLeuGlyLysLeu
421    GAGAGTTTTAATGTCTATACGACCGATCTGGGCGAAGAAGGCATCGATCTCGGCAAGCTT
                                                HindIII

43     TyrAspTyrAspIleIleLeuLeuAspLeuAsnLeuProAspMetSerGlyTyrGluVal
481    TACGACTACGACATCATTCTGCTGGATCTCAATCTGCCGGATATgTCTGGTTATGAAGTT

63     LeuArgThrLeuArgLeuSerLysValLysThrProIleLeuIleLeuSerGlyMetAla
541    CTTCGCACCTTGCCTGTGTCCAAGGTGAAGACGCCGATCCTTATCCTTTCCGGCATGGCC

83     GlyIleGluAspLysValArgGlyLeuGlyPheGlyAlaAspAspTyrMetThrLysPro
601    GGCATCGAGGACAAGGTTTCGGCTTGGCTTTGGCGCCGACGATTATATGACCAAGCCG

103    PheHisLysAspGluLeuIleAlaArgIleHisAlaIleValArgArgSerLysGlyHis
661    TTCCATAAGGACGAGCTGATTGCCCGTATCCATGCGATCGTCCGCCGCTCCAAGGGGCAT

123    AlaGlnSerValIleThrThrGlyAspLeuValValAsnLeuAspAlaLysThrValGlu
721    GCCAGTCCGTCATCACGACGGGCGACCTGGTGGTCAATCTGGATGCCAAGACGGTGAA

143    ValAlaGlyGlnArgValHisLeuThrGlyLysGluTyrGlnMetLeuGluLeuLeuSer
781    GTCGCAGGCCAGCGCTTCATCTGACCGGCAAGGAATACCAGATGCTTGAGCTGCTTTCC

163    LeuArgLysGlyThrThrLeuThrLysGluMetPheLeuAsnHisLeuTyrGlyGlyMet
841    CTGCGCAAGGGCACGACGCTCACCAAGGAAATGTTCTGAACCATCTTTATGGTGGCATG

183    AspGluProGluLeuLysIleIleAspValPheIleCysLysLeuArgLysLysLeuAsp
901    GATGAGCCGGAAATTGAAGATCATCGAcGTCTTCATCTGCAAGCTGCGCAAGAAGCTAGAC

203    AlaValSerGlyAsnGlnSerTyrIleGluThrValTrpGlyArgGlyTyrValLeuArg
961    GCCGTTCCGGCAATCAGAGCTATATCGAAACCGTCTGGGGGCGTGGTTATGTGCTGCGC

223    GluProAspAlaGluMetArgGluSerAlaSTOP
1021   GAGCCGGATGCCGAGATGCGCGAAAGCGCCTGATTCGGGCTGCATGGTCTGAATTGTAAA
                                                <<
1081   AAGCTCCGCTTCGGCGGAGCTTTTGCTTTTCAATCACCTGTCTGATGGTCAAAAAAAGCG
<<<<<<<<<      >>>>>>>>>>      <<<<<<<<<

1141   CCGGGTGGACCGGCGCTTTTCAATTCATTCCGCGGAAAAGACGATATCTTCGGCGGTTG
<<<<      >>>>>>>>>>      EcoRV

1201   CATGAATGGAGATTT...//... GTGAGCGCCATCGTA 1515

```

Fig III.11: Séquence nucléotidique de l'insert cloné. Sont indiqués: la position des sites *HindIII* et *EcoRV*, les boîtes promotrices -35 et -10 et le site +1 prédits avec le plus haut score par le logiciel NNPP. Les bases correspondant au consensus présent en amont des gènes régulés par CtrAC sont soulignées. RBS: site de fixation du ribosome. La séquence protéique déduite de l'ORF est indiquée et les résidus de la poche acide sont doublement soulignés. Un motif spécifique des régulateurs est souligné. <>>: indique les terminateurs potentiels de transcription.

dans l'insert d'une ORF encodant une protéine homologue à différents régulateurs bactériens. La similarité la plus significative est observée avec le régulateur CtrA de *C. crescentus*. L'ORF identifiée a une longueur de 696 nucléotides. Le codon ATG est localisé à la position 355 et le codon stop au nucléotide 1051. Cette ORF encode une protéine de 232 résidus dont la masse moléculaire théorique est de 26049 kDa. Nous nommerons la protéine encodée par cette ORF, CtrAB et le gène correspondant *ctrAB* chez *Brucella*. Chez *Caulobacter*, le gène sera nommé *ctrAC* et la protéine CtrAC.

Le contenu en GC (54.8%) de l'ORF est en accord avec le contenu élevé (57 à 59%, De Ley *et al.*, 1987) décrit pour l'ADN de *Brucella*. Une analyse avec le serveur NNPP (promoter prediction by neural network) détecte en amont de l'ORF des séquences promotrices potentielles répondant au consensus du promoteur de *E. coli* (boîtes -35 et -10). Au niveau de ces boîtes, on peut mettre en évidence la présence d'un motif correspondant au consensus identifié dans les promoteurs de gènes régulés par CtrAC. Il s'agit des gènes flagellaires de classe II, du gène *ccrM* encodant une ADN méthyltransférase, du gène *hemE* (Quon *et al.*, 1996) et du gène *ctrAC* lui-même (communication personnelle).

Un site potentiel de liaison au ribosome (RBS ou Shine-Dalgarno) est présent en amont de l'ATG. Deux terminateurs potentiels de transcription correspondant à une répétition inversée (susceptible d'adopter une structure en "hairpin") sont mis en évidence par le logiciel Terminator du package GCG. Ces terminateurs sont localisés après le Stop de traduction, en position 1079 à 1104 et 1133 à 1161. Sur base de la séquence, un site *HindIII* et un site *EcoRV* sont présents dans l'insert. Des restrictions de pGctrAB et pSctrAB confirment la présence et la position de ces sites dans l'insert des deux vecteurs.

Une comparaison entre les séquences peptidiques de CtrAC et CtrAB réalisée par le logiciel bestfit montre que 89% des acides aminés ont des propriétés physico-chimiques similaires et que 80.5% des acides aminés sont identiques (fig III.12.). De plus, un alignement multiple de CtrAB, CtrAC et de régulateurs qui leur sont similaires dont CheY, a été réalisé dans le cadre d'un autre mémoire (K. de Fays, 1996). Cet alignement montre que CtrAB est constituée de deux domaines: le domaine régulateur N-terminal et le domaine C-terminal de liaison à l'ADN. Le résidu Asp51 s'aligne à l'Asp 57 cible de la phosphorylation chez CheY. Quatre autres résidus -Glu7, Asp8, Ser79 et Lys101- correspondent aux résidus Asp12, Asp13, Thr87 et Lys109 de la poche acide de CheY (site responsable de l'activité de phosphorylation)(Volz, 1993). Une séquence répondant au consensus spécifique des régulateurs de réponse GlyAlaAspAspTyr est également présente aux résidus 94 à 98.

Sur base de ces résultats, nous concluons que le gène homologue au gène *ctrA* de *C. crescentus* a été cloné et séquencé chez *B. abortus*. Ce gène encode un régulateur similaire aux régulateurs de la famille OmpR et qui est impliqué chez *C. crescentus* dans le contrôle du cycle cellulaire.

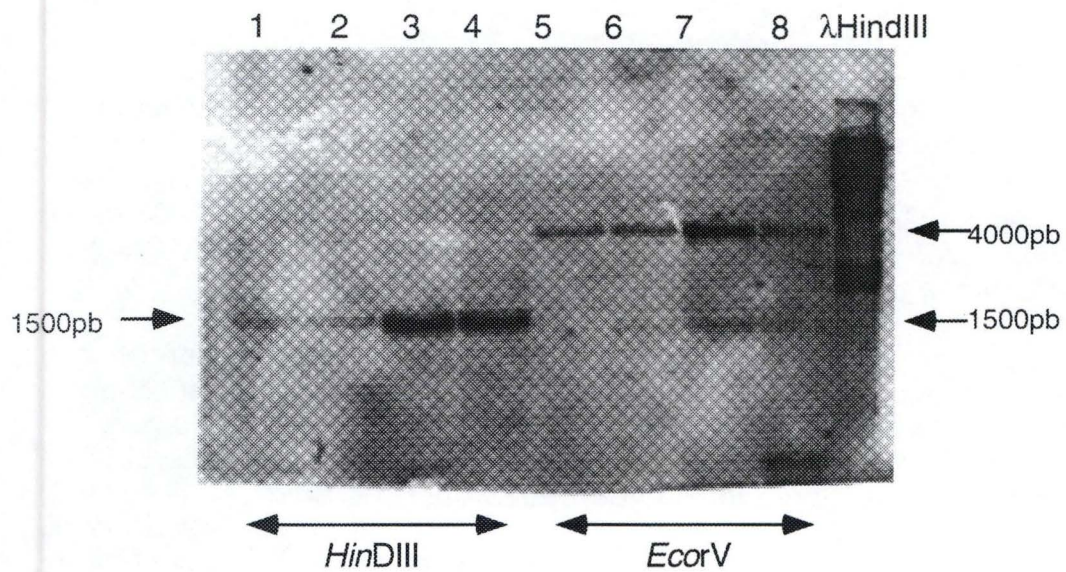


fig.III.13: Résultat du southern réalisé avec la sonde *ctrAB* sur l'ADN génomique de 4 espèces de *Brucella* restreint par *HindIII* (1 à 4) ou par *EcoRV* (5 à 8).

1 et 5: *B. melitensis* 16M
 2 et 6: *B. abortus* 544
 3 et 7: *B. ovis* Reo198
 4 et 8: *B. suis* 1330

3. Mise en évidence du gène *ctrA* chez 4 espèces de *Brucella*

Afin de mettre en évidence la présence du gène *ctrAB* chez différentes espèces de *Brucella*, nous avons réalisé un southern blotting sur l'ADN génomique de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. ovis* avec une sonde *ctrAB*. Pour réaliser la sonde *ctrAB*, le plasmide pGctrab a été restreint par *EcoRI* et l'insert contenant le gène *ctrAB* a été récupéré d'un gel. Après la récupération, cet insert a été marqué à la fluorescéine. L'insert utilisé comme sonde contenant un site *HindIII* et un site *EcoRV*, l'ADN génomique des différentes espèces a été restreint par chacun de ces enzymes. On augmente ainsi les chances de mettre en évidence un polymorphisme.

La sonde *ctrAB* s'hybride à l'ADN génomique des 4 espèces et le profil d'hybridation est le même quelque soit l'espèce (fig III.13.). Sur l'ADN génomique restreint par *HindIII*, la sonde s'hybride à une seule bande alors que le gène *ctrAB* contient un site de restriction *HindIII*. Nous proposons comme hypothèse que la sonde s'hybride à deux fragments de même taille et donc que le gène *ctrAB* est bordé de deux sites *HindIII* équidistants du site *HindIII* présent dans son ORF.

Le gène *ctrAB* est donc présent chez les 4 espèces principales du genre *Brucella*. La conservation du profil d'hybridation entre les différentes espèces signifie que la région chromosomique qui contient *ctrAB* est relativement bien conservée d'une espèce à l'autre. Nous n'avons en effet pas mis en évidence de polymorphisme dans la longueur des fragments restreints par *HindIII* et *EcoRV*.

4. Construction d'un délétant du gène *ctrAB* chez *B. melitensis* 16M

Le séquençage et le clonage du gène encodant un régulateur homologue au gène *ctrA* de *C. crescentus* ayant été réalisé chez *Brucella*, nous souhaitons étudier sa fonction à travers une expérience de délétion. Rappelons que ce gène est essentiel chez *C. crescentus*. Cette expérience apportera un élément de réponse à la question: ce gène est-il essentiel chez *Brucella*. Si un mutant viable est isolé, l'analyse de son phénotype permettra d'appréhender la fonction de la protéine.

Pratiquement, nous appliquerons un protocole de remplacement de gène qui a été appliqué à *Brucella* par l'équipe de Halling en 1991. La première étape du protocole de délétion consiste à remplacer la majeure partie de l'ORF de *ctrAB* présente sur le plasmide pGctrab par le gène marqueur Kan conférant la résistance à la kanamycine. Ce gène *ctrAB* délété doit ensuite remplacer le gène sauvage dans le génome de *Brucella*: Pour cela, le plasmide est transféré de *E. coli* à *B. melitensis* par conjugaison. Ce plasmide est incapable de se répliquer dans *Brucella* (il est dit suicide). Les colonies de *Brucella* transconjugantes (phénotype Kan^R) auront donc intégré ce plasmide dans le chromosome par recombinaison homologue. Ce crossing-over a lieu entre les séquences localisées en amont (ou en aval) du gène délété portées par le plasmide et leur copie chromosomique. Ces séquences doivent donc obligatoirement border le marqueur Kan dans la construction destinée à la délétion.

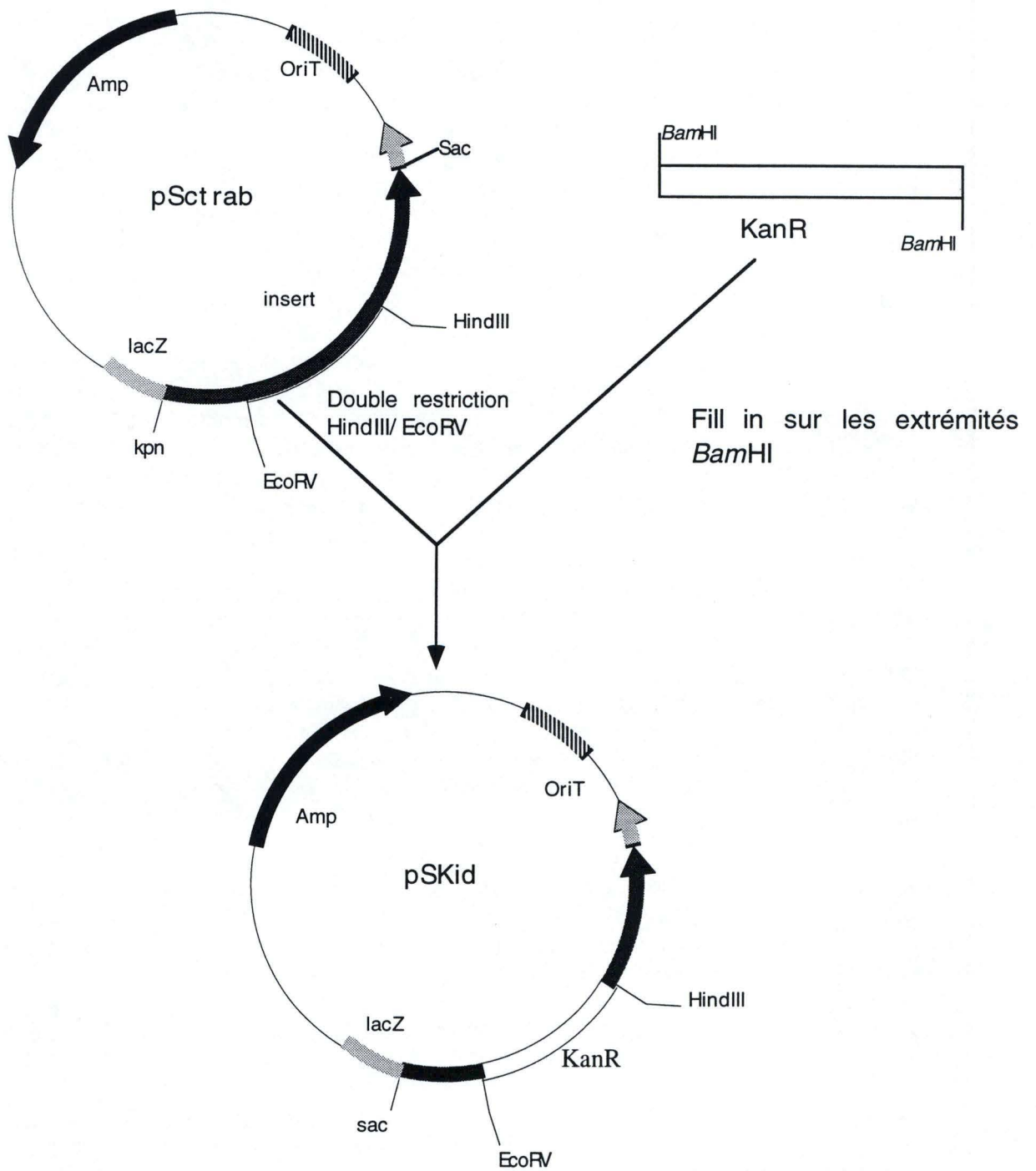


Fig.III.14: Représentation schématique de la construction du plasmide psKid contenant une copie délété du gène *ctrAB*.

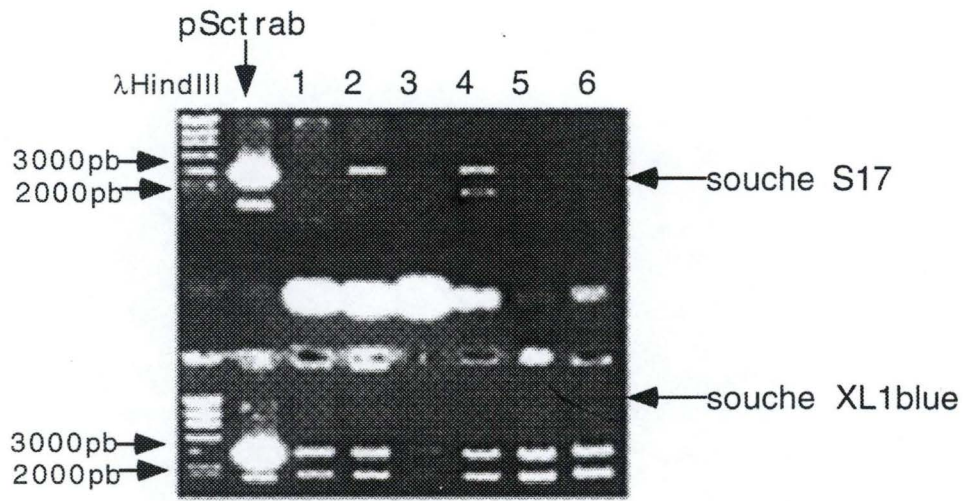


Fig.III.15: Résultat de la restriction *Eco*I des minipreps réalisée sur les clones de la souche S17 et XL1-blue.

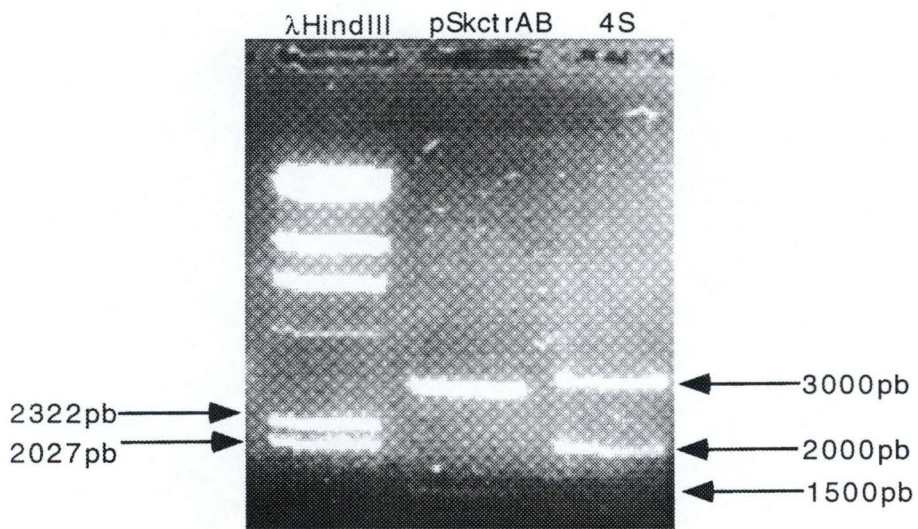


Fig.III.16: Comparaison entre le clone 4S restreint *Eco*I et le plasmide pSctrAB

La délétion du gène a été effectuée par une double restriction *HindIII/EcoRV* du plasmide pGctrab. Cette restriction occasionne la perte de 576pb de l'ORF et de 133pb en aval de celle-ci (fig III.14.). Après séparation par électrophorèse en gel d'agarose, la matrice sans l'ORF a été récupérée du gel par Jetsorb. Un fill in a été réalisé sur cette matrice pour transformer les extrémités *HindIII* en bouts francs.

Le gène marqueur Kan est issu d'une restriction *BamHI* du plasmide pUC4K suivie d'un fill in pour rendre ces extrémités *BamHI* franches et d'une récupération sur gel. Une ligation a été effectuée entre ce marqueur et la matrice contenant les séquences flanquantes du gène *ctrAB*. Une partie de cette ligation a été utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* XL1-blue. Cette suspension bactérienne a été étalée sur milieu sélectif Tet Amp Kan. Des cultures liquides ont été ensemencées à partir des 5 clones obtenus sur ces milieu. L'ADN plasmidique de ces cultures a été récupéré par miniprep. Une restriction analytique par *EcoRI* suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose nous a permis d'identifier les clones contenant la construction attendue: la restriction *EcoRI* génère un fragment d'environ 2000pb, correspondant aux séquences flanquantes 5' (475pb) et 3' (431pb) du gène *ctrAB* liguées au gène *kan* (1281pb), et la matrice pGEM-T de 3kb. Ce profil a été obtenu pour deux clones. Ces clones ont été nommés pskid 1 et 2.

Le plasmide pGEM-T n'étant pas mobilisable par conjugaison, nous avons transféré le gène délété dans un plasmide pBluescript KS portant une origine de transfert oriT. OriT est une séquence nécessaire pour la conjugaison car elle est reconnue par la machinerie protéique du transfert conjugatif de plasmide. Le plasmide pskid1 a été restreint par *EcoRI* pour récupérer la copie délétée de *ctrAB*. La matrice et le fragment d'intérêt issus de cette restriction ont été séparés en gel d'agarose et l'insert a été récupéré par Jetsorb. Ce fragment a été ligué dans le plasmide pKS-oriT préalablement restreint par l'enzyme *EcoRI*. Une partie de ce mélange de ligation a été utilisée pour transformer la souche d'*E. coli* S17/1 et la souche XL1-blue. La souche S17/1 possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome; ce plasmide encode les protéines nécessaires à la conjugaison.

Les suspensions bactériennes de ces deux transformations ont été étalées sur milieu sélectif Tet, Amp, Kan. L'ADN plasmidique de 6 clones de chaque transformation a été récupéré par miniprep à partir de cultures liquides. Cet ADN a été restreint par l'enzyme *EcoRI*. Le profil de restriction de ces clones a été comparé au profil *EcoRI* du plasmide pSctrab (fig III.15 et 16). Par rapport à l'insert de pSctrab, l'insert contenant la copie délétée du gène est plus grand de 500pb. Le profil attendu correspond donc à une matrice d'environ 3kb et à un insert d'environ 2kb. Les clones 3, 5 et 6 de la souche S17 et tous les clones de XL1-blue présentent ce profil. Le clone 5 d'*E. coli* S17, nommé p5S, a été utilisé pour réaliser une conjugaison avec *Brucella melitensis* 16M. Au cours de cette conjugaison, le clone 5 d'*E. coli* S17 est mis en présence de *B. melitensis* 16M sur un milieu solide et le plasmide est mobilisé d'*E. coli* à *Brucella*.

Les bactéries résultant de cette conjugaison ont été étalées sur milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et de la kanamycine. L'acide nalidixique (Nal) permet de sélectionner les *Brucella* et donc d'éliminer les bactéries *E. coli* S17 donneuses, la kanamycine permet de sélectionner les clones *Brucella*

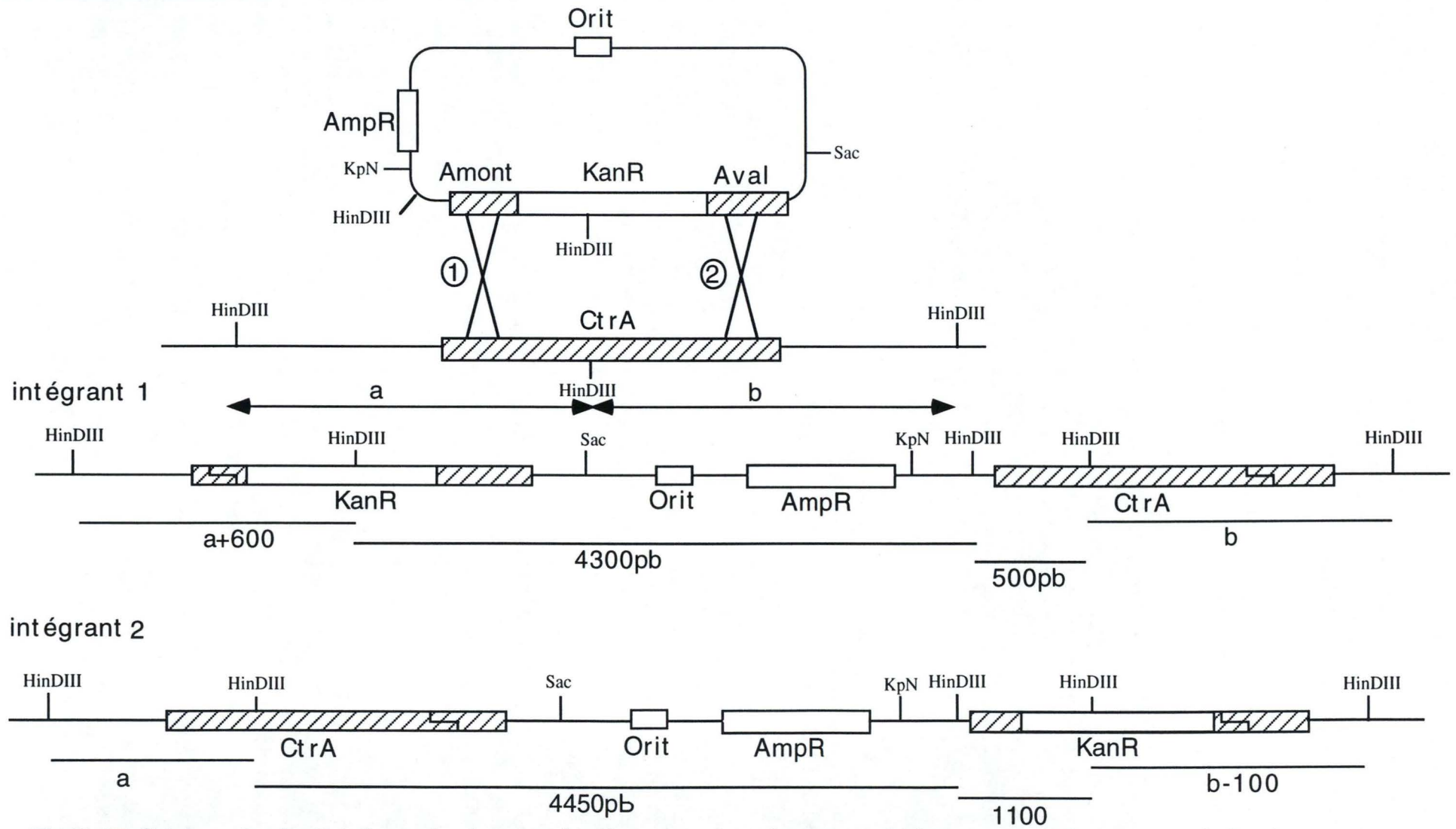


Fig.III.17: Schéma du résultat d'une simple recombinaison dans les séquences situées en amont 1 ou en aval 2 du gène *ctrAB* conduisant à l'intégration du plasmide. La position des sites *hind*III est indiquée ainsi que la taille des fragments *Hind*III.

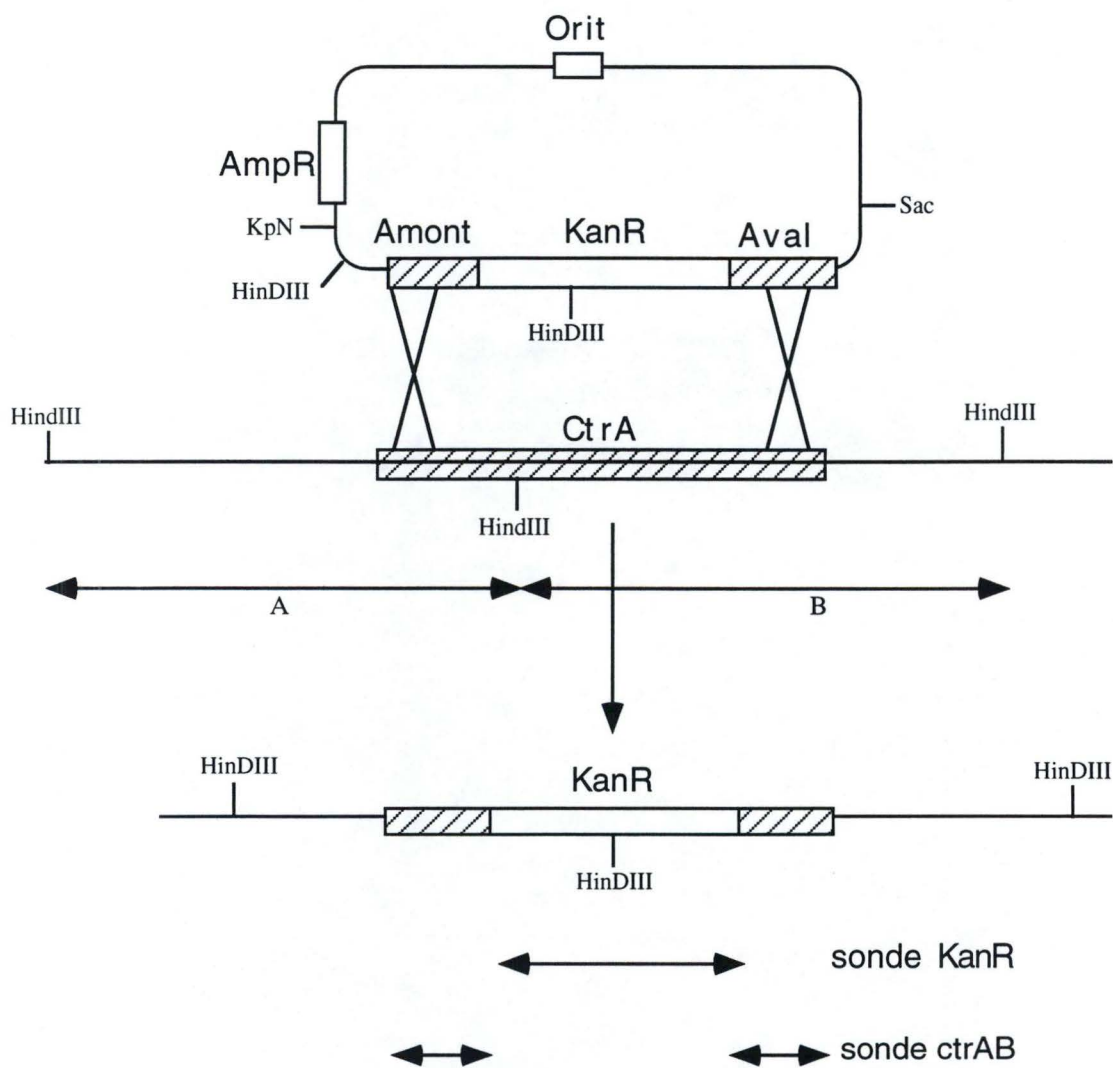


Fig.III.18: Schéma d'une double recombinaison conduisant au remplacement du gène *ctrAB* sauvage par la copie délétée contenant Kan. Les zones d'hybridation des sondes Kan et *ctrAB* sont indiquées.

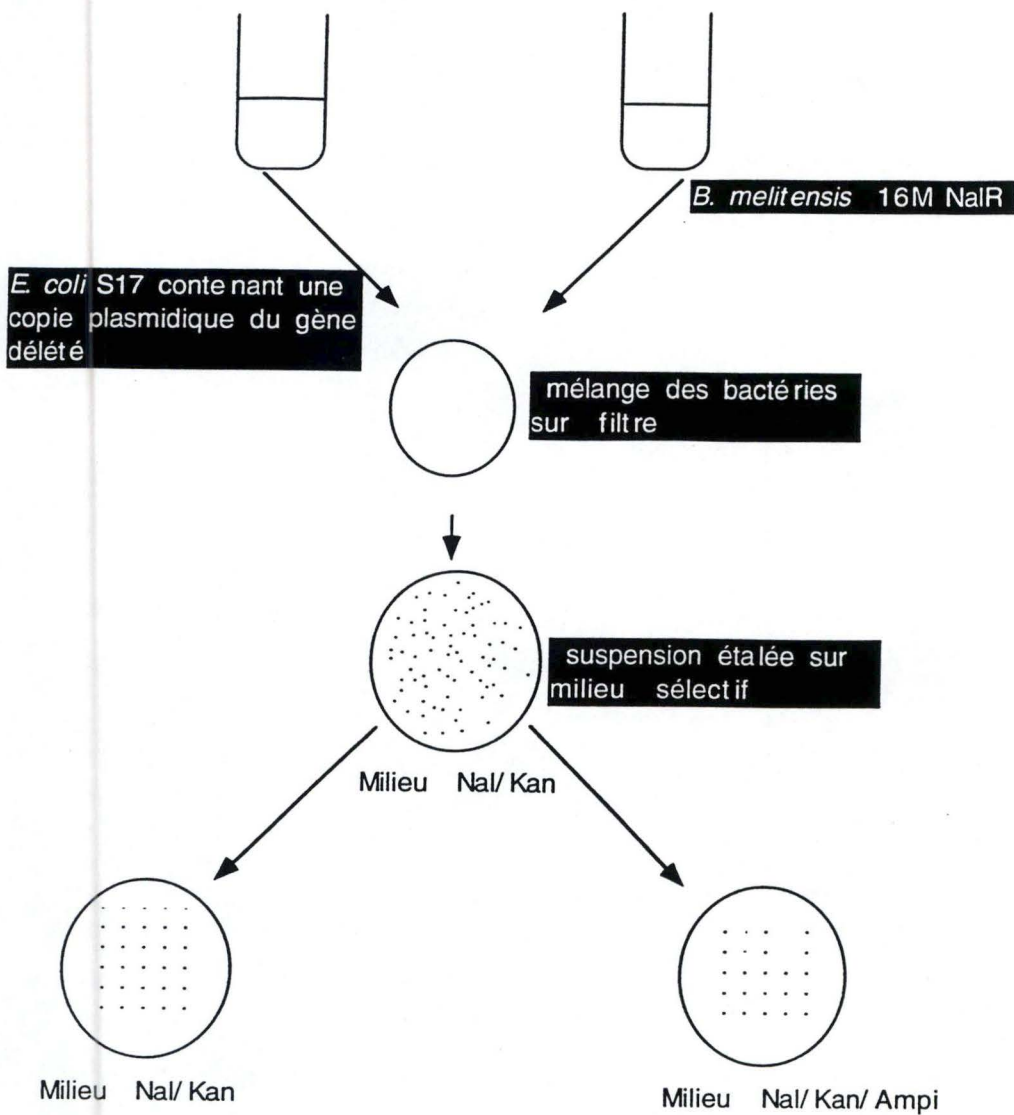


Fig. III.19: Représentation schématique de la conjugaison, de la sélection des *Brucella* transconjugantes et de leur analyse phénotypique.

| sonde | sauvage | délétant | intégrant 1 | intégrant 2 |
|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|
| <i>ctrAB</i> | a = 1500 | a+600 = 2100 | a+600 = 2100 | a = 1500 |
| | b = 1500 | b-100 = 1400 | b = 1500 | b-100 = 1400 |
| | | | 4300 | 4450 |
| | | | 500 | 1100 |
| Kan | | a+600 = 2100 | a+600 = 2100 | b-100 = 1400 |
| | | b-100 = 1400 | 4300 | 1100 |

Fig III.20.: Estimation de la taille des fragments de restriction *HindIII* s'hybridant aux sondes *ctrAB* ou Kan chez des clones sauvage, délétant, ou chez les deux types d'intégrants. Les tailles sont exprimées en paires de bases et sont approximatives.

transconjugants ayant intégré le marqueur Kan par recombinaison homologue (fig III.19.). Cent et six clones se sont développés sur ce milieu.

Lors de l'intégration de l'ADN plasmidique, deux événements sont possibles. Une simple recombinaison impliquant un seul crossing-over entre la région flanquante 5' ou 3' du plasmide engendre l'intégration de la totalité du plasmide (fig III.17.). Une double recombinaison engendre le remplacement du gène sauvage par le gène délété (fig III.18.). Les premiers transconjugants sont dits intégrants et les seconds sont dits délétants. Une différence phénotypique permet de distinguer ces deux types de clones. Les clones intégrants sont résistants à la kanamycine et à l'ampicilline (marqueur de résistance apporté par la matrice plasmidique) alors que les clones délétants résistent à la kanamycine mais sont sensibles à l'ampicilline.

Pour caractériser leur phénotype, les 106 clones transconjugants KanR ont été repiqués sur milieu sélectif Nal Kan et sur milieu sélectif Nal Kan Amp (fig III.19.). Tous les clones testés sont résistants à l'ampicilline à l'exception d'un clone, le clone1. Le clone2 montre une croissance ralentie en présence d'ampicilline. Des répliques de ces clones en présence de concentrations croissantes d'ampicilline (25, 50 et 100 µg/ml) ont été réalisées pour vérifier si le phénotype observé est dépendant de la dose d'antibiotique. Le clone1 est sensible même à la dose d'ampicilline la plus faible. Le clone2 montre une croissance plus rapide à faible dose d'ampicilline. Sur base de ces tests phénotypiques de croissance en présence d'ampicilline, le clone1 est un candidat délétant et les autres clones sont des candidats intégrants. L'analyse du génotype du clone1 et de quelques clones AmpR (clones 2, 3, 4 et 5) permettra d'infirmier ou de confirmer ces premières hypothèses.

Cette analyse génotypique des clones a été réalisée par southern blotting sur leur ADN génomique restreint par *Hind*III avec une sonde Kan et une sonde spécifique de *ctrAB*. La sonde Kan utilisée est issue d'une restriction *Bam*HI du plasmide pUC4K suivie d'une récupération du fragment Kan et d'un marquage à la fluorescéine. La sonde *ctrAB* est décrite au point III.

Trois possibilités de recombinaison homologue sont à envisager 1° une double recombinaison engendrant une délétion du gène sauvage, 2° une simple recombinaison au niveau de la séquence en aval du gène ou bien 3° dans la séquence en amont du gène. Ces trois événements schématisés aux fig III.17 et III.18 conduisent à trois types de clones recombinants: délétant, intégrant 1 ou intégrant 2. Ces schémas permettent de comprendre pourquoi des intégrants ne sont pas léthaux même si la recombinaison touche un gène essentiel: l'intégration du plasmide duplique les fragments d'ADN flanquants, il en résulte que le chromosome d'un clone intégrant contient une copie délétée de *ctrAB* et une copie sauvage de ce gène. Le profil des différents clones en southern blotting peut être prédit pour les deux sondes à partir des figures 17, 18 et 20. Par exemple, en ce qui concerne des clones résultants d'une double recombinaison la sonde Kan et la sonde *ctrAB* devraient s'hybrider aux deux mêmes fragments.

Le résultat des deux southern blotting est présenté aux figures III.21 et 22. Signalons que le clone 4 est exclu de l'analyse car la restriction de son ADN est incomplète. Dans le southern blotting réalisé avec la sonde *ctrAB* (fig III.22.) deux contrôles positifs ont été inclus: l'ADN chromosomique de la souche 16M restreint *Hind*III et l'insert ayant été utilisé pour marquer la sonde. Les deux

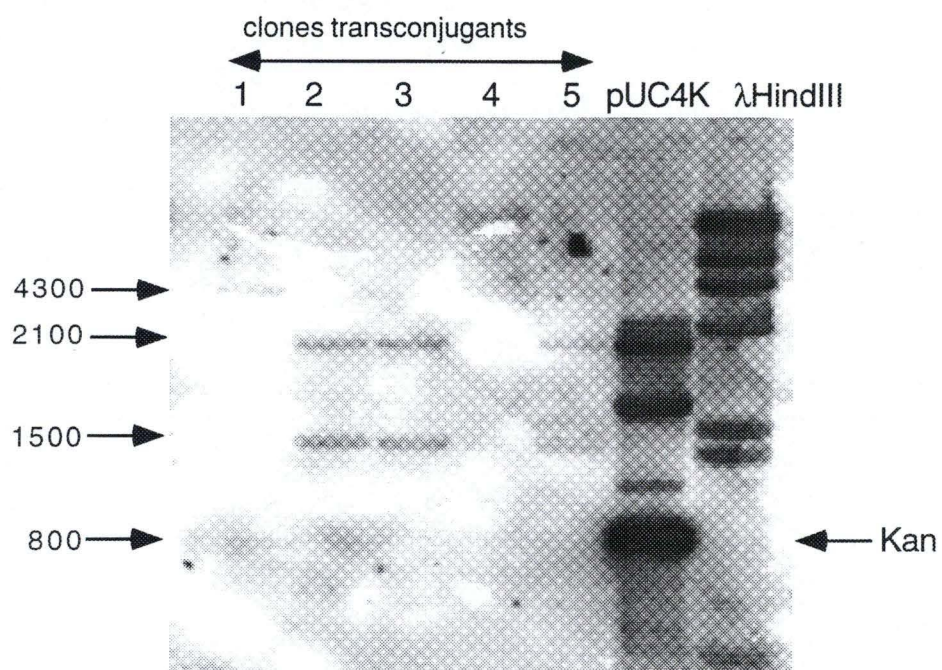


Fig.III.21: Southern blotting réalisé avec la sonde Kan.

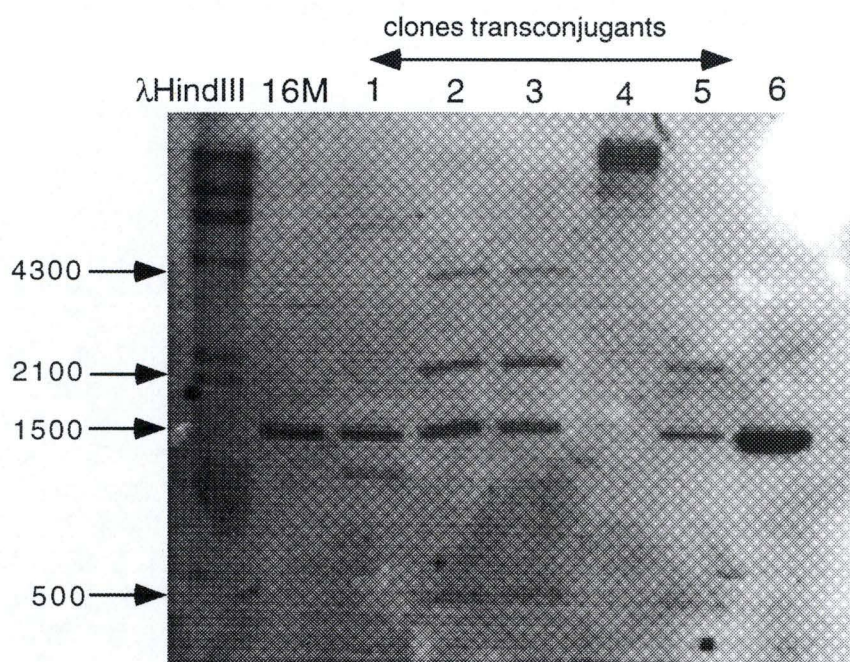


Fig.III.22 Southern blotting réalisé avec la sonde *ctraB*.

contrôles montrent que le marquage de la sonde a été efficace et que l'hybridation est spécifique. Pour le southern blot réalisé avec la sonde Kan, le contrôle positif est le plasmide pUC4K restreint par *Bam*HI (fig III.21.). Ce contrôle montre que la sonde Kan est efficacement marquée.

Comme précédemment, on constate que la sonde *ctrAB* ne s'hybride qu'à une seule bande sur l'ADN de *B. melitensis* 16M restreint par *Hind*III (fig III.22.). Pour les clones 2, 3 et 5, dans le southern avec la sonde *ctrAB* on remarque que la sonde s'hybride à 4 bandes: une bande de 4300pb (correspondant à la majeure partie du plasmide), une bande de 2100pb (a+600: le gène délété), une bande de 1500pb (b: le gène sauvage) et une bande de 500pb. Ce profil correspond au profil d'intégrant de type 1. Le profil de ces 3 clones avec la sonde Kan confirme qu'il s'agit d'intégrants de type 1. Le clone 2, malgré une croissance ralentie en présence d'ampiciline, est donc un intégrant.

L'intégrant de type 1 étant viable la copie sauvage du gène s'exprime. On en déduit que les 355pb situées en amont de cette ORF contiennent la séquence promotrice du gène *ctrAB*. Ce résultat suggère que l'insert de 1500pb contient la séquence promotrice et l'ORF de *ctrAB*.

Le profil du clone1 ne correspond à aucun des profils attendus, il ne s'agit donc pas d'un délétant. Par rapport à la souche parentale, il possède 2 bandes supplémentaires. Il résulte probablement d'une recombinaison atypique du plasmide avec le génome.

L'analyse par southern blotting du clone AmpS et de quelques clones AmpR montre que nous n'avons pas isolé de clone délété de *ctrAB* suite à la conjugaison. Ce résultat constitue donc une évidence négative du caractère essentiel du gène *ctrAB* chez *Brucella*, comme cela a été décrit pour son homologue *ctrAC* chez *C. crescentus*.

5. Mise en évidence de la protéine CtrA chez *Brucella*

Nous avons montré que le gène *ctrAB* est présent dans 4 espèces de *Brucella* et l'échec de la délétion de ce gène est un argument en faveur de son rôle essentiel à la survie de *Brucella*. Au delà des analyses de séquence et de génome, il est important d'avoir une évidence fonctionnelle concernant CtrAB. En d'autres termes, il faut montrer l'expression du gène et la synthèse de la protéine CtrA chez *Brucella*. Pour cela nous possédons un outil, un anticorps dirigé contre la protéine CtrA de *C. crescentus*. Il s'agit d'un anticorps polyclonal de lapin mis à notre disposition par le Prof. L. Shapiro du Department of Developmental Biology, Stanford University School of Medicine, U.S.A. Sur base de l'importante identité de séquence en acides aminés (80,5%) entre CtrAB et CtrAC, il est raisonnable de penser qu'un anticorps polyclonal dirigé contre CtrAC reconnaisse un ou des épitopes de CtrAB.

Le western blotting et le dotblot sont les techniques utilisées pour mettre en évidence la protéine CtrAB.

Les protéines d'un lysat bactérien sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées en présence du polysérum de lapin dirigé contre CtrAC. Un western blotting permet de déterminer la présence d'une protéine mais aussi d'estimer sa taille par comparaison à un marqueur de poids moléculaire. L'analyse en dotblot est réalisée suite au dépôt

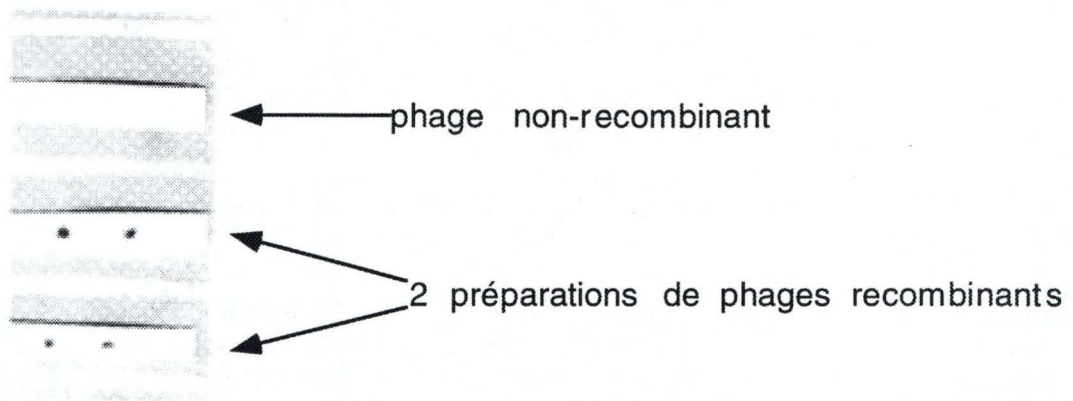


Fig.III.23: résultat du dotblot réalisé sur les phages recombinants exprimant la partie C-terminale de CtrAB et non-recombinants.

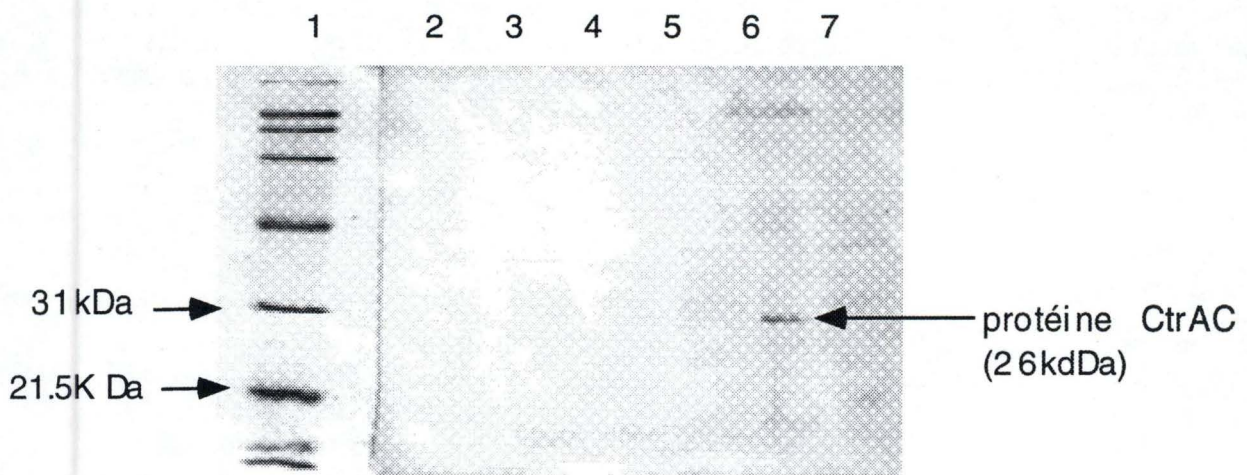


Fig.III.24: résultat du western blot réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-ctrAC sur divers échantillons protéiques.

- 1:marqueur de poids moléculaire
- 2:témoin négatif: *E coli* XI1 blue
- 3:*B.melitensis* 16M
- 4:*B.canis*
- 5:*B.neotomae*
- 6:*C.crescentus*
- 7:*E.coli* XI1-blue contenant le plasmide pSK-CtrAB

d'un lysat bactérien sur une membrane de nitrocellulose et permet donc de mettre en évidence une protéine mais ne donne aucune information sur sa taille.

Les échantillons bactériens utilisés pour ces expériences de western blotting sont les suivants. Le lysat de *C. crescentus* qui constitue le témoin positif de nos expériences a été obtenu par sonication des bactéries d'une culture liquide. Les lysats de *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 544 et des clones 1 et 3 issus de la conjugaison ont été réalisés au laboratoire. Les extraits totaux de *B. canis* RM6/66, *B. ovis* BOW63/290, *B. suis* 1330 et *B. neotomae* 5K33 ont été reçus du Dr. J.-M Verger, Laboratoire de pathologie infectieuse et immunologie, INRA-Tours, Nouzilly, France. Tous ces échantillons de *Brucella* ont été préparés par inactivation à la chaleur (2 heures à 80°C). Des extraits de deux clones d'*E. coli* XL1-blue ont été inclus dans cette analyse. Un clone ne contenait pas de plasmide et un clone contenait le plasmide pSctrab. Ce plasmide contient l'ORF du gène *ctrAB* et une séquence en amont susceptible de contenir le promoteur du gène. Les promoteurs de *Brucella* étant reconnus par la machinerie transcriptionnelle de *E. coli*, on peut supposer que la protéine CtrAB s'exprime dans ce clone (Mayfield *et al.*, 1988).

Parallèlement à notre travail, l'expression de l'extrémité C-terminale de CtrAB (domaine de liaison à l'ADN) en fusion avec la protéine PIII d'un phage filamentueux dérivé du M13 a été réalisée au laboratoire. Une préparation de ce phage recombinant est reconnue en dotblot par l'anticorps polyclonal anti-CtrAC (fig.III.23.). Cet anticorps ne reconnaît pas le phage non-recombinant. Ces deux échantillons de phage ont également été analysés par western blot.

Le résultat du western blotting indique que l'anticorps anti-CtrAC détecte une protéine de la taille attendue (environ 26 kDa) dans l'extrait de *C. crescentus* mais il ne détecte rien dans les autres échantillons (fig.III.24.). L'anticorps étant polyclonal il reconnaît différents épitopes. Une partie de ces épitopes sont communs à CtrAB et CtrAC; cela a été démontré par le résultat du dotblot sur le phage recombinant. En western blotting cet épitope ne serait pas reconnu. Il semble donc que les conditions dénaturantes de l'électrophorèse et de préparation de l'échantillon (SDS2%, 100°C 5') modifie la structure du ou des épitopes communs.

Pour vérifier ces hypothèses, une expérience préliminaire de dotblot a été réalisée avec des échantillons de *C. crescentus*, de *Brucella* (*B. melitensis* B115, *B. abortus* 45/20 et *B. ovis* Reo 198) et des bactéries *E. coli* XL1-blue soniqués ou lysés à la presse de French. Des échantillons du phage recombinant et d'un phage non-recombinant ont aussi été inclus dans cette analyse. Après révélation seuls les échantillons du phage recombinant et de *C. crescentus* sont détectés par l'anticorps anti-CtrAC.

Ces résultats en dot blot et western blot ne sont pas simples à interpréter. L'identité de séquence de 80% entre les séquences de CtrAB et CtrAC nous a laissé supposer des réactions antigéniques croisées entre ces 2 protéines. Cette réaction croisée a été mise en évidence sur la partie C-terminale de la protéine par dotblot sur le phage recombinant.

Cependant, en western blotting à deux reprises nous n'avons pas pu détecter la présence de CtrAB chez les différentes espèces de *Brucella*. Nous émettons deux hypothèses pour expliquer ce résultat. Il est possible que le gène

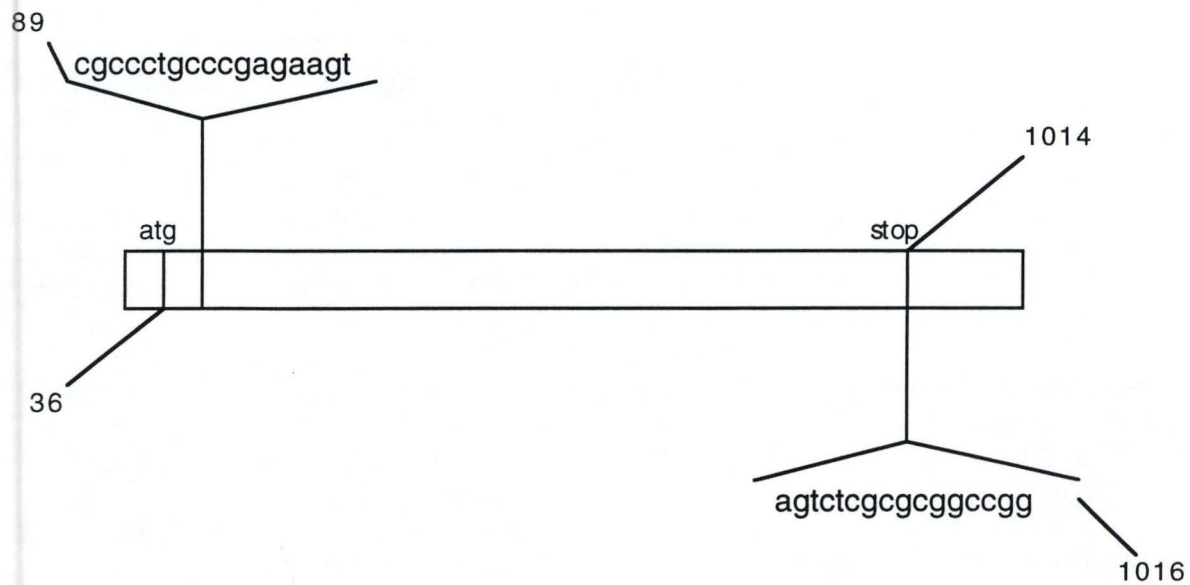


Fig.III.25: Représentation schématique du gène *ccrM* et des oligonucléotides définis sur sa séquence. Les chiffres représentent la position en pb.

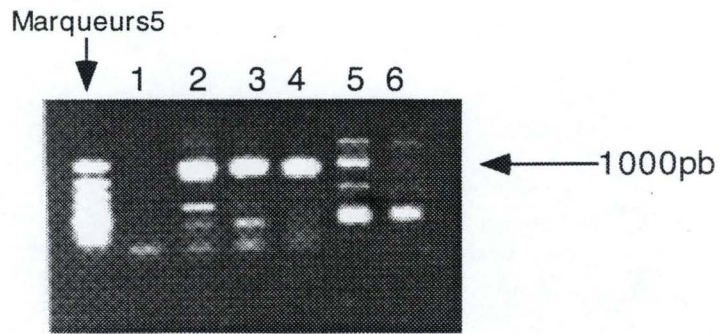


Fig.III.26: Analyse en gel d'agarose 1,2% des amplifications PCR avec les amorces *ccrM*.

1:H₂O

2,3 et 4 1µl, 5µl et 10µl de suspension de *C.crescentus*

5:*B.melitensis* 16M

6:*B.abortus* 544

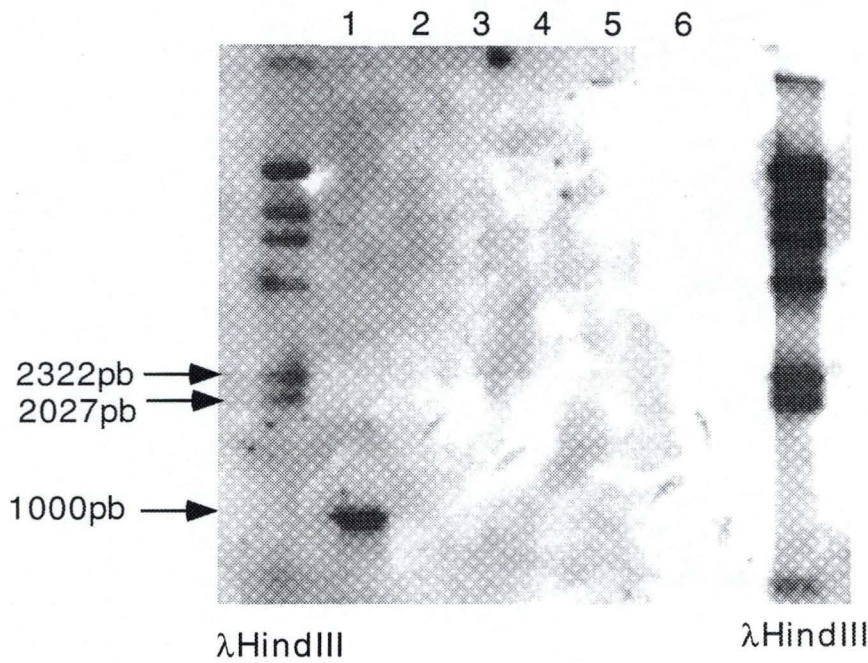


Fig.III.27: Résultat du southern blotting réalisé avec la sonde *ccrM* de *C.crescentus*.

- 1:PCR de *C. crescentus*
- 2:*B. melitensis* 16M restreint *HindIII*
- 3:*B. abortus* 544 restreint *HindIII*
- 4:*B. melitensis* 16M restreint *EcorV*
- 5:*B. Abortus* 544 restreint *EcorV*
- 6: Pcr sur *B. melitensis* 16M

ctrAB ne s'exprime pas dans les conditions de culture utilisées pour *Brucella*. Dans la seconde hypothèse, qui paraît plus plausible, les épitopes communs à CtrAB et CtrAC seraient sensibles à la dénaturation (due au SDS ou à l'inactivation des bactéries par la chaleur). Le gène *ctrA* s'exprime toujours à un taux basal chez *C. crescentus* au cours du cycle cellulaire. Cette observation est un argument renforçant la seconde hypothèse. Même si l'expression de *ctrA* chez *Brucella* était interrompue à un moment du cycle, nos cultures de *Brucella* n'étant pas synchrones, une partie des bactéries de la culture exprimerait le gène.

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour vérifier l'effet de la dénaturation sur la reconnaissance de CtrAB par l'anticorps anti-CtrAC.

6. Tentative de détection du gène *ccrM* chez *Brucella*

Chez *C. crescentus*, le gène *ctrAC* régule positivement l'expression des gènes de classe II, du promoteur *HempS* et du gène *ccrM*. Le gène *ccrM* encode une ADNméthyltransférase. La présence du gène *ccrM* a été mise en évidence par southern blotting chez différents genres de la famille des α -protéobactériacées mais n'a pas été étudiée chez *Brucella* (Stephens, 1996).

L'amplification par PCR est la technique choisie pour mettre en évidence ce gène et le cloner chez *Brucella*. Deux amorces PCR complémentaires de la séquence codante de *ccrM* de *C. crescentus* ont été définies et synthétisées (Fig.III.25.).

Les amplifications par PCR sont réalisées sur des bactéries entières de *C. crescentus* et leur ADN est libéré au cours de la première dénaturation (5 minutes à 95°C). Les PCR sont réalisées à partir de trois volumes différents de suspension de *C. crescentus*. Un dixième du mélange de réaction a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose. Une bande d'environ 1kb est visible; elle correspond à la taille attendue sur la séquence de *ccrM*(fig.III.26.). Les autres bandes moins intenses sont probablement dues à des hybridations aspécifiques.

Une amplification PCR a aussi été réalisée sur environ 1 μ g d'ADN génomique de *B. melitensis* 16M et de *B. abortus* 544. Les amorces n'étant pas dégénérées, l'amplification spécifique d'un gène était peu probable. En analysant un dixième des mélanges PCR, nous avons constaté l'amplification de plusieurs fragments.

Le fragment amplifié à partir de *C. crescentus* a été séquencé par séquençage automatique. Ce fragment s'est révélé être la portion attendue de l'ORF du gène *ccrM*.

A partir des amplifications réalisées sur l'ADN de *Brucella*, nous avons récupéré du gel la bande dont la taille correspond à celle amplifiée chez *C. crescentus*. Une réaction de séquençage a été réalisée sur ce matériel. Les séquences obtenues sont inutilisables.

Une tentative de mise en évidence du gène *ccrM* chez *B. melitensis* a été réalisée par Southern blotting. La sonde utilisée est le fragment du gène amplifié chez *C. crescentus*. Cette sonde étant hétérologue, les conditions d'hybridation et de lavage sont très peu stringentes (42°C et une concentration en SSC

supérieure à 2X). Le résultat de ce southern blot montre que la sonde est efficacement marquée puisqu'elle s'hybride au contrôle positif (le fragment utilisé pour le marquage). Néanmoins, dans les conditions appliquées, on ne détecte aucune hybridation de la sonde *ccrM* sur l'ADN de *Brucella*.

Des expériences supplémentaires, en diminuant la stringence de l'hybridation et des lavages, pourront éventuellement permettre la mise en évidence du gène *ccrM* par southern blot avec la sonde hétérologue et le criblage de la banque génomique. Comme seconde approche, la définition d'amorces dégénérées à partir de la séquence de *ccrM* peut aussi être envisagée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV. CONCLUSIONS

L'objectif de ce mémoire était de cloner chez *Brucella* un régulateur d'un système à deux composants et de le caractériser. Nous avons cloné un gène encodant un régulateur chez *Brucella*. La séquence de ce gène est très similaire à celle du gène *ctrA* de *C. crescentus* (80.5% d'identité entre les deux séquences protéiques).

La présence de ce gène chez 4 espèces de *Brucella* a été démontrée par des expériences de Southern blotting. Nous n'avons pas détecté de polymorphisme de fragments de restriction de la région chromosomique contenant ce gène. Le séquençage de *ctrAB*, réalisé par une autre équipe sur *B. suis* révèle 100% d'identité nucléotidique avec le gène de *B. abortus* (E. Mercier, communication personnelle). Ces 3 éléments expérimentaux et la comparaison des séquences protéiques entre *ctrAB* et *ctrAC* démontrent que le régulateur CtrA est très conservé au cours de l'évolution et suggère qu'il assume une fonction importante.

Le gène CtrA étant essentiel chez *C. crescentus.*, une expérience de délétion par remplacement de gène a été réalisée chez *B. melitensis*. Le fait que nous n'ayons pas isolé de délétant est une évidence négative du rôle essentiel de ce gène chez *Brucella*.

Après avoir caractérisé le gène, nous avons essayé de mettre en évidence la protéine. Nous disposons d'un anticorps polyclonal anti-CtrAC et du domaine effecteur de CtrAB exprimé à la surface d'un phage filamenteux. En utilisant cet anticorps polyclonal anti-CtrAC, nous n'avons pas détecté la protéine dans les lysats de *Brucella*. Cependant, nos résultats suggèrent que le gène est essentiel; il est donc plus que probable que la protéine s'exprime. Les conditions expérimentales de détection de la protéine CtrAB sont donc remises en cause autant plus que le phage portant le domaine N-terminal de CtrAB est reconnu en dotblot par l'anticorps polyclonal. L'inactivation des bactéries à la chaleur et/ou les conditions d'électrophorèse pourraient dénaturer les épitopes conservés entre les protéines CtrAB et CtrAC.

Le gène *ccrM* encodant une ADN méthyltransférase est régulé par CtrAC a été détecté par southern blotting chez plusieurs espèces de la famille des α -

Protéobactériacées. Nous avons amplifié chez *C. crescentus* une partie de l'ORF de *ccrM*. En utilisant ce fragment comme sonde, dans une expérience préliminaire de southern blotting, nous n'avons pas détecté le gène *ccrM* chez *Brucella*. Le gène *ccrM* de *Brucella* a été cloné par l'équipe de L. Shapiro (communication personnelle).

Dans les promoteurs de gènes régulés par CtrA chez *C. crescentus* Quon K. et al (1996) ont mis en évidence une séquence consensus (TTAA-N7-TTAAC) (localisée entre les positions -20 et -40). Plusieurs nucléotides de ce consensus sont essentiels à la transcription de ces gènes. De tels éléments ont été mis en évidence dans la séquence de *ctrAB* et de *ccrM* de *Brucella* suggérant que ces 2 gènes seraient régulés par CtrA chez *Brucella* également.

Le senseur auquel répond le régulateur CtrA ou le phosphorelais qui lui transmet l'interaction n'a pas encore été identifié chez *C. crescentus*. Mais l'hypothèse a été avancée que CtrA interagit avec les composants du réseau de transduction du signal DivJ et PleC (histidines kinases senseurs) et DivK (régulateur dépourvu de domaine effecteur) qui contrôle la division cellulaire et le développement. Chez *Brucella*, les gènes *pleC* et *divK* ont été clonés au laboratoire. La présence de ces 2 gènes et de *ctrAB* suggère que tout le schéma de transduction du signal pourrait être transposable de *C. crescentus* à *Brucella*. Cette dernière constatation ouvre des interrogations : quelles sont les stimuli que ce système intègre et quelles sont les changements physiologiques qu'il régule?

V. PERSPECTIVES

Afin de démontrer que le gène *ctrAB* s'exprime et donc que la protéine CtrAB est synthétisée par *Brucella*, l'anticorps anti-ctrAC ainsi qu'un anticorps polyclonal produit au laboratoire et dirigé contre le domaine effecteur de CtrAB seront utilisés en western blotting en condition moins dénaturantes et en évitant le traitement à la chaleur des *Brucella*.

De plus une expérience de fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *ctrAB* et un gène rapporteur *lacZ* ou le gène encodant la GFP (green fluorescence protein) est en cours. Pratiquement, cette expérience est réalisée en clonant les 300pb (situées avant l'ORF et prédites comme région promotrice) en amont du gène rapporteur sur un plasmide incapable de se répliquer chez *Brucella*. Après mobilisation de ce plasmide chez *Brucella* on sélectionne les clones de *Brucella* ayant intégré le plasmide par recombinaison homologue entre la séquence promotrice et sa copie chromosomique. L'expression du gène reporter est étudiée chez ces intégrants in vitro sur milieu bactériologique ou in vivo suite à l'infection de macrophages.

Des expériences de caractérisation fonctionnelle du régulateur CtrAB seront réalisées. D'une part, il s'agit de démontrer que ce régulateur est phosphorylé (incorporation de phosphate radioactif), que la phosphorylation est essentielle à sa fonction (mutagenèse sur le résidu cible) et que cette phosphorylation influence la fonction régulatrice.

Un argument majeur peut aussi être obtenu par complémentation. En effet, des mutants conditionnels du gène *ctrA* sont disponibles chez *C. crescentus*. On peut supposer que le gène *ctrAB* de *Brucella* complétera les mutants de *ctrAC* aux conditions non-permissives. Il est également envisageable à long terme d'isoler un mutant conditionnel de *ctrA* chez *Brucella*.

Un autre aspect intéressant consiste à identifier les gènes régulés par CtrA chez *Brucella*. Les gènes *ccrM* et *ctrA* clonés chez *Brucella* possèdent les séquences consensus reconnues par CtrA chez *Caulobacter*. Ils constituent donc des candidats intéressants. De plus, une approche d'identification sans a priori des promoteurs régulés par CtrAB est en cours dans *E. coli*.

L'identification des partenaires de CtrA dans le schéma de transduction du signal doit aussi être envisagée. Après surexpression et purification de CtrA et d'un de ses partenaires amonts potentiels, leurs interactions pourront être appréhendées *in vitro* (transfert de phosphate). La modélisation de la structure tridimensionnelle des partenaires permettra d'étudier leur interaction au niveau moléculaire.

Lorsque les acteurs du système seront identifiés le rôle de CtrA dans la physiologie cellulaire sera clairement établi. Il subsistera cependant une question importante: le système de transduction du signal impliquant CtrA chez *Brucella* n'est-il pas un phosphorelais impliqué dans la virulence? La notion de phosphorelais sous-entend un schéma de transduction plus complexe intégrant plusieurs stimuli et donnant lieu à une réponse physiologique de grande importance. Ce phosphorelais pourrait être impliqué dans la régulation des gènes de virulence lorsque la bactérie interagit avec son hôte.

BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

- S-I. Aizawa** (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 19: 1-5
- A. Allardet-Servent, G. Bourg, M. Ramuz, M. Pages, M. Bellis and G. Roizes** (1988) DNA polymorphism in Strains of the Genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 170:4603-4607.
- G. G. Alton, L. M. Jones, R.D. Angus and J. M. Verger** (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, INRA.
- C. D. Amsler and P. Matsurama** (1995) Chemotactic Signal Transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. in *Two-component signal transduction*, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, Washington, American Society for Microbiology.
- D. Burbulys, K. A. Trach and J. A. Hoch** (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64:545-552.
- C. Chang and E. M. Meyerowitz** (1993) Eukaryotes have "two-component" signal transducers. *12th forum in microbiology*, 481-486.
- J. Darnell, L. Harvey and D. Baltimore** (1993) Synthèse de l'ARN et contrôle des gènes chez les procaryotes. in *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck université.
- J. De Ley, W. Mannheim, P. Segers, A. Lievens, M. Denijn, M. Vanhoucke and M. Gillis** (1987) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC groups Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37:35-42.
- N. Delihias** (1995) Regulation of gene expression by *trans*-encoded antisense RNAs. *Molecular Microbiology*, 15:411-414.
- I. J. Domian, K. C. Quon and L. Shapiro** (1996) The control of temporal and spatial organization during the *Caulobacter* cell cycle. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6:538-544.
- M. Dziejman and J. J. Mekalanos** (1995) Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. in *Two-component signal transduction*, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, Washington, American Society for Microbiology.
- D. R. Ewalt, J. B. Payeur, B. M. Martin, D. R. Cummins and G. W. Miller** (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6:448-452.
- B. Garin-Bastudji** (1995) Brucelloses bovine, caprine, ovine et porcines: situation épidémiologique en Europe. EAAP annual meeting, Prague.
- J. W. Gober and M. V. Marques** (1995) Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiological reviews*, 59:31-47.
- S. M. Halling, P. G. Detilleux, F. M. Tatum, B. A. Judge and J. E. Mayfield** (1991) Deletion of the BCSP31 Gene of *Brucella abortus* by Replacement. *Infection and Immunity*, 59:3863-3868.
- C. F. Higgins** (1992) Protein H-NS (H1a), Chromatin Structure, and Gene expression. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 6:67-81.
- A. Ishihama** (1993) Protein-protein communication within the transcription apparatus. *Journal of Bacteriology*, 175:2483-2489.
- T. Lane, A. Benson, G. B. Hecht, G. J. Burton and A. Newton** (1995) Switches and signal transduction networks in the *Caulobacter crescentus* cell cycle. in *Two-component signal transduction*, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, Washington, American Society for Microbiology.
- B. Lewin** (1994) in *Gene V*, Oxford University Press, Oxford.

- R. M. Macnab** (1996) Flagella and motility. in *Escherichia coli* and *Salmonella*, Volume 1, F. C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington
- T. Maeda, S. M. Wurgler-Murphy and H. Saito** (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369:242-245.
- J. E. Mayfield, B. J. Bricker, H. Godfrey, R. M. Crosby, D. J. Knight, S. M. Halling, D. Balinsky and L. B. Tabatabai** (1988) The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*, 63:1-9.
- F. X. Meslin** (1993) WHO plans renewed attack on animal disease that threatens millions of people. WHO
- S. Michaux, J. Paillisson, M.-J. Carle-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent and M. Ramuz** (1993) Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology*, 175:701-705.
- T. Mizuno, M.-Y. Chou and M. Inouye** (1984) A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1966-1970.
- E. Moreno, E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch and H. Mayer** (1990) *Brucella abortus* 16sRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 172:3569-3576.
- F. C. Neidhardt, J. L. Ingham and M. Schaetchter** (1990) in *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer associates, Inc. Publishers.
- A. Newton and N. Ohta** (1990) Regulation of the cell division cycle and differentiation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44:689-719.
- N. Ohta, T. Lane, E. G. Ninfa, J. M. Sommer and A. Newton** (1992) A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10297-10301.
- N. Ohta and A. Newton** (1996) Signal transduction in the cell cycle regulation of *Caulobacter* differentiation. *T in microb*, 4:326-332.
- T. A. Owen-Hughes, G. D. Pavitt, D. S. Santos, J. M. Sidebotham, C. S. J. Hulton, J. C. D. Hinton and C. F. Higgins** (1992) The Chromatin-Associated Protein H-NS Interacts with Curved DNA to Influence DNA Topology and Gene Expression. *Cell*, 71:255-265.
- J. S. Parkinson and E. C. Kofoid** (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual review genetic*, 26:71-112.
- K. C. Quon, G. T. Marczyński and L. Shapiro** (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, 84:83-93.
- F. Sanger, S. Nichlen and A. R. Coulson** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467.
- R. Schleif** (1988) DNA looping. *Science*, 240:127-128.
- L. Smih and T. A. Ficht** (1990) Pathogenesis of *Brucella*. *Microbiology*, 17:209-229.
- C. M. Stephens, G. Zweiger and L. Shapiro** (1995) Coordinate cell cycle control of a *Caulobacter* DNA methyltransferase and the flagellar genetic hierarchy. *Journal of Bacteriology*, 177:1662-9.
- C. Stephens, A. Reisenauer, R. Wright and L. Shapiro** (1996) A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1210-1214.

- J. B. Stock, A. M. Stock and J. M. Mottonen** (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature*, 344:395-400.
- J. B. Stock, M. G. Surette, M. Levit and P. Park** (1995) Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis. in *Two-component signal transduction*, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, Washington, American Society for Microbiology.
- R. V. Swanson, L. A. Alex and M. I. Simon** (1994) Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *TIBS*, 19:485-490.
- I. Tatsuno, M. Homma, K. Oosawa and I. Kawagishi** (1996) Signaling by the *Escherichia coli* aspartate chemoreceptor Tar with a single cytoplasmic domain per dimer. *Science*, 274:423-425.
- A. Thomas, G. D. P. Owen-Hugues, D. S. Santos, J. M. Sidebotham, C. S. J. Hulton, J. C. D. Hinton and C. F. Higgins** (1992) The chromatine-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell*, 71:255-265.
- A. Tibor, V. Weynants, P. Denoel, B. Lichtfouse, X. De Bolle, J. N. Limet and J.-J. Letesson** (1994) Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. *Infection and Immunity*, 62:3633-3639.
- D. W. Ussery, J. C. D. Hinton, B. J. A. M. Jordi, P. E. Granum, A. Seirafi, R. J. Stephen, A. E. Tupper, G. Berridge, J. M. Sidebotham and C. F. Higgins** (1994) The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie*, 76:968-980.
- J. M. Verger, F. Grimont and P. A. D. Grimont** (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35:292-295.
- J. M. Verger** (1993) Le point sur la brucellose: dépistage et prophylaxie. *le point vétérinaire*, 25:1-37.
- K. Volz** (1993) Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry*, 32:11741-11753.
- K. Volz** (1995) Structural and functional conservation in response regulators. in *Two-component signal transduction*, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, Washington, American Society for Microbiology.
- S. P. Wang, P. L. Sharma, P. V. Schoenlein and B. Ely** (1993) A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:630-634.
- J. A. Wingrove and J. W. Gober** (1996) Identification of an asymmetrically localized sensor histidine kinase responsible for temporally and spatially regulated transcription. *Science*, 274:597-601.
- C.-C. Zhang** (1996) Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *molmicrobiol*, 20:9-15.