

Etude moléculaire de la bactérie intracellulaire féminisante Wolbachia chez Armadillidium vulgare (crustacé isopode terrestre)

Christine Felix

▶ **To cite this version:**

Christine Felix. Etude moléculaire de la bactérie intracellulaire féminisante Wolbachia chez Armadillidium vulgare (crustacé isopode terrestre). Interactions entre organismes. Université de Poitiers, 2004. Français. NNT : . tel-00011718v2

HAL Id: tel-00011718

https://theses.hal.science/tel-00011718v2

Submitted on 6 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

FACULTÉ DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

(Diplôme National : arrêté du 25 avril 2002)

Ecole Doctorale : Ingénierie Chimique, Biologique et Géologique

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

PRESENTÉE PAR

Christine FELIX

Etude moléculaire de la bactérie intracellulaire féminisante *Wolbachia* chez *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode terrestre)

Directeurs de thèse : Docteur Gilbert Martin
Docteur Pierre Grève

Soutenue le 26 Mars 2004
devant la Commission d'Examen

JURY

Kostas BOURTZIS	Assistant Professeur, Université de Ioannina, GRECE	*Rapporteur*
David O'CALLAGHAN	Directeur de Recherche, INSERM U-431, NIMES	*Rapporteur*
Thierry BERGES	Professeur, Université de POITIERS	*Examinateur*
Jean-Louis DACHEUX	Directeur de Recherche, CNRS 6073, NOUZILLY	*Examinateur*
Pierre GRÈVE	Maître de Conférences, Université de POITIERS	*Examinateur*
Gilbert MARTIN	Directeur de Recherche, CNRS UMR 6556, POITIERS	*Examinateur*

INVITE

Julian REYNOLDS	Senior Lecturer in Biology, Université de DUBLIN

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Gilbert Martin, Directeur de recherche CNRS, pour avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, et pour avoir encadré mes travaux de thèses pendant ces trois années. Il a su me montrer sa vision de la recherche, son enthousiasme et sa passion pour la biologie.

Je souhaite également adresser de très grands remerciements à Pierre Grève. Je tiens à lui faire savoir que ces trois années de recherche ont été, à ses côtés, d'une très grande richesse. Il a toujours su me prodiguer de judicieux conseils, et m'écouter en retour, et son soutien permanent m'a permis de progresser jour après jour. Sa bonne humeur quotidienne et son tact ont su me faire oublier son côté perfectionniste dans les corrections infernales! Merci Pierre.

J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes du contrat européen *Euwol* et notamment un merci tout particulier au coordinateur de ce contrat, Kostas Bourtzis pour m'avoir accueillie à deux reprises dans son laboratoire à l'institut de biologie moléculaire et biotechnologie à Héraklion, en Grèce. Il a grandement participé, ainsi que Jacques et Anastasia, à ce que mes séjours restent un très bon souvenir et je n'oublie pas les discussions très enrichissantes que nous avons eu. Je le remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux. Je lui exprime une profonde gratitude pour l'intérêt qu'il porte à ces recherches.

Je tiens également à remercier ici Henk Braig pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de biologie moléculaire et microbiologie à Bangor, au Pays de Galles. Les semaines passées là-bas furent très agréables grâce à lui et aux autres personnes présentes dans ce laboratoire, je pense à Alexandra et Stefanos.

Je remercie très sincèrement David O'Callaghan pour avoir accepté sans hésitation à être rapporteur de cette thèse, et pour m'avoir permis de présenter mes travaux lors du congrès « Biology of Type IV Secretion Processes ». Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour l'intérêt certain qu'il montre pour *Wolbachia,* cela a représenté pour moi une très grande source de motivation.

Enfin, merci à Jean-Louis Dacheux et Thierry Bergès d'avoir accepté de faire partie du jury et de consacrer un peu de leur temps pour juger la qualité de ce travail.

Merci aux personnes du service de microbiologie du CHU de Poitiers, et notamment à Christian Bernard et au Pr. Fauchère, pour m'avoir permis, dans les premiers mois de ma thèse, d'utiliser leur équipement d'électrophorèse en champ pulsé.

Merci à Maryline, Catherine et Carine pour leur précieuse aide technique et pour les nombreuses dissections qu'elles ont faites avec moi, sans elles, j'y serais probablement encore ! Qu'elles sachent que j'ai vraiment apprécié leur soutien permanent et leur compagnie. Merci également à Bob, pour l'entretien des élevages et les nombreux croisements dont il a eu la charge.

Je ne saurais jamais remercié suffisamment tous les membres du laboratoire pour m'avoir accueillie de façon si conviviale et ouverte. J'ai passé de très bons moments en leur compagnie, et merci à chacun personnellement pour les nombreux services rendus et les « à côté » du labo, Yves (merci pour l'informatique !), Roland, Didier, Isabelle, Catherine, Monique, Lydia, Fred, et tout spécialement à ma chère Christine, je n'oublierai pas qu'elle a toujours été présente pour moi.

Je n'oublie pas tous les étudiants de 3ème cycle, présents ou passés, mille merci à Juline, pour tellement de choses que je ne pourrai les énumérer toutes ici, Eric, Jérôme, les deux Nico, Marie-Cécile, Sébastien, Carmen…J'ai passé de très bonnes années en votre compagnie.

Que Delphine, Jérôme, Claire, Manil, Laurence, Alicia, Anne, Stéphanie, Var, Gail, Olivier et tous les autres soient assurés de mes plus sincères pensées. Je vous suis très reconnaissante de l'amitié que vous me portez. L'énumération de toutes les personnes qui ont contribué à me faire passer de merveilleux moments depuis de nombreuses années serait trop longue mais je pense que chacun se reconnaîtra. Je vous remercie pour votre joie de vivre, votre bonne humeur qui ont su me permettre de trouver un équilibre essentiel à la conduite de cette thèse.

Ma dernière pensée ira à ma mère et Stéphane, à Mathieu ainsi qu'à ma famille pour le soutien moral et la confiance qu'ils m'ont accordés, même si j'ai oublié de leur consacrer un peu de mon temps. Je tiens à les remercier du fond du cœur. Qu'ils reçoivent, ici, ma profonde gratitude ainsi que tout mon amour.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

SIGLES ET ACRONYMES

***

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNr : ADN ribosomal
AEBSF : 4-(2-AminoEthyl)-Benzene-Sulfonyl Fluoride
AIH : Androgenic Inhibiting Hormone
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomal
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
BET : bromure d'éthidium
BSA : Bovine Serum Albumine
CHH : Crustacean Hyperglycemic Hormone
CTAB : Hexa-decyl-Trimethyl-ammonium bromide
dATP : désoxyadénosine-5'-triphosphate
dCTP : désoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP : désoxyguanidine-5'-triphosphate
dTTP : désoxythymidine-5'-triphosphate
DMSO : diméthylsulfoxide
dNTP : désoxynucléotide-5'-triphosphate
DO : densité optique
DTT : Dithitréitol
EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique
♀A : Femelle de lignée Amphogène, lignée non infestée par *Wolbachia*
♀F : Femelle de lignée thélygène, lignée infestée par *Wolbachia*
F : Féminisation
GA : Glande Androgène
GAH : Glande Androgène Hypertrophiée
GAN : Glande Androgène Normale
HA : Hormone Androgène
HEPES : N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonate])
IC : Incompatibilité Cytoplasmique
kb : kilobases
kDa : kiloDaltons
L/D : "Light/Dark" (cycle de lumière/obscurité)
LMP **:** Low melting Point
LR PCR : Long-Range PCR
Mb : Megabase
ORF : Open Reading Frame
pb : paires de bases
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : "polymerase chain reaction" (réaction de polymérisation en chaîne)
PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluoride
RT : "Reverse Transcription" (transcription inverse de l'ARN)
SDS : sodium dodécyl sulphate
SSC : solution saline citratée
TAE : tampon Tris, Acetate, EDTA
TBE : tampon Tris, Borate, EDTA
TE : tampon Tris, EDTA
TRIS : Tris[hydroxyméthyl]amino- méthane
VIH : Vitellogenesis Inhibiting Hormone
***w*KueYo** : *Wolbachia* symbiote de *Ephestia kuehniella* (Yokohama strain)
***w*Mel** : *Wolbachia* symbiote de *Drosophila melanogaster*
***w*No** : *Wolbachia* symbiote de *Drosophila simulans* Nouméa
***w*Ri** : *Wolbachia* symbiote de *Drosophila simulans* Riverside
***w*Tai** : *Wolbachia* symbiote *Teleogryllus taiwanemma*
***w*Uni** : *Wolbachia* symbiote de *Muscidifurax uniraptor*
***w*Vul** : *Wolbachia* symbiote de *Armadillidium vulgare*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

SOMMAIRE

AVANT PROPOS 1

INTRODUCTION 2

1. *Wolbachia* 2
1.1 Généralités 2
1.2 Description morphologique et localisation 4
1.3 Effets sur la reproduction 6
1.3.1 L'incompatibilité cytoplasmique (IC) 7
1.3.2 La parthénogenèse thélytoque 9
1.3.3 La mort des mâles ou « male-killing » 10
1.3.4 Effet sur l'ovogenèse 11
1.3.5 Féminisation 11
1.3.5.1 Généralités 11
1.3.5.2 Féminisation chez les isopodes terrestres 11

2. La différenciation sexuelle chez les Crustacés Isopodes terrestres et données expérimentales du phénomène de féminisation par *Wolbachia* 13

3. Application potentielle de *Wolbachia* 15

4. Données moléculaires concernant le phénomène de féminisation par *Wolbachia* 16

CHAPITRE I 21

1. INTRODUCTION 21

2. MATERIELS ET METHODES 25
2.1 Animaux 25
2.2 Long Range PCR 26
2.2.1 Extraction d'ADN 26
2.2.2 Choix des amorces 26
2.2.3 Réactions d'amplification (LR PCR) 27
2.2.4 Analyse des produits d'amplification 27
2.3 Caractérisation du chromosome bactérien 27
2.3.1 Matériel biologique 27
2.3.2 Isolement des bactéries 28
2.3.3 Préparation des échantillons pour l'électrophorèse en champ pulsé 29
2.3.4 Digestion de l'ADN bactérien 29
2.3.5 Electrophorèse en champ pulsé 30
2.3.6 Southern blot et hybridation 30
2.3.6.1 Transfert d'ADN sur membrane de Nylon® 30
2.3.6.2 Marquage radioactif de sondes 31

2.3.6.3 Hybridation 32
2.4 Banque d'ADN bactérien 32
2.4.1 Extraction d'ADN à partir du gel de champ pulsé 33
2.4.2 Shot-gun Library 33

3. RESULTATS 34
3.1 Long-Range PCR 34
3.2 Purification de l'ADN bactérien de *w*Vul 38
3.2.1 Adaptation du protocole expérimental 38
3.2.2 Caractérisation du génome bactérien de *w*Vul 46
3.2.2.1 Digestion par les endonucléases de restriction *ApaI* et *AscI* 46
3.2.2.2 Digestion par les endonucléases de restriction *FseI*, *I-CeuI* et *SmaI* 46
3.2.2.3 Taille du génome de *w*Vul 49
3.3 Banque d'ADN bactérien 51

4. DISCUSSION 51

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 57

CHAPITRE II 59

1. INTRODUCTION 59

2. Matériels et méthodes 63
2.1 Animaux 63
2.2 Extraction d'ADN 64
2.3 Choix des amorces 64
2.4 PCR 65
2.5 Séquençage 65
2.6 Extraction d'ARN 66
2.7 RT-PCR 66
2.8 Southern blot et hybridation 68

3. RESULTATS 68
3.1 Identification du gène *virD4* 68
3.2 Identification des opérons *virB8-D4* et *virB3-B6* 70
3.3 Identification des gènes en amont de l'opéron *virB8-D4* 71
3.4 Analyse transcriptionnelle des gènes *virB* et *virD* (*w*Vul) dans les ovocytes d'*Armadillidium vulgare* 74
3.5 Analyse transcriptionnelle des gènes *virB* et *virD* dans les hémocytes de *w*Vul 76
3.6 Analyse des protéines codées par les gènes *vir* 78

4. DISCUSSION 80

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 88

CHAPITRE III 90

1. INTRODUCTION 90

2. MATERIELS ET METHODES 94
2.1 Animaux 94
2.2 Prélèvement des tissus 94

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.2.1 Isolement des hémocytes à partir de l'hémolymphe 94
2.2.2 Prélèvement des glandes androgènes 94
2.2.3 Prélèvement des ovaires 95
2.3 Extraction protéique 95
2.4 Electrophorèse unidimensionnelle 95
2.5 Electrophorèse bidimensionnelle 96
2.5.1 Solubilisation des protéines 96
2.5.2 Dosage des protéines 96
2.5.2.1 Préparation de la gamme étalon 96
2.5.2.2 Dosage des échantillons protéiques 97
2.5.3 Réhydratation 97
2.5.4 Focalisation isoélectrique (IEF) 99
2.5.5 Equilibration 99
2.5.6 Deuxième dimension : électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 100
2.5.6.1 Généralités 100
2.5.6.2 Migration 101
2.5.7 Coloration des gels 101
2.5.7.1 Coloration au nitrate d'argent 101
2.5.7.2 Coloration au bleu de Coomassie 102
2.6 Differential Gel Electrophoresis: DIGE 102
2.6.1 Préparation des échantillons 102
2.6.2 Marquage des échantillons 103
2.6.3 Première dimension, préparation des strips 104
2.6.4 Deuxième dimension 104
2.6.5 Détection des protéines fluorescentes 105
2.7 Analyse des gels 105
2.8 Analyse des spots d'interêt 105
2.8.1 Traitement et analyses des données 105

3. RESULTATS 106
3.1 Gel d'électrophorèse 1 Dimension 106
3.2 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle 108
3.2.1 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques d'ovaires 108
3.2.2 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes 110
3.2.3 Gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines d'hémolymphe 113
3.3 « Difference gel electrophoresis » ou DIGE 113
3.3.1 DIGE de protéines cytoplasmiques d'ovaires 113
3.3.2 DIGE de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes 116
3.3.3 DIGE de protéines cytoplasmiques d'hémolymphe 117
3.4 Microséquençage 120
3.4.1 Protéines cytoplasmiques d'ovaires 120
3.4.2 Protéines de glandes androgènes 122
3.4.3 Protéines d'hémolymphe 126

4. DISCUSSION 127

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....131

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....133

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……..135

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

AVANT PROPOS

***

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, et financés par le contrat européen Euwol, European Wolbachia Project «Vers de nouvelles approches pour le contrôle des arthropodes nuisibles et bénéfiques par une bactérie endosymbiotique ». Huit équipes de chercheurs européens collaborent ensemble à ce projet, dont le laboratoire de Poitiers. Wolbachia est en effet le symbiote intracellulaire le plus abondant et le plus répandu décrit jusqu'à ce jour. Cette bactérie est capable d'envahir et de se maintenir chez de nombreux arthropodes en induisant des altérations de la reproduction chez son hôte. Le but du projet européen est d'identifier les gènes bactériens et les gènes de l'hôte impliqués dans l'induction par Wolbachia de trois manipulations de la reproduction : la parthénogenèse, la féminisation et l'incompatibilité cytoplasmique, et ceci par des approches intégrées de génomique, protéomique et post-génomique. Notre implication dans le contrat européen est de progresser, par ces différentes approches, dans la connaissance du mécanisme mis en place lors du processus de féminisation chez le crustacé terrestre Armadillidium vulgare.

Les travaux présentés dans ce mémoire constituent donc les recherches préliminaires et novatrices de la biologie moléculaire de la féminisation, et ouvrent la voie vers de nombreux autres axes de recherche.

L'identification des gènes impliqués dans la manipulation de la reproduction sera une avancée majeure vers leur utilisation dans les domaines appliqués, tels que le contrôle des arthropodes nuisibles à l'agriculture, ou ceux vecteurs de maladie, ou bien encore le contrôle en faveur des arthropodes bénéfiques.

***

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

INTRODUCTION

***

Les associations telles que le parasitisme et le mutualisme sont aujourd'hui reconnues comme jouant un rôle clé dans l'écologie et l'évolution des espèces (Combes, 2001). Une attention particulière doit être apportée aux microorganismes intracytoplasmiques (symbiote *lato sensu*) car leur survie et leur reproduction dépendent directement de la survie et du succès reproductif de leurs hôtes (Bull et al., 1991). La plupart de ces microorganismes ont une transmission verticale, et en première approximation, ce type d'association serait supposé évoluer vers une relation à bénéfice partagé ou mutualisme. Lorsque les microorganismes symbiotiques manipulent la reproduction de leurs hôtes afin d'augmenter leur propre transmission, ils peuvent alors être considéré comme des « parasites de la reproduction ». Les bactéries du genre *Wolbachia* en sont l'exemple typique, leur potentialité à perturber la reproduction des hôtes semble être extrêmement large et de nouveaux effets sont découverts de façon récurrente (Rousset et al., 1992a ; Rigaud et Rousset, 1996 ; Rigaud, 1999 ; Dedeine et al., 2001).

1. *Wolbachia*

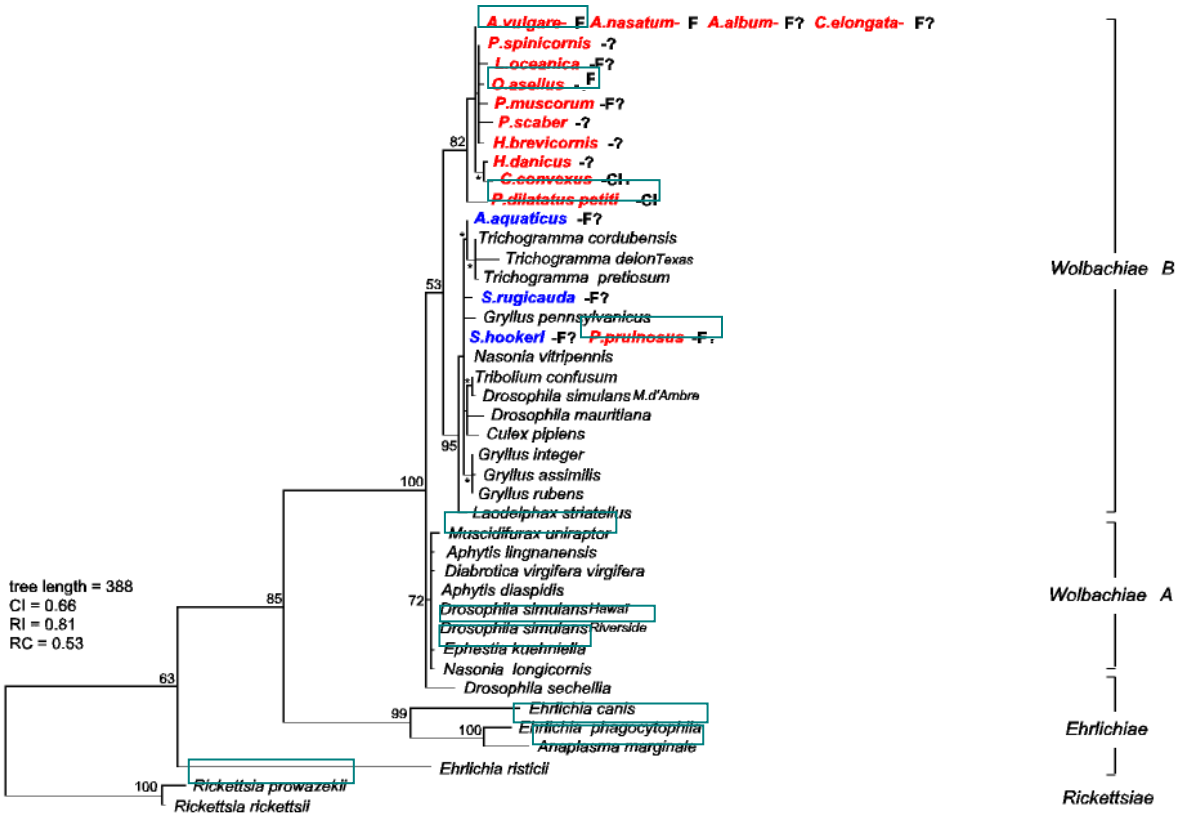
1.1 Généralités

Wolbachia est une α-protéobactérie intracellulaire décrite pour la première fois en 1924, par Hertig et Wolbach, dans les ovaires du moustique *Culex pipiens.* La bactérie fut appelée officiellement *Wolbachia pipientis* par Hertig en 1936 en hommage à son collaborateur Burt Wolbach. Jusqu'en 1970, peu de travaux furent reportés sur cette bactérie. En 1971, Yen et Barr découvrent que chez les moustiques, *Wolbachia pipientis* entraîne une incompatibilité de croisement entre mâles infectés et femelles non infectées. Les œufs non infectés fécondés par le sperme de mâles infectés ne sont pas viables (incompatibilité cytoplasmique). La bactérie semblait donc pouvoir interagir avec la reproduction de son hôte. L'intérêt pour ce groupe de bactérie a considérablement augmenté lorsqu'il fut découvert que l'infection et les effets l'accompagnant ne se limitaient pas aux moustiques, mais pouvaient également se retrouver chez plusieurs autres espèces d'insectes (Kellen et al., 1981 ; Noda, 1984 ; Richardson et al., 1987 ; Binnington et Hoffmann, 1989). Le fait le plus marquant est

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

sans doute que *Wolbachia* engendre cette même incompatibilité de croisement chez la drosophile, modèle de laboratoire très étudié (Hoffmann et Turelli, 1988).

Wolbachia a désormais été identifiée chez de nombreux arthropodes (insectes, acariens, isopodes…) mais également chez des nématodes. Des études suggèrent qu'au moins 16 % des espèces d'insectes peuvent être naturellement infectées par cette bactérie (Werren et al., 1995a) et il a même été montré que 50% des espèces de fourmis d'Indonésie sont infectées par *Wolbachia* (Wenseleers et al., 1998). Chez les isopodes terrestres, 35% des espèces sont infectées (Bouchon et al., 1998), et chez les filaires, 9 des 10 espèces répertoriées sont infectées (Bandi et al., 1998). La fréquence de *Wolbachia* dans ces deux derniers groupes a conduit à la recherche de sa présence chez les mollusques (Schilthuizen et Gittenberg, 1998). Selon ces auteurs, la flexibilité de la détermination du sexe chez les mollusques en fait des candidats idéaux pour la féminisation par *Wolbachia*. Cependant, aucune des espèces testées n'était infectée.



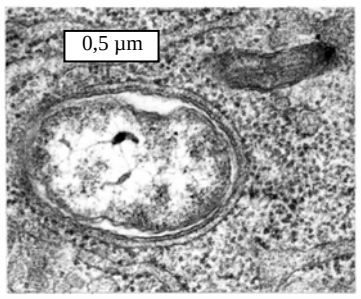
<u>Figure A:</u> Arbre phylogénétique de *Wolbachia* basé sur le gène *ADNr 16S*. Les souches citées dans ce manuscrit sont encadrées en vert. CI : Incompatibilté Cytoplasmique ; F : Féminisation ; F ?: Féminisation probable ; ?: Effet inconnu. (d'après Bouchon et al., 1998)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

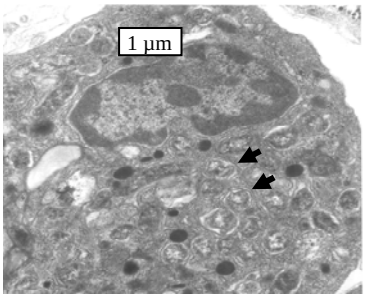
Wolbachia est héritée maternellement et elle reste, jusqu'à aujourd'hui, non cultivable, même s'il est possible de la maintenir *in vitro* dans le cytoplasme des cellules du moustique *Aedes albopictus*, hôte naturel de *Wolbachia* (O'Neill et al., 1997b ; Dobson et al., 2002), ou dans des cellules de mammifères (Noda et al., 2002). Elles appartiennent au groupe des rickettsia-like (figure A). Ce groupe réunit des bactéries hébergées par des arthropodes vecteurs de maladies humaines, comme par exemple *Cowdria* et *Anaplasma* (O'Neill et al., 1992, Stouthamer et al., 1993).

1.2 Description morphologique et localisation

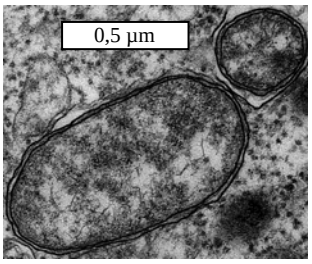
Wolbachia possède les caractéristiques générales des rickettsies (Hertig et Wolbach, 1924). Elle est dimorphique, formant des bâtonnets (de 0.5 à 1.3 µm de longueur) ou des formes plus arrondies (de 0.25 à 0.5 µm de diamètre) (figure B) (Martin et al., 1973).



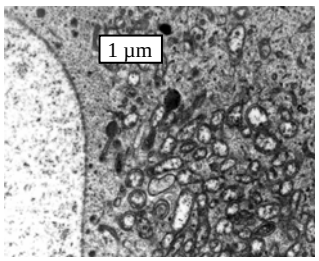
a) Glande androgène



b) Hémocytes



c) Ovocyte



d) Ovocyte

<u>Figure B :</u> *Wolbachia* dans des cellules d'*Armadillidium vulgare* (crustacé isopode terrestre), microscopie électronique à transmission. a) glande androgène ; b) hémocyte ; c) et d) ovocytes.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Dans certains tissus comme la glande androgène d'*Armadillidium vulgare, Wolbachia* est enveloppée par trois feuillets membranaires externes (figure B-a). La couche la plus extérieure tient son origine de l'hôte, et recouvre la membrane cellulaire externe de la bactérie. La couche la plus interne est constituée de la membrane plasmique de la bactérie (Martin et al., 1973; Louis et Nigro, 1989). Une des interprétations possibles est que la bactérie est entourée d'une boucle de réticulum endoplasmique (Martin et al., 1973). Cette caractéristique se retrouve chez de nombreuses bactéries intracellulaires; et selon Wright (1979), ces membranes jouent un rôle dans le contrôle de l'hôte sur le procaryote. Cependant, ces trois feuillets membranaires ne sont pas présents dans toutes les cellules et, par exemple, ils n'ont pas été observés autour des bactéries présentes dans les ovocytes d'*A. vulgare* (figure B-c).

Chez le moustique, Hertig (1936) observa que *Wolbachia* était surtout localisée dans le cytoplasme des cellules des organes de reproduction. Chez *A. vulgare,* les bactéries très largement présentes dans les ovocytes sont localisées dans la zone péri-nucléaire, formant un croissant autour du noyau (figure B-d) (Martin et al., 1973). Dans les ovaires, *Wolbachia* semble être présente en plus grande quantité dans les cellules nourricières, où la multiplication a lieu (Louis et Nigro, 1989 ; Zchori-Fein et al., 1998). Le contenu de ces cellules pénètre dans les œufs en développement par des ponts cytoplasmiques. A l'intérieur de l'œuf, *Wolbachia* s'associe avec les microtubules et cette interaction influence la localisation du symbiote lors des stades précoces de développement (Kose et Karr, 1995). Les études menées par ces auteurs indiquent que ce sont des facteurs de l'hôte qui régulent la croissance de *Wolbachia.*

Chez quelques espèces - la mouche *Drosophila simulans* (Louis et Nigro, 1989), la guêpe parasitoïde *Dahlbominus fuscipennis* (Byers et Wilkes., 1970) et le cloporte *A. vulgare* (Martin et al., 1973*)* - *Wolbachia* se retrouve aussi dans les tissus nerveux. Des associations aussi étroites avec le système nerveux peuvent permettre une influence très directe de *Wolbachia* sur le comportement de son hôte. Chez *A. vulgare*, les ovaires sont les tissus les plus riches en *Wolbachia* mais la bactérie peut également se retrouver dans les hémocytes (figure B-b) (Rigaud et al., 1991b) et dans tous les tissus de l'hôte (Martin, communication personnelle) à des densités variables mais généralement assez faibles.

Différentes techniques ont été utilisées pour déterminer la quantité de *Wolbachia* et les résultats varient considérablement selon l'hôte. Une femelle infectée d'*A. vulgare* héberge entre 66 000 et 164 000 bactéries (Rigaud et al., 1991b). Chez la guêpe du genre

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Trichogramma, 250-670 bactéries par œufs ont été dénombrées (Stouthamer et al., 1993). Un œuf de *Drosophila simulans* (Riverside California) peut contenir environ 500 000 *Wolbachia*, et on estime que les mouches mâles peuvent héberger au total 36.5 x 10^6 bactéries (Bourtzis et al., 1996).

1.3 Effets sur la reproduction

Aujourd'hui, l'intérêt des scientifiques pour *Wolbachia* n'est pas seulement dû à sa fréquence élevée mais aussi aux effets physiologiques qu'elle engendre chez ses hôtes. L'hôte et la bactérie vivent en symbiose facultative voire obligatoire, c'est-à-dire que les deux populations bénéficient de leur présence mutuelle, mais peuvent s'en passer dans le cas de la symbiose facultative. Cependant, quelque soit le type de modification induite par *Wolbachia* sur la reproduction de ses hôtes, celle-ci a toujours la même conséquence théorique : favoriser sa transmission dans les populations hôtes sans être pathogène ou sans l'aide de transferts entre individus à un taux significatif. Les altérations de la reproduction que *Wolbachia* entraînent chez les arthropodes sont désormais bien connues et sont les suivantes :

- l'expression de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) (Werren, 1997 ; Bourtzis et al., 2003) : un croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée ou infectée par une souche différente de *Wolbachia* résulte en la mort des embryons (voir 1.3.1.).
- l'induction de développement parthénogénétique (Stouthamer et al., 1990) : les femelles vierges infectées ne produisent que des femelles (voir 1.3.2.).
- le "male killing" (Hurst et al., 1999 ; Jiggins et al., 1998) : les embryons mâles infectés ne sont pas viables tandis que les embryons femelles infectés se développent normalement (voir 1.3.3.).
- la présence obligatoire pour l'ovogenèse (Dedeine et al., 2001) : les femelles chez lesquelles *Wolbachia* a été éliminée par traitement antibiotique n'ont pas d'ovocytes matures dans leurs ovaires et ne peuvent donc pas se reproduire (voir 1.3.4.).
- l'augmentation de la fécondité ou fertilité des hôtes (Girin et Boulétreau, 1995), et enfin la pathogénicité (Min et Benzer, 1997).

- la féminisation des mâles génétiques (Juchault, 1966 ; Martin et al., 1973) : les mâles génétiques infectés par *Wolbachia* se différencient en femelles fonctionnelles, capables de se reproduire (voir 1.3.5.).

En plus de ces effets, comme mentionné précédemment, *Wolbachia* est également présente chez certaines espèces de nématodes. Chez les filaires *Onchocerca volvulus* responsables de la cécité des rivières, *Wuchereria bancrofti* et *Brugia malayi* responsables de l'éléphantiasis chez l'homme, *Wolbachia* a également été reportée (Taylor et Hoerauf, 1999 ; Bandi et al., 1999 et 2001). Il n'a été observé aucune altération de la reproduction induite par *Wolbachia* chez les nématodes, mais il semble que sa présence soit nécessaire au développement de son hôte. Des traitements à la tétracycline montrent que la réduction de la charge en *Wolbachia* chez les nématodes inhibe l'embryogenèse, la production de microfilaires et le développement des larves en adultes, et interfère avec la durée de vie des adultes (Bandi et al., 2001 ; Langworthy et al., 2000). Ces traitements antibiotiques ont d'ailleurs ouvert la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le contrôle des maladies humaines véhiculées par les filaires infestées par *Wolbachia*.

1.3.1 L'Incompatibilité Cytoplasmique (IC)

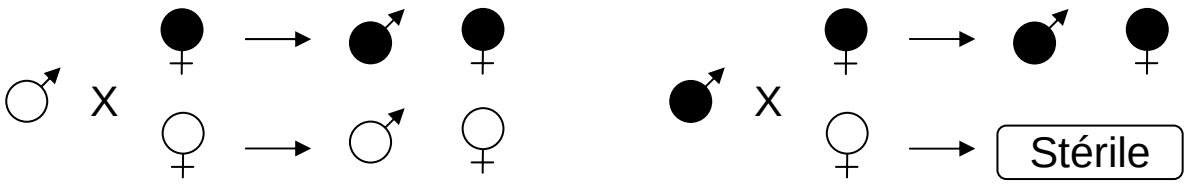
L'IC est l'effet le plus répandu et a été reporté chez différents ordres d'insectes tels que les coléoptères, les diptères, les hémiptères, les hyménoptères, les orthoptères, et les lépidoptères (Giordano et al., 1997 ; O'Neill et al., 1997a ; Bourtzis et Braig, 1999 ; Bourtzis et al., 2003). Cet effet a également été décrit chez deux espèces de crustacés isopodes, *Porcellio dilatatus petiti* (Legrand et al., 1978 et 1985) et plus récemment *Cylisticus convexus* (Moret et al., 2001).

L'expression de l'IC a habituellement pour effet la mort des embryons issus des croisements entre un mâle infecté par *Wolbachia* et une femelle non infectée (IC unidirectionnelle) ou infectée par une autre souche de *Wolbachia* (IC bidirectionnelle). Un croisement entre mâle et femelle infectés par la même souche de *Wolbachia* reste compatible (figure C). Cet effet est dû à la perturbation des réactions de condensation/décondensation des kinétochores des pronuclei pendant la fécondation (Callaini et al., 1997 ; Lassy et Karr, 1996 ; Harris et Braig, 2003). *Wolbachia* n'est pas présente dans les spermatozoïdes matures, elle disparaît en effet lors de leur maturation. *Wolbachia* libère un facteur durant le

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

développement des spermatides et ce facteur est porté par les spermatozoïdes en l'absence de *Wolbachia*. Des croisements entre individus portant la même souche de *Wolbachia* sont compatibles, et ceci indique que la présence de *Wolbachia* dans les œufs à un stade précoce peut restaurer les spermatozoïdes « modifiés » pour leur redonner leur pouvoir fécondant. Il apparaît donc que *Wolbachia* est capable "d'imprimer" les spermatozoïdes à travers un mécanisme inconnu et que cette empreinte n'est "compatible" qu'avec des œufs infectés par la même souche de *Wolbachia*. En 1997, Werren a proposé l'hypothèse poison/antidote afin d'expliquer l'IC. Dans ce modèle, la « modification » (*mod*) se produit dans les pronucléus mâles, avant que *Wolbachia* ne soit éliminée du sperme en cours de maturation (Presgraves, 2000). Les embryons fécondés avec des spermatozoïdes modifiés stoppent leur développement à un stade précoce sauf si la fonction « rescue» (*resc*) est exprimée dans les œufs de femelles infectées par *Wolbachia* (Merçot et Poinsot, 1998).

Chez l'hyménoptère *Nasonia vitripennis*, une étude récente montre que l'IC est due à un retard de la rupture de la membrane nucléaire du pronucléus mâle. Les chromosomes paternels n'ont pas suffisamment de temps pour condenser. Ce retard entraîne une asynchronie entre les pronuclei mâle et femelle, pour finalement aboutir à la perte des chromosomes paternels lors de la première mitose (Tram et Sullivan, 2002). Les auteurs suggèrent que l'effet de *Wolbachia* se ferait sur les protéines régulatrices du cycle cellulaire. La bactérie pourrait inhiber directement la protéine Cdk1, ou l'importation de la cycline B dans le pronucléus. En effet, certaines bactéries telles que *Campylobacter jejuni* peuvent provoquer un arrêt du cycle cellulaire de leur cellule hôte suite à la libération de toxines (CDT, cytolethal distending toxin) (Lara-Tajero et Galan, 2000).



<u>Figure C :</u> Illustration du phénomène d'incompatibilité cytoplasmique unidirectionnelle. Les individus infectés par *Wolbachia* sont en noir, les non infectés en blanc ; on suppose que les symbiotes sont transmis à tous les descendants. (d'après Rigaud et Rousset, 1996)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

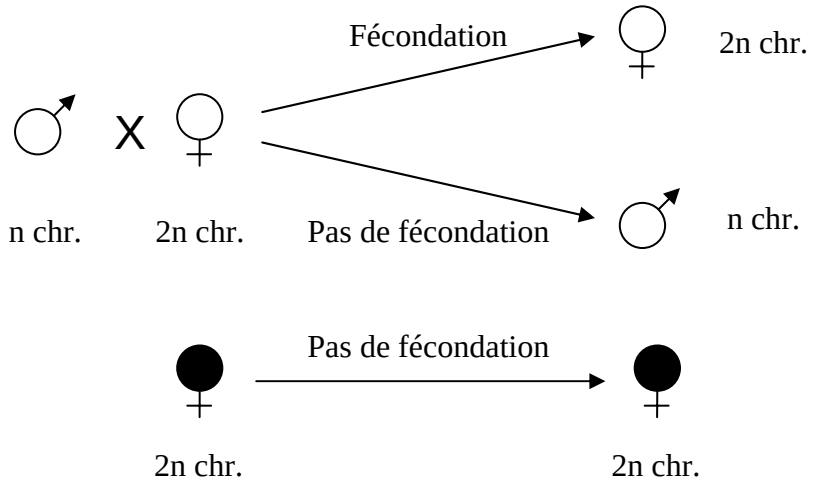
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Chez les drosophiles, des études montrent qu'il existe une corrélation entre la densité de *Wolbachia* chez les mâles et le niveau d'expression de l'IC suggérant que l'hôte pourrait exercer un contrôle sur la prolifération de *Wolbachia* dans certains tissus (Poinsot et al., 1998). Cependant, la densité bactérienne n'est pas le seul facteur responsable du niveau d'expression de l'IC, car certaines souches de drosophile hébergent *Wolbachia* sans exprimer d'incompatibilité cytoplasmique. La bactérie doit également être capable d'infester les spermatocystes et d'exprimer les facteurs *mod* permettant de modifier ces derniers (Bourtzis et al., 1998 ; Veneti et al., 2003).

1.3.2 La parthénogenèse thélytoque (pour revue, Stouthamer, 1997)

Cet effet est connu chez les Hyménoptères haplo-diploïdes chez lesquels il a été démontré ou présumé chez 46 espèces (Huigens et Stouthamer, 2003), chez le thysanoptère *Franklinothrips vespiformis* (Arakaki et al., 2001), et chez trois espèces d'acariens (Weeks et Breeuwer, 2001). Chez ces espèces, la parthénogenèse est en général arrhénotoque : les mâles haploïdes se développent à partir d'œufs non fécondés alors que les femelles diploïdes se développent à partir d'œufs fécondés. Chez certaines espèces, *Wolbachia* induit la diploïdisation d'œufs non fécondés lors de la première division de mitose, entraînant la différenciation des œufs en femelles (figure D).

Les analyses cytogénétiques chez les Trichogrammes indiquent que le mécanisme par lequel est induit la parthénogenèse est un échec de la ségrégation chromosomique durant la mitose, conduisant à des noyaux qui contiennent deux jeux de chromosomes identiques (Stouthamer et Kazmer, 1994).



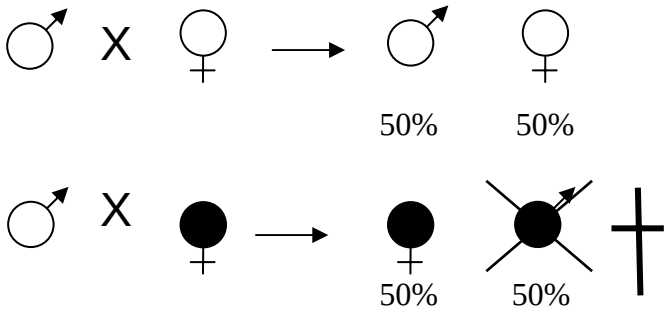
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

<u>Figure D :</u> Illustration du phénomène de parthénogenèse thélytoque. Les individus infectés par *Wolbachia* sont en noir, les non infectés en blanc ; on suppose que les symbiotes sont transmis à tous les descendants (d'après Rigaud et Rousset, 1996).

1.3.3 La mort des mâles ou « male-killing »

Ce phénomène n'a été découvert que chez certains insectes : trois espèces de lépidoptère : *Acraea encedon* (Hurst et al., 1999), *Acraea encedana* (Jiggins et al., 2000), et *Hypolimnas bolina* (Dyson et al., 2002), ainsi que chez deux espèces de coléoptère : *Adalia bipunctata* (Hurst et al., 1999) et *Tribolium madens* (Fialho et Stevens, 2000) et chez le diptère *Drosophila bifasciata* (Hurst et al., 2000).

Cet effet n'a été que récemment attribué aux *Wolbachia* (Hurst et al., 1999), bien qu'il soit connu depuis longtemps. En effet, le «male-killing » était déjà identifié chez les insectes (synthèse dans Hurst et al., 1997), mais les micro-organismes connus pour induire ce phénomène, bien que très divers, n'incluaient pas *Wolbachia*. La présence de la bactérie chez les individus du sexe mâle entraîne leur mort, et ceci à des stades précoces du développement embryonnaire (figure E).



<u>Figure E :</u> Illustration du phénomène de « male-killing ». Les individus infectés par *Wolbachia* sont en noir, les non infectés en blanc ; on suppose que les symbiotes sont transmis à tous les descendants.

1.3.4 Effet sur l'ovogenèse

Chez la guêpe parasitoïde *Asobara tabida*, toutes les femelles chez lesquelles la bactérie a été éliminée par traitement antibiotique sont incapables d'engendrer une descendance (Dedeine et al., 2001). Bien que l'infection de *Wolbachia* n'entraîne généralement pas de bénéfice évident pour l'hôte, la guêpe parasitoïde *Asobara tabida* peut être considérée comme une exception. En effet, *Asobara tabida* a besoin de l'infection par *Wolbachia* pour réaliser son ovogenèse. Cette association est le premier exemple décrit de transition d'une symbiose facultative à une symbiose obligatoire ou mutualisme avec une relation obligatoire et indispensable à la survie de chaque partenaire.

1.3.5 Féminisation

1.3.5.1 Généralités

C'est chez les crustacés isopodes terrestres que des sex ratios déséquilibrés ont été observés pour la première fois (Vandel, 1941). Depuis les recherches de Vandel, on savait que les populations naturelles de nombreuses espèces d'isopodes terrestres présentaient de forts excès de femelles et que des femelles gravides récoltées dans la nature, puis élevées au laboratoire produisaient des descendances ayant des sex ratio très variés mais souvent en faveur des femelles.

Ce phénomène a été décrit majoritairement chez des espèces de crustacés isopodes terrestres ou cloportes tels que *A. vulgare* (Juchault, 1966 ; Legrand et Juchault, 1970 ; Martin et al., 1973), *Oniscus asellus* (Rigaud et al., 1999) et *Porcellionides pruinosus* (Juchault et al., 1994 ; Marcadé, 1998). Cependant, des phénomènes de féminisation ont récemment été mis en évidence chez d'autres taxons, notamment des lépidoptères (Kageyama et al. 2002 ; Hiroki et al., 2002) et des acariens (Weeks et al., 2001).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

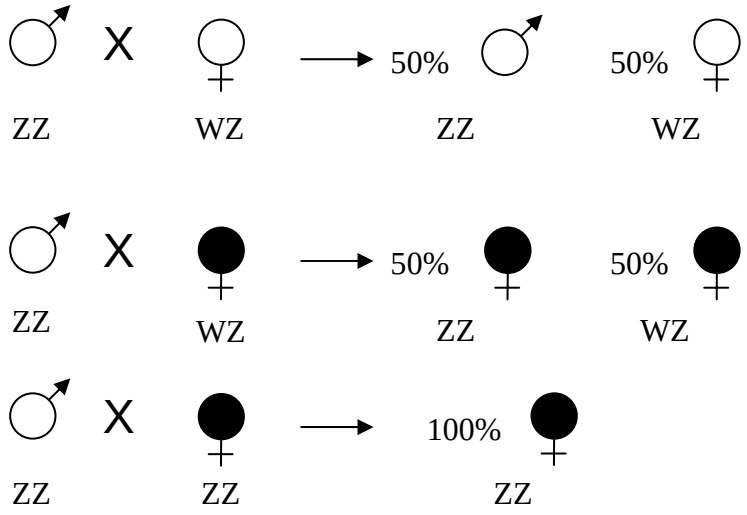
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

1.3.5.2 Féminisation chez les isopodes terrestres

(voir Annexe 1 pour les caractéristiques générales des crustacés isopodes terrestres)

Le mode de détermination génétique du sexe peut être affecté par la présence de *Wolbachia*. Sa présence dans les ovocytes fécondés induit la différentiation des mâles génétiques en femelles fonctionnelles. Ces mâles génétiques différenciés en femelles fonctionnelles capables de se reproduire et d'engendrer une descendance, sont alors appelées néo-femelles ou femelles F pour Féminisation (lignée F). Ainsi, le sex ratio de la descendance est fortement biaisé vers les femelles, assurant à la bactérie une large propagation au sein des populations (Martin et al., 1973 ; Réf. *in* Rigaud, 1997). Seuls quelques ovocytes (10 à 20%) échappent à l'infection et assurent, par ce biais, la présence de mâle et la pérennité de la population. Signalons que dans certaines populations, un excès de femelles est également dénombré (lignée f) en l'absence de *Wolbachia* (Legrand et Juchault, 1984).

Chez *A. vulgare*, la différenciation sexuelle mâle et femelle est déterminée génétiquement par les chromosomes sexuels de type Z et W avec une hétérogamétie femelle WZ, et une homogamétie mâle ZZ. Classiquement, le croisement entre un mâle ZZ et une femelle WZ engendre 50% de zygotes ZZ et 50% de zygotes WZ (sex ratio 1 :1) (figure F). Si l'on considère un taux de transmission de 100%, lorsqu'un mâle génétique ZZ est croisé avec une femelle génétique WZ infestée par *Wolbachia*, la portée sera composée de 100% de femelles, la moitié ayant un génotype mâle (femelle F ou néo-femelle), l'autre moitié ayant un génotype femelle (figure F). Enfin, le croisement entre un mâle génétique et une femelle F (ou néo femelle ZZ + *Wolbachia*) produit 100% de néo femelles.



tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

<u>Figure F :</u> Illustration du phénomène de féminisation. Les individus infectés par *Wolbachia* sont en noir, les non infectés en blanc ; on suppose que les symbiotes sont transmis à tous les descendants. (d'après Rigaud et Rousset, 1996)

2. La différenciation sexuelle chez les Crustacés Isopodes terrestres et données expérimentales du phénomène de féminisation par *Wolbachia*

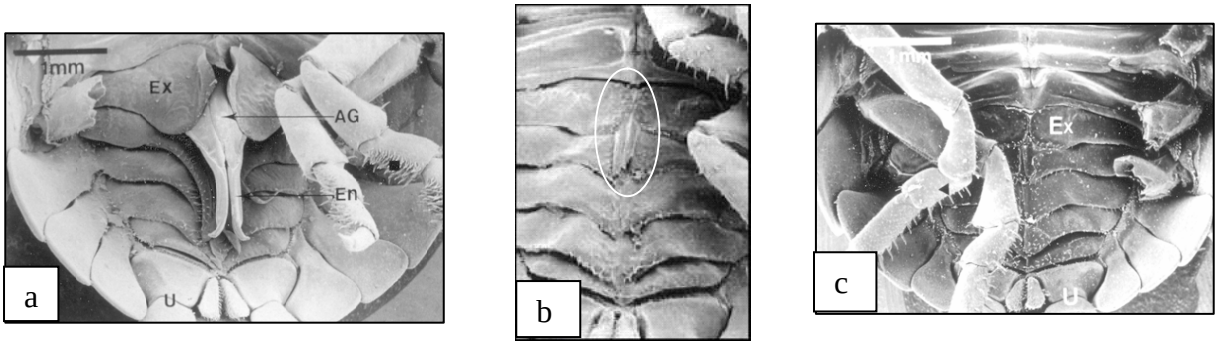
La différenciation sexuelle a été largement étudiée chez les crustacés supérieurs (malacostracés), car c'est le seul groupe pour lequel une hormone sexuelle a été caractérisée. La glande androgène (GA) responsable du développement des caractères sexuels mâles, a été caractérisée pour la première fois par Charniaux-Cotton (1954) chez l'amphipode *Orchestia gammarella*. Elle a ensuite été identifiée chez les isopodes (Katakura, 1961 ; Juchault et Legrand, 1964 ; Juchault, 1966 ; Réf. *in* Juchault, 1977).

Chez les mâles crustacés isopodes terrestres, la GA est responsable de la sécrétion de l'Hormone Androgène (HA), qui contrôle précisément la différenciation de tous les caractères sexuels primaires et secondaires (Charniaux-Cotton, 1960 ; Juchault, 1966 ; Charniaux-Cotton et al., 1992 ; Sagi et al., 1997). Chez les femelles, la GA n'existe pas et l'ébauche gonadique se développe en ovaire spontanément (Katakura, 1989). Les mâles et les femelles possèdent les gènes induisant la différenciation de la gonade embryonnaire en gonade mâle (GA). Ces gènes sont tissus spécifiques (Legrand et al., 1987) et ils sont silencieux chez les femelles chez lesquelles, par conséquent, l'HA n'est pas synthétisée. L'HA est essentielle pour la spermatogenèse et joue un rôle important dans la pigmentation et le comportement mâle (Katakura, 1984 ; Charniaux-Cotton et al., 1992 ; Hasegawa et al., 1993). Chez *A. vulgare*, l'HA a été caractérisée et purifiée (Martin et al., 1990 ; Martin et al., 1998 ; Martin et al., 1999).

La détermination du sexe est donc contrôlée par la présence ou l'absence de la GA (Suzuki et Yamasaki, 1991). *Wolbachia* provoque l'effet féminisant en s'opposant au développement de la GA (Martin et al., 1973 ; Juchault et al., 1980a ; Juchault et Legrand, 1985 ; Réf. *in* Rigaud, 1997).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les études présentées ici ont été réalisées à partir de lignées à fort taux de femelles (que nous appellerons lignées F pour Féminisation). Chez *A. vulgare*, notre modèle d'étude, la lignée F utilisée est caractérisée par des femelles qui produisent naturellement des portées comportant en moyenne 80% de femelles, quelques mâles et des intersexués (Legrand et Juchault, 1969a et b). Les intersexués sont principalement de deux types : des individus stériles possédant à la fois des caractères mâles externes incomplets développant une hypertrophie des GA et des ouvertures génitales femelles (intersexués mâles iM), et des individus qui fonctionnent comme des femelles fertiles, mais qui possèdent de très petits gonopodes mâles non fonctionnels (intersexués femelles iF) (figure G).



<u>Figure G :</u> Face ventrale d'*Armadillidium vulgare*. (a), mâle, (b), intersexué, (c), femelle. Ex : exopodite, En : endopodite, AG, appendice génital, U : Uropode.

Dans cette lignée F, les individus infectés (femelles et intersexués) sont insensibles à l'action masculinisante de l'HA (injection expérimentale), contrairement aux femelles génétiques non infectées. De plus, des mâles ayant reçu un implant de tissus de femelles infectées ou d'intersexués sont féminisés et évoluent en intersexués de type iM. Le même implant introduit chez les femelles génétiques (femelles A pour Amphogènes) induit la production de portées comportant presque uniquement des filles (Legrand et Juchault, 1970). Enfin, une dernière donnée expérimentale est à décrire concernant cette lignée F: une injection de broyat de tissus de femelles infectées est incapable d'induire la féminisation d'un mâle si le broyat est préalablement filtré par une membrane dont les pores sont d'un diamètre (0,2 µm) inférieur à la taille de *Wolbachia* (Legrand et Juchault, 1986).

Concernant la lignée f, lignée pour laquelle un excès de femelles est observée sans présence de *Wolbachia*, les femelles sont masculinisables par injection d'hormone androgène

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ou greffe de glande androgène, contrairement aux femelles de la lignée F qui présentent un état réfractaire à la masculinisation.

Chez les rares mâles provenant de cette lignée F, *Wolbachia* n'a jamais été détectée ni en microscopie électronique, ni en PCR. Ceci conduit à penser que les mâles de cette lignée F proviennent d'ovocytes ayant échappé à l'infestation par la bactérie. Il faut également noter qu'aucune femelle de la lignée F ne produit de descendance à sex ratio équilibré de façon régulière et stable comme le font les femelles WZ dépourvues de bactéries. Un fort taux des individus de cette lignée F peut donc être considéré comme des mâles génétiques (ZZ) : ceux qui hébergent la bactérie sont soit des néo-femelles (ZZ+ *Wolbachia*), soit des intersexués également de génotype ZZ. Ceci a été confirmé par l'étude de l'effet de la température d'élevage sur *Wolbachia*. En effet, *Wolbachia* devient indétectable dans les tissus de l'hôte lorsque la température d'élevage est de 35°C. A cette température, des jeunes femelles acquièrent spontanément des caractères mâles dont la différenciation s'intensifie au cours du temps (Juchault et al., 1980b). A une température de 30°C, les femelles produisent environ 80% de mâles dans leurs descendances (Juchault et Mocquard, 1988). Les individus de cette lignée sont donc bien génétiquement mâle (ZZ) et suite à une inactivation de *Wolbachia* par la chaleur, ils engendrent des descendants mâles dont le phénotype est en accord avec leur génotype mâle ZZ.

Des expériences menées au laboratoire ont, par ailleurs, permis de montrer que la différenciation sexuelle d'*A. vulgare* peut être modifiée par différentes manipulations. Tout d'abord, l'implantation d'une GA dans la cavité générale de jeunes femelles génétiques induit une inversion fonctionnelle du sexe si elle est réalisée à des stades précoces du développement (Juchault, 1966). Par contre, à des stades plus tardifs, la greffe conduit à la différenciation de la jeune femelle en intersexué (Suzuki et Yamasaki, 1997). D'autre part, une injection répétée d'HA provoque également une inversion sexuelle des jeunes femelles génétiques en mâles, permettant d'attribuer l'effet masculinisant à l'HA (Juchault, 1966 ; Martin et Juchault, 1999). De la même manière, une inversion sexuelle d'un mâle génétique en femelle fonctionnelle peut être obtenue expérimentalement par ablation bilatérale des gonades primordiales mâles (Suzuki et Yamasaki, 1991). L'ébauche gonadique des deux sexes a donc une origine commune et une bipotentialité sexuelle (Suzuki et Yamasaki, 1997).

3. Application potentielle de *Wolbachia*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Wolbachia manipule la biologie de son hôte et la réponse attendue des gènes de l'hôte à de telles manipulations laisse penser que ces infections ont d'importantes implications dans l'évolution de la détermination du sexe (Bourtzis et O'Neill, 1998 ; Beard et al., 1993) et la spéciation (Breeuwer et Werren, 1990 ; Hurst et Schilthuizen, 1998). Parmi les perspectives d'applications, *Wolbachia* est un outil très intéressant pour transformer génétiquement des arthropodes (Bourtzis et Braig, 1999 ; Beard et al., 1993) afin de modifier leur capacité à transmettre des maladies. En effet, certaines souches de *Wolbachia* très virulentes (Min et Benzer, 1997) après transfert entre espèces d'insectes, induisent toujours très fortement l'IC et réduisent la durée de vie de leur nouvel hôte (McGraw et al., 2001). Une infection par de telles souches de *Wolbachia* pourrait réduire les effectifs des populations d'arthropodes vecteurs de maladies. Basés sur ces données, Brownstein et al. (2003) ont développé un modèle permettant d'estimer l'impact de l'introduction d'une telle souche dans une population de moustique vecteur de la Dengue (maladie virale potentiellement mortelle). Les résultats montrent que l'infestation par *Wolbachia* de cette population hôte est possible et causerait une réduction significative de la durée de vie des moustiques, entraînant par là même, une diminution du taux de transmission de la maladie. D'après les auteurs, cet exemple d'étude basée sur une population donnée peut être transposable à d'autres arthropodes vecteurs de maladies.

Les filaires peuvent être contrôlées en interférant sur leur symbionte *Wolbachia* (Bandi et al., 1999). Les parasitoïdes vecteurs de *Wolbachia* utilisés en contrôle biologique des insectes pourraient être ainsi plus efficaces par induction de la parthénogenèse (Stouthamer, 1993).

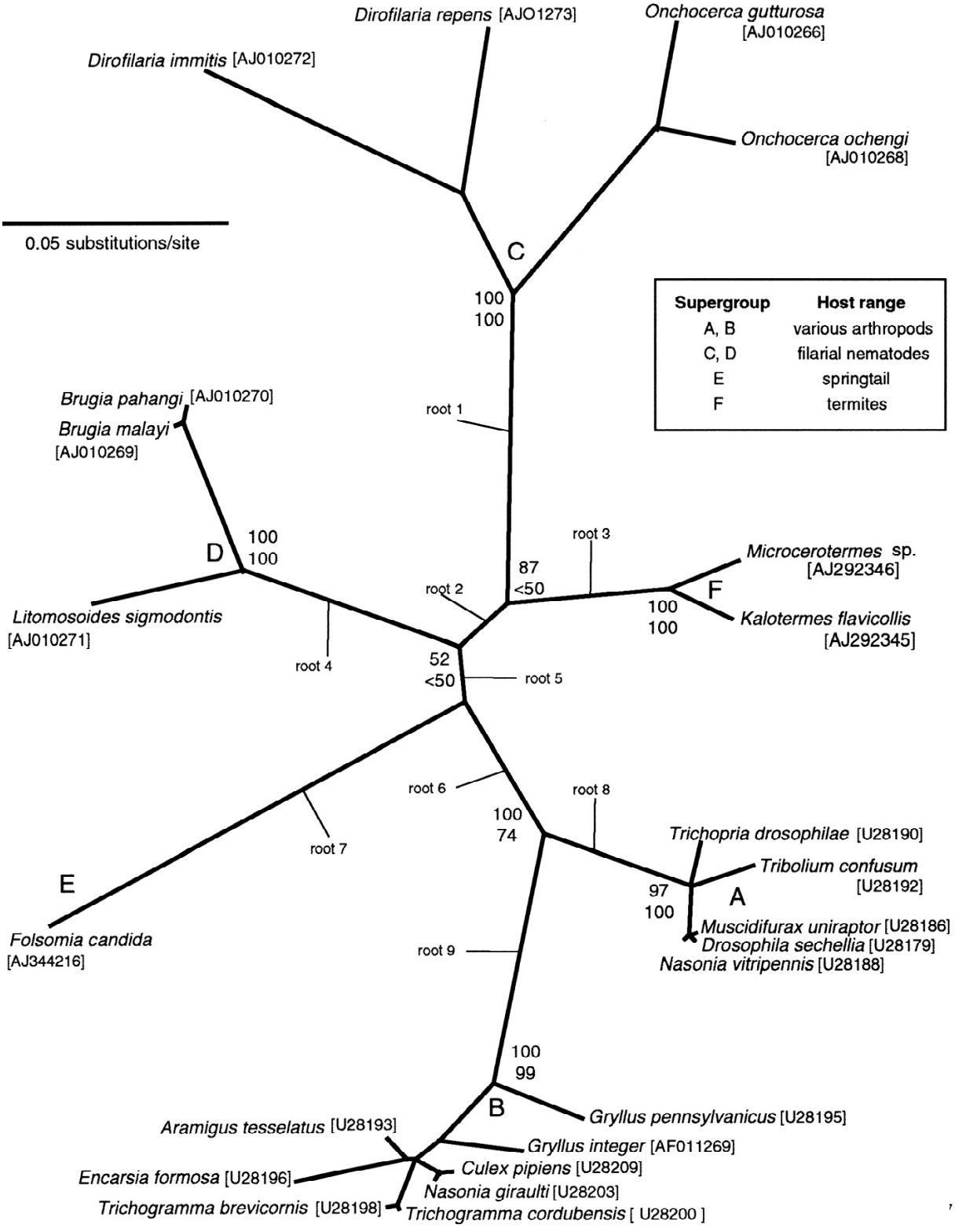
En effet, il a été suggéré que la capacité de *Wolbachia* à envahir activement des populations pourrait être utilisée comme véhicule pour mener aux génotypes désirés dans les populations sauvages, comme par exemple les gènes prévenant des vecteurs de maladies par transmission des pathogènes aux humains, bétail, ou plantes (Beard et al., 1993 ; Sinkins et al., 1997).

4. Données moléculaires concernant le phénomène de féminisation par *Wolbachia*

Malgré la distribution très large de *Wolbachia* et les perspectives de son utilisation potentielle dans la gestion des arthropodes nuisibles, peu de choses sont connues au sujet des mécanismes moléculaires qu'utilise *Wolbachia*. De nombreuses recherches concernant la

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

distribution, la phylogénie et la génétique des populations des infections par *Wolbachia* ont été réalisées mais peu de choses sont connues concernant la biologie moléculaire de *Wolbachia*. Seuls quelques gènes tels que *ftsZ* (Holden et al., 1993), *dnaA* (Bourtzis et al., 1994 ; Sun et al., 1999), *16S RNA* (Bensaadi-Merchermek et al., 1995), *Wsp* (Braig et al., 1998), *GroE* (Masui et al., 1997) ont été identifiés et caractérisés chez différentes souches de *Wolbachia*, ainsi que des gènes de phage (Masui et al., 2000a). La connaissance des séquences



tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

<u>Figure H:</u> Arbre phylogénétique des *Wolbachia*, endosymbiontes des arthropodes et des nématodes, basé sur le gène *ftsZ* (D'après Lo et al., 2002).

correspondantes a permis de mener essentiellement des études phylogénétiques (Rousset et al., 1992b ; Werren et al., 1995b ; Masui et al., 1997 ; Bouchon et al., 1998; Zhou et al., 1998) permettant de subdiviser le clade des *Wolbachia* en six groupes, classés de A à F (Werren et al., 1995b ; Bandi et al., 1998 ; Lo et al., 2002). Les groupes A et B réunissent les *Wolbachia* des Arthropodes (insectes, acariens, crustacés), tandis que les groupes C et D comprennent les *Wolbachia* des Nématodes filaires. Enfin, les groupes E et F regroupent les *Wolbachia* symbiotes des termites et des collemboles (figure H).

Il existe une grande diversité des mécanismes du déterminisme du sexe parmi les hôtes, mais quelques soient ces mécanismes, la stratégie de *Wolbachia* est toujours d'affecter la reproduction de son hôte. Adapte t-elle sa stratégie en fonction de son hôte ou met elle en œuvre un même mécanisme pouvant affecter la reproduction chez tous les hôtes? Le manque de connaissance est particulièrement dû à la difficulté à travailler avec *Wolbachia.* Jusqu'à récemment, on ne connaissait pas de système de culture *in vitro* et le seul ayant été décrit à ce jour consiste à maintenir *Wolbachia* dans les cellules d'insectes (O'Neill et al., 1997b), ou de mammifères (Noda et al., 2002). La nature fastidieuse de *Wolbachia*, additionnée à la difficulté de sa purification en grande quantité à partir des tissus hôtes, a gêné les progrès de l'étude des mécanismes d'altérations de la reproduction engendrés par *Wolbachia.*

Aujourd'hui, afin de progresser dans le déchiffrage de la biologie de cet organisme intracellulaire obligatoire, et de l'évolution de la symbiose intracellulaire, de nouvelles approches sont abordées (Oehler et Bourtzis, 2000). Un premier projet de séquençage de génome de *Wolbachia* symbiote de *Drosophila melanogaster* a vu le jour en 1999 et est dirigé par O'Neill et ses collaborateurs. Le séquençage de ce génome est à présent terminé et l'annotation est en cours. Le deuxième projet basé sur des études génétiques et moléculaires de *Wolbachia* est européen et a débuté en 2000. Il s'agit du projet *Euwol*, dans le cadre duquel nous avons mené nos recherches. Le but du projet européen est d'identifier les gènes bactériens et les gènes de l'hôte impliqués dans l'induction par *Wolbachia* de trois manipulations de la reproduction : la parthénogenèse chez l'hyménoptère *Muscidifurax*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

uniraptor, la féminisation chez l'isopode *A. vulgare* et l'incompatibilité cytoplasmique chez le diptère *Drosophila simulans*, et ceci par des approches intégrées de génomique, protéomique et post-génomique. Notre implication dans le contrat européen est de progresser, par ces différentes approches, dans la connaissance du mécanisme mis en place lors du processus de féminisation.

Notre étude génomique a porté sur la caractérisation du chromosome bactérien de *w*Vul dans le but d'offrir la possibilité de réaliser, par des expériences complémentaires, sa carte physique et génétique. L'adaptation d'un protocole de purification de la bactérie et d'extraction du chromosome bactérien a donc permis, dans un premier temps, d'établir les prémices d'une cartographie physique du génome de *Wolbachia*, symbiote d'*A. vulgare*. Par respect de la nomenclature internationale, elle est appelée *w*Vul (*w* pour *Wolbachia* et Vul pour *vulgare*). Dans un second temps, la purification de *w*Vul puis de son chromosome a permis de réaliser le séquençage complet de son génome par l'équipe du Pr. Garrett, au Danemark (en cours). L'annotation de ce génome permettra d'identifier de nombreux gènes bactériens dont ceux impliqués dans la relation spécifique avec l'hôte.

La deuxième partie de cette étude s'est intéressée au mode d'action moléculaire de *Wolbachia*, à sa capacité à interagir avec les mécanismes de l'hôte. En effet, nous savons que chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, les protéines impliquées dans le phénomène de virulence sont exportées dans le cytoplasme de la cellule eucaryote elle-même. Pour traverser la paroi bactérienne, ces protéines doivent franchir la membrane interne et la membrane externe, toutes deux hydrophobes et donc imperméables aux composés hydrophiles. Pour ce faire, elles ont besoin de système de sécrétion. Le système de sécrétion de type IV est un système de transport de différentes molécules à travers la membrane bactérienne. Il a été identifié chez de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Agrobacterium tumefaciens* (Hille et al., 1984 ; Zambryski, 1988), *Bordetella pertussis* (Weiss et al., 1993), *Helicobacter pylori* (Covacci et al., 1997), *Brucella suis* (O'Callaghan et al., 1999), et *Rickettsia prowazekii* (Anderson et al., 1998). Quelques uns des mécanismes mis en jeu lors de la pathogénicité de ces bactéries sont connus. Par exemple, chez *A. tumefaciens*, le système de sécrétion de type IV va être responsable du transfert d'un plasmide qui va s'intégrer dans le génome de la plante infectée et engendrer la formation de tumeur du collet (Weiss et al., 1993). Chez *B. pertussis*, c'est une toxine qui est transférée à la cellule hôte par le système de sécrétion de type IV. La toxine pertussique, libérée dans le milieu extracellulaire, interagit avec les récepteurs glycoprotéiques des cellules cibles, provoquant alors la maladie humaine

appelée coqueluche. Chez deux *Wolbachia* symbiotes d'insectes (le criquet et la pyrale de la farine) induisant l'incompatibilité cytoplasmique, un opéron du système de sécrétion de type IV a été mis en évidence (Masui et al., 2000b). Dans notre étude, la caractérisation complète de deux opérons regroupant au total huit gènes du système de sécrétion de type IV chez *w*Vul a été réalisée. L'étude transcriptionnelle de ce système chez *w*Vul féminisante est présentée dans ce manuscrit.

Depuis de nombreuses années, l'hypothèse de travail au sein du laboratoire pour expliquer l'inhibition de l'expression des caractères sexuels mâles par *Wolbachia* invoquait la présence d'une ou plusieurs toxines ou endotoxines circulantes capables de contrecarrer l'action de l'HA sur des tissus aussi divers que la glande androgène ou les épithéliums différenciant les caractères sexuels secondaires (brosses, appareil copulateur). En d'autres termes, une compétition entre ligands naturels (hormone androgène, androgenic inhibiting hormone, vitellogenin inhibiting hormone) et ligands bactériens était suspectée. Curieusement, l'ovaire qui possède également ces mêmes récepteurs continue à présenter un fonctionnement normal et saisonnier.

De façon synthétique, mon travail de thèse, afin d'expliciter les mécanismes moléculaires de la féminisation, comportait un triple objectif :

1 – Isoler le chromosome bactérien à partir d'ovaires, le caractériser et le comparer avec les autres ADN bactériens des *Wolbachia* rencontrées chez les arthropodes et les nématodes.

2 – Rechercher par quel(s) moyen(s) *Wolbachia* libère certains de ces facteurs de virulence, et interagit avec le mécanisme moléculaire de son hôte.

3 – Rechercher les protéines impliquées dans l'infestation par *Wolbachia* par une approche différentielle (tissus sains/tissus infestés) en protéomique ; cette approche devant permettre après déchiffrage du génome de *w*Vul de déterminer les gènes bactériens impliqués dans la féminisation.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

CHAPITRE I
Isolement et caractérisation du génome de *Wolbachia*

1. INTRODUCTION

Contrairement au génome des cellules eucaryotes dont la structure a été connue dès la fin du XIX^{ème} siècle, à la suite des travaux de Flemming sur la mitose en 1879 et de la publication en 1913 de la première carte génétique d'un chromosome de drosophile par Sturtevant, l'étude de la stucture du génome bactérien a débuté relativement récemment. En effet, la présence d'un chromosome chez les bactéries n'a pas été une évidence. La principale difficulté à laquelle se sont heurtés les bactériologistes a été l'impossibilité d'observer des structures génétiques bien individualisées au cours de la division cellulaire, aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique. Il a fallu attendre la naissance de la génétique bactérienne dans les années 1940 pour que l'organisation du génome bactérien commence à être soupçonnée.

C'est la découverte en 1946 du phénomène de conjugaison chez *Escherichia coli* par Lederberg et Tatum (Lederberg et Tatum, 1946 ; Tatum et Lederberg 1947) qui va permettre la première description d'un chromosome bactérien. En effet, au cours de cet échange de gènes entre une bactérie mâle ou *Hfr* (contenant un facteur de fertilité, le plasmide F) et une bactérie femelle, il y a transfert progressif et continu de tous les gènes, amenant à la conclusion qu'il existe un seul groupe de liaison ou chromosome chez *E. coli*. Ce passage continu a permis de dresser la carte génétique du chromosome. La comparaison des cartes génétiques de diverses souches *Hfr*, montrant pour toutes les souches étudiées un alignement identique des gènes tout au long du groupe de liaison, mais une origine et un sens de transfert différents d'une souche à l'autre, a conduit à la conclusion que ce chromosome unique est aussi circulaire chez *E. coli* (Wollman et al., 1956).

Enfin, au début des années 1960, Cairns (Cairns, 1963) a pu observer par autoradiographie le chromosome d'*Escherichia coli* en cours de réplication et permettre ainsi la visualisation de ce chromosome bactérien unique et circulaire.

L'application des techniques classiques de génétique a permis de retrouver cette structure génomique chez un certain nombre d'autres espèces bactériennes et d'établir les premières cartes génétiques. Ainsi jusqu'à la fin des années 1980, le génome bactérien a pu

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

être défini comme formé par un chromosome unique (donc haploïde), circulaire et ne contenant que des séquences codantes (à l'exception de séquences répétées de longueur variable toujours situées entre les gènes), par opposition au génome des cellules eucaryotes formé de chromosomes multiples, diploïdes, linéaires et contenant des séquences non-codantes (les introns) entre et à l'intérieur des gènes.

Dans les années 1980, l'avènement de nouvelles techniques de biologie moléculaire destinées à l'étude des génomes eucaryotes, va être à l'origine du renouveau de l'étude du génome bactérien. Cette étude comprend en général la réalisation d'une carte du génome, qui peut être une carte génétique, c'est-à-dire définissant la position des gènes sur le chromosome, ou bien une carte physique, établissant la position de différents points de repère, comme les sites de restriction des endonucléases, sur toute la longueur du chromosome. Grâce à la découverte d'endonucléases de restriction coupant l'ADN en grands fragments (McClelland et al., 1987) et à la mise au point de la technique d'électrophorèse en champ pulsé (Schwartz et Cantor, 1984), la réalisation d'une carte physique est devenue en théorie possible pour tous les génomes bactériens. Ainsi, dès 1989, deux exceptions au dogme du chromosome bactérien circulaire et unique sont trouvées. Tout d'abord, Ferdows et Barbour (1989) d'une part, et Baril et al. (1989) d'autre part, en étudiant le génome de *Borrelia burgdorferi*, un spirochète responsable de la maladie de Lyme, découvrent que celui-ci est formé d'un chromosome sans doute unique, mais linéaire et non plus circulaire. De plus, ce chromosome est accompagné dans la cellule de plasmides soit circulaires (comme c'est généralement le cas chez les bactéries), soit linéaires. Au cours de cette même année 1989, une deuxième exception est citée par Suwanto et Kaplan (Suwanto et Kaplan, 1989a et b) à propos du génome de *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie photosynthétisante. Le génome de cette bactérie est constitué de deux stuctures indépendantes ou réplicons (un réplicon est une molécule d'ADN douée d'un système propre de réplication) d'une taille respective de 3 Mb et de 900 kb. Depuis, d'autres exceptions à cette règle ont été décrites. Il est maintenant communément accepté qu'un génome bactérien puisse être constitué de plusieurs chromosomes, et que ceux-ci puissent être circulaires ou linéaires.

Grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé, la taille d'un génome bactérien peut être maintenant calculée assez précisément en additionnant les tailles des différents fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN génomique par une endonucléase à faible fréquence de coupure. Cette estimation est encore plus juste lorsque la carte physique est établie et que chaque fragment est ainsi bien identifié. La construction de cartes

génétiques de plusieurs génomes bactériens et de la comparaison de ces cartes entre elles permet de définir une architecture générale du chromosome bactérien (Cole et Saint Girons, 1994). Au niveau intra et inter-espèce, la conservation de l'ordre des gènes s'associe plus ou moins à une relative conservation des sites de restriction. Par exemple, dans le cas de *E. coli* K12, en dehors de l'inversion de 1 Mb retrouvée dans la souche W3110, les cartes de restriction de six souches différentes montrent de nombreuses, mais petites différences. La plupart des délétions semblent dues à des prophages, tandis que les insertions résultent le plus souvent de l'acquisition de séquences d'insertion (Perkins et al., 1993). Certains auteurs mettent en évidence une conservation à la fois des cartes génétiques et des cartes physiques entre les différentes souches. Par exemple, une étude portant sur huit souches de la bactérie *Clostridium perfringens* a permis d'établir une carte consensus (Canard et al., 1992). Dans d'autres cas, il existe un polymorphisme des sites de restriction associé à la conservation de l'organisation génétique. L'exemple qui sera cité ici concerne le genre *Streptomyces*: la comparaison des cartes physiques chez *S. lividans* 66 et *S. coelicolor* A3(2) met en évidence environ 30% de sites de restriction polymorphes, mais la colinéarité de l'ordre des gènes sur les deux chromosomes est retrouvée (Leblond et al., 1993). Ces résultats sont particulièrement étonnants, car le génome de *Streptomyces* est caractérisé par une instabilité génomique à l'origine de grandes délétions et amplifications, notamment sur une région instable de 1 Mb (Cullum et al., 1991, Redenbach et al., 1993). La recherche des mécanismes à l'origine de ces remaniements génomiques est d'une grande importance. La multiplication de telles études comparatives apportera certainement des éclaircissements sur la part des réarrangements chromosomiques, des mutations ou bien des transferts horizontaux de gènes entre bactéries. Les programmes de séquençage de génomes bactériens permettront également d'apporter de nouveaux éléments pour la compréhension de tous ces phénomènes.

Afin de pouvoir réaliser ces études comparatives, notre étude a porté sur la caractérisation du chromosome bactérien de *w*Vul et constitue les travaux préliminaires en vue de l'établissement d'une carte physique et génétique du génome. Cette stratégie s'est appuyée sur la technique d'électrophorèse en champ pulsé permettant de recouvrer le chromosome de *Wolbachia* dans son intégralité, non contaminé par de l'ADN de l'hôte.

Nous nous sommes également intéressés à l'identification de la présence génétique des opérons *rrn* dans le génome de *w*Vul. En effet, l'agencement des gènes codant pour les ARN ribosomiques (loci *rrn*) semble une caractéristique conservée chez des bactéries même très éloignées. Les bactéries possédant de nombreux exemplaires des gènes codant pour l'ARN

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ribosomique (gènes *rrn*) semblent se multiplier plus vite (Krawiec et Riley, 1990). La plupart des bactéries possèdent plusieurs loci *rrn*, mais leur organisation est variable. Souvent, les trois gènes codant pour l'ARN ribosomique sont liés au sein d'un opéron où l'on retrouve respectivement dans l'ordre les gènes *rrs* (ARNr 16S), *rrl* (ARNr 23S) et *rrf* (ARNr 5S); la bactérie possède donc un nombre équivalent de copies de chacun des trois gènes. Cependant, cette règle n'est pas générale (Krawiec et Riley, 1990). Par exemple, dans le genre *Borrelia* (Davidson et al., 1992 ; Schwartz et al., 1992 ; Ojaimi et al., 1994), le chromosome porte un seul gène *rrs*, séparé d'une double répétition en tandem des gènes *rrl* et *rrf*; la succession des gènes sur le chromosome est donc la suivante: *rrs, rrlA, rrfA, rrlB, rrfB*. La présence d'un gène transcrit dans le sens contraire entre *rrs* et *rrlA* suggère que ces gènes sont transcrits de façon indépendante. La souche *w*Mel possède, elle aussi, une organisation différente des gènes codant pour des ARNr. Bensaadi-Merchermek et al. (1995) ont en effet montré le caractère non lié des gènes *rrn* : le gène *rrl* est suivi d'un gène *rrf,* et le gène *rrs* est localisé en un locus différent. Le nombre d'exemplaire de ces opérons (si on part du principe général que chaque gène *rrl* appartient à un locus *rrn*) ou au moins du gène *rrl* peut être détecté grâce à l'utilisation de l'endonucléase *I-Ceu*I. Le site de reconnaissance de cette enzyme se situe spécifiquement dans le gène codant l'ARNr 23S (*rrl*) et consiste en une séquence conservée spécifique de 19 pb. C'est également un outil qui peut s'avérer très utile pour l'étude comparative des chromosomes de différentes bactéries appartenant à la même espèce ou à des espèces voisines (Liu et Sanderson, 1995a et b).

Afin de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la féminisation induite par *Wolbachia* chez *A. vulgare*, nous avons entrepris de réaliser le séquençage du génome de *w*Vul. Deux stratégies ont parallèlement été adoptées. La première envisageait d'amplifier le génome de *w*Vul par Long-Range PCR. Cette approche a été rendue possible grâce à la mise à disposition, sur le site internet de l'institut pour la recherche génomique TIGR (http://www.tigr.org/) du génome de *w*Mel en cours d'annotation par O'Neill et al. au moment des expériences. Des amorces de PCR couvrant tout le génome de *w*Mel ont ainsi pu être dessinées par Bourtzis et ses collaborateurs, et ont permis une amplification d'une grande partie des génomes de *w*Uni et de *w*No. L'ADN de la souche *w*Ri (*Wolbachia* symbiote de *Drosophila simulans* Riverside induisant l'incompatibilité cytoplasmique) a également pu être amplifié grâce à cette technique. La qualité et la pureté des échantillons issus des Long Range PCR étant très importantes pour la souche *w*Ri, le séquençage de cette souche a été choisi au détriment de *w*No. Le séquençage de l'ADN de la

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

souche *w*Uni est également en cours grâce au succès de cette technique. Nous avons également testé ces amorces sur l'ADN de *w*Vul.

L'un des points forts du projet européen *Euwol* est en effet de séquencer les génomes de trois souches de *Wolbachia* induisant chacune une manipulation différente de la reproduction de leur hôte : *w*No induisant l'incompatibilité cytoplasmique chez le diptère *Drosophila simulans* Nouméa, *w*Uni la parthénogenèse chez l'hyménoptère *Muscidifurax uniraptor* et *w*Vul la féminisation chez le crustacé *Armadillidium vulgare*. La souche *w*Uni appartient au clade A, alors que les souches *w*Vul et *w*No appartiennent au clade B. La comparaison des trois génomes (*w*No, *w*Uni et *w*Vul) devrait permettre d'identifier les gènes impliqués dans la relation spécifique avec l'hôte, et dans le mode d'action de la bactérie lui permettant d'interférer avec la reproduction de leur hôte. L'acquisition de la technique d'isolement de l'ADN bactérien nous a permis de purifier l'ADN bactérien en quantité et qualité suffisantes pour la construction d'une banque génomique. En effet, de part sa nature exclusivement intracellulaire, il est très difficile d'isoler *Wolbachia* des cellules hôtes, et donc d'extraire de l'ADN bactérien pur et en quantité importante. Le séquençage complet du génome de *w*Vul est désormais en cours de réalisation par l'équipe du Pr. Garrett (partenaire du contrat européen *Euwol*, Danemark).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Animaux

Les animaux utilisés appartiennent à l'espèce *A. vulgare* Latreille (1804) hébergeant *w*Vul. Les animaux sont maintenus dans une salle à 20°C, en photopériode naturelle ou en photopériode stimulante: 18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité (18/6 : L/D) (voir également annexe 1).

Tous les animaux utilisés pour l'extraction du chromosome bactérien appartiennent à la même souche, et ont pour origine géographique le site de Celles-sur-Belle (79, France). Cette population est entretenue au laboratoire depuis plusieurs années.

2.2 Long Range PCR

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Toutes les expériences de LR PCR ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. Kostas Bourtzis (Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, Héraklion, Crête, Grèce) lors de deux séjours de 5 semaines (Février-Mars 2001 et Juillet-Août 2002).

2.2.1 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN s'effectue selon la méthode au CTAB (Hexa-decyltrimethyl-ammonium bromide) (voir annexe 1, § 9. Dissection des animaux).

Les ovaires (n=10), prélevés à partir de femelles infectées, sont incubés dans 300 µl de tampon d'extraction CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, Tris 0.1 M pH8, β-mercaptoéthanol 0.2%) pendant 5 min à 65°C. Les ovaires sont ensuite broyés à l'aide d'un piston pellet bleu en polypropylène (Merck Eurolab). L'homogénat est incubé une deuxième fois à 65°C pendant 10 min, en agitant le tube toutes les 2 min. Un volume équivalent de chloroforme est ajouté, l'homogénat est agité pendant 3 min, puis centrifugé pendant 10 min à 9000 rpm, à température ambiante. Après récupération de la phase aqueuse (1 volume), 3/4 de volume d'isopropanol sont ajoutés et l'homogénat est agité jusqu'à l'apparition d'un précipité d'ADN. Une centrifugation à 12 000 rpm pendant 3 min permet d'isoler ce précipité. L'ADN est ensuite rincé à l'éthanol 70°, puis séché à l'air libre pendant environ 30 min. Le culot est solubilisé dans de l'eau distillée stérile, le volume de solubilisation est estimé selon la quantité d'ADN visible (taille culot). Un traitement RNAse (0.5 U) est effectué à 37°C, pendant 1 heure. La qualité de l'ADN et l'élimination des ARN sont vérifiées sur gel d'agarose 0.8%. Le dosage de l'ADN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre par mesure de la DO à 260 nm, et la pureté de l'échantillon est estimée grâce au rapport de DO 260/280.

2.2.2 Choix des amorces

Au moment des expériences, le génome de *w*Mel était en cours de séquençage, trois contigs (numéros d'attribution 21334, 21335 et 21336 de 102 578 pb, 189 801 pb et 966 998 pb respectivement) étaient séquencés et représentaient 1 259 377 pb. Le génome complet de *w*Mel est désormais déposé dans la base de données Genbank sous le numéro d'accession NC002978, et possède une taille de 1 267 782 pb.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Toutes les amorces utilisées ont été fournies par le Dr. Kostas Bourtzis, IMBB, Héraklion, Grèce. Ces amorces partagent 100% d'identité avec le génome de *w*Mel, et ont été dessinées environ tous les 10 kb sur les trois contigs de *w*Mel, de façon à couvrir entièrement le génome, chaque amorce ayant une température d'hybridation élevée, supérieure à 60°C. Au total, 144 couples d'amorces ont été formés.

2.2.3 Réactions d'amplification (LR PCR)

Les réactions de Long-Range PCR ont été réalisées avec le kit Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen, Life technologies) dans un volume final de 50 µl. Deux solutions (1 et 2) sont préparées extemporanément sur de la glace. La solution 1 contient la matrice d'ADN (500 ng), les amorces (250 mM chacune) et les nucléotides (200 µM pour chaque dNTP), dans un volume final de 20 µl. La solution 2 contient 2µl d'Elongase® et un mélange des deux tampons de réaction A et B [Tampon A (3µl), Tampon B (7 µl)] donnant la concentration finale suivante : Tris-SO_4 60 mM pH 9.1, $(NH_4)_2SO_4$ 18 mM, $MgSO_4$ 1.7 mM. Le volume de la solution 2 est complété à 30 µl avec de l'eau distillée stérile. Les solutions 1 et 2 sont ensuite mélangées par agitation douce et recouverte par deux gouttes d'huile minérale. Les conditions de Long-Range PCR consistent en une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, 30 cycles de dénaturation (94°C pendant 30 sec), hybridation (50°C pendant 30 sec) et extension (68°C, 1 min par kb), puis un dernier cycle de 10 min à 68°C.

2.2.4 Analyse des produits d'amplification

Les produits d'amplification (10 µl) sont analysés sur un gel d'agarose 0.8% dans du tampon TAE 1X (Tris-acetate 40 mM, EDTA 1 mM) et visualisés grâce au Bromure d'éthidium (BET). Leur taille est vérifiée à l'aide d'un marqueur de masse moléculaire approprié.

2.3 Caractérisation du chromosome bactérien

2.3.1 Matériel biologique

L'extraction d'ADN bactérien est réalisée à partir d'ovaires de femelles infectées d'*A. vulgare* (souche Celles-sur-Belle, 79), âgées d'environ 1 an. La taille optimale des ovocytes

est comprise entre 100 µm et 300 µm (figure 1.1). Ces ovocytes en première phase de vitellogenèse présentent une accumulation restreinte de réserves vitellines et une stabilité du volume du noyau (Besse, 1976). Lors du repos sexuel hivernal, les femelles ont été placées plusieurs semaines en photopériode stimulante (L/D : 18/6) afin d'obtenir des ovocytes de taille optimale.



Figure 1.1: Photo de deux ovaires d'une femelle F d'*A. vulgare*, en première phase de vitellogenèse.

2.3.2 Isolement des bactéries

Les ovaires de femelles F (n=25) sont prélevés puis directement déposés dans 500 µl d'une solution iso-osmotique de PBS-sucrose-glutamine (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 7.8 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.47 mM pH 7.4, L-glutamine 5 mM, Saccharose 0.25 M) maintenue sur de la glace. Les ovaires sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un broyeur de tissus Potter de Thomas, composé d'un piston en Téflon®, d'un cylindre en verre, et d'une tête de piston à embout rond strié (espace piston-cylindre compris entre 130 et 180 µm). L'homogénéisation est réalisée par précisément cinq mouvements de va et vient du piston dans le cylindre. L'homogénat est ensuite centrifugé à 200 X *g* pendant 15 min, à 4°C. Le surnageant est prélevé et soumis à trois centrifugations successives dans les mêmes conditions. Le surnageant final est ensuite centrifugé à 4100 X *g*, pendant 15 min à 4°C, sans frein. Le culot résultant correspond à un culot enrichi en bactéries.

2.3.3 Préparation des échantillons pour l'électrophorèse en champ pulsé

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Le culot obtenu est solubilisé dans environ 40 µl de tampon TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM pH 8). L'échantillon est placé à 37°C, pendant 10 min, puis un volume équivalent d'agarose Low Melting Point 2% (SeaPlaque® GTG® agarose, Biocompare Inc.) préparé dans du tampon TE 1X, préalablement chauffé à 50°C est ajouté. Le mélange est rapidement placé dans un moule permettant d'obtenir des blocs d'agarose dont la taille (1 mm x 0.5 cm x 1 cm) correspond à celle des puits du gel d'électrophorèse en champ pulsé. Les blocs sont démoulés et incubés dans 400 µl de tampon DNAse (Tris-HCl 1 mM pH8, $MgCl_2$ 1 mM), contenant 100 U de DNAse (Promega), pendant 40 min à température ambiante. Les blocs sont ensuite transférés dans 1.47 ml de tampon de lyse (EDTA 100 mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH 8, N-laurylsarcosine sodium salt 1% (w/v)) contenant 0.6 mg de protéinase K, à 50°C (2 fois 24h). Les blocs sont successivement rincés à température ambiante dans 1.5 ml de tampon TE 1X (2 fois 30 min), puis dans 1.5 ml de tampon TE 1X-PMSF 1 mM (2 fois 30 min), afin d'inhiber la protéinase K, et enfin dans 1.5 ml de tampon TE 1X (2 fois 30 min). Les blocs sont ensuite stockés dans une solution d'EDTA 50 mM pH 8, à 4°C.

2.3.4 Digestion de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien contenu dans les blocs d'agarose a été digéré par différentes endonucléases de restriction (tableau 1.1). Les blocs sont préincubés dans le tampon de réaction de l'enzyme pendant une heure à température ambiante. Puis, la digestion s'effectue dans un volume de 150 µl contenant 50 U d'enzyme, pendant 24h, à la température optimale de digestion de l'enzyme. L'arrêt de la réaction s'effectue par ajout de 500 µl d'EDTA 0.5 M pH 8. Les blocs peuvent être stockés plusieurs semaines à 4 °C dans de l'EDTA 50 mM, pH 8.

Endonucléase de restriction	Site de coupure
Apa I	5′…GGGCCC…3′ 3′…CCCGGG…5′
Asc I	5′…GGCGCGCC…3′ 3′…CCGCGCGG…5′
Fse I	5′…GGCCGGCC…3′ 3′…CCGGCCGG…5′
I-Ceu I	5′…TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA…3′ 3′…ATTGATATTGCCAGGATTCCATCGCT…5′
Sma I	5′…CCCGGG…3′ 3′…GGGCCC…5′

Tableau 1.1: Endonucléases de restriction utilisées et site de reconnaissance. Le site de coupure associé est indiqué par des flèches.

2.3.5 Electrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé est réalisée sur un gel d'agarose LMP 1% (14 cm X 13 cm, épaisseur 0.5 cm), dans du tampon TBE 0.5 X (Tris-Borate 45 mM, EDTA 1 mM pH8). Les blocs sont ensuite insérés dans les puits du gel.

L'électrophorèse en champ pulsé (BioRAD CHEF-DR (r) II BioRad®) s'effectue dans du tampon TBE 0.5 X, à 14 °C, pendant 24 h, avec un temps initial de commutation de 60 sec et un temps final de 120 sec, sous un angle de 120°, et avec un gradient de voltage fixé à 6 Volts par cm de gel. L'ADN bactérien non digéré ou les fragments de restriction sont visualisés grâce au Bromure d'éthidium (BET). Les tailles sont calculées à l'aide du logiciel GelCompar®II (Applied Maths).

2.3.6 Southern blot et hybridation

2.3.6.1 Transfert d'ADN sur membrane de Nylon®

Le transfert de l'ADN du gel sur la membrane de Nylon® (Hybond-N^+ nylon membrane, QBiogene®) s'effectue à l'aide du VacuGene™ XL (Pharmacia LKB

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Biotechnology) par utilisation de vide à basse pression à 50 mbar, selon les instructions du fournisseur. La membrane est ensuite séchée pendant 2 h à 80°C.

2.3.6.2 Marquage radioactif de sondes

Pour la détection de l'ADN bactérien (souche *w*Vul), les sondes utilisées correspondent à l'ADNc du gène *wsp* présent en une seule copie sur le génome bactérien (Braig et al., 1998) et à l'ADNc de l'ORF 7 de l'ADN de *phage* présent en plusieurs copies sur le génome bactérien (n≥ 5) (Braquart-Varnier, communication personnelle). Pour la détection de l'ADN de l'hôte, la matrice utilisée correspond à l'ADNc du gène codant l'*hormone androgène* (HA), et enfin pour la détection de l'ADN mitochondrial de l'hôte, l'ADNc codant l'*ARNr 16S* a été utilisé. L'ensemble des sondes a été obtenu par amplification par PCR à l'aide des amorces citées dans le tableau 1.2. Les matrices d'ADN utilisées pour les réactions d'amplification correspondent à l'ADN génomique de femelles infectées pour les sondes *wsp*, *phage* et *HA*, et à l'ADN mitochondrial pour la sonde *ARNr 16S*. Les sondes sont préparées à partir de 100 ng de produit de PCR purifié à l'aide du kit Jet Pure (PCR Product Purification and Concentration, Genomed Inc., USA) selon les instructions du fournisseur. Chaque fragment d'ADNc (100 ng dans 22 µl d'eau stérile), devant être utilisé comme sonde nucléotidique, est dénaturé par la chaleur (95°C pendant 5 min), puis refroidi sur de la glace. La solution est mélangée à 5 µl d'une solution d'hexadésoxyribonucléotides (amorces aléatoires, Pharmacia), 20 µl de tampon de réaction (N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonate] (HEPES) 0.5 M, pH 6.6, $MgCl_2$ 12 mM, β-mercaptoéthanol 25 mM, Tris-HCl 12 mmol, pH 8), contenant les désoxyribonucléotides dATP, dTTP, dGTP (0.1 mM chacun), 2 µl de la solution de nucléotide radioactif [α-^{32}P]-dCTP, (3 Ci/µmole, 10 µCi/µl, Amersham) et 0.8 µl d'une solution d'ADN polymérase (fragment de Klenow, 6 U/µl, Gibco-BRL) (Feinberg et Vogelstein, 1983). Le mélange réactionnel est incubé pendant 2 h à 37°C, et la réaction arrêtée par l'addition de 20 µl d'une solution d'EDTA 0.5 M (pH 8). Une fraction de 0,5 µl est prélevée avant l'arrêt de la réaction, et précipitée dans 5 ml d'acide trichloroacétique 10%. Après filtration sur membrane Whatman GF/C, la radioactivité incorporée est mesurée à l'aide d'un compteur β à scintillation.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.3.6.3 Hybridation

La membrane est réhydratée dans une solution d'EDTA 2 mM pH 8, SDS 0.1%, puis préhybridée pendant deux heures à 42°C dans le tampon d'hybridation [formamide 40%, dextran sulphate 10%, SSC 4X, Denhardt's solution 1X (Ficoll type 400 10 mg/ml, BSA 10 mg/ml, Polyvinylpyrrolidone 10 mg/ml), Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 0.3 mg/ml de sperme de saumon fraîchement dénaturé]. L'hybridation est réalisée pendant toute la nuit à 42°C dans le tampon d'hybridation contenant la sonde radioactive. La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 30 min avec une solution de SSC 2X, SDS 0.1% à température ambiante, puis deux fois 30 min à 52°C avec une solution de SSC 0.1X, SDS. 0.1%. La radioactivité est révélée par un phosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.).
Les amorces utilisées sont consignées dans le tableau 1.2 ci-après :

Gène cible	Détection	Nombre de copies	Séquences des amorces
Wsp	ADN bactérien	1	Wsp 81F : 5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3' Wsp 691R : 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3' (Braig et al., 1998)
Phage	ADN bactérien	≥5	phg WOF : 5' CCC ACA TGA GCC AAT GAC GTC TG 3' phg WOR : 5' CGT TCG CTC TGC AAG TAA CTC CAT TAA AAC 3' (Masui et al., 2001)
HA	ADN génomique de l'hôte	1	HA 35 : 5' AAA GGA TCC ACT AAC ATG AAG GGT CTC GTC AT 3' HA 28 : 5' CAG AGG GAA TAC TCA GTG CCC GTG GAT G 3' (Grève et al., non publié)
ARNr 16S	ADN mitochondrial de l'hôte	≥1	984F : 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' 986R : 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T 3' (Borgo et al., 1996)

Tableau 1.2: Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des sondes radioactives.

2.4 Banque d'ADN bactérien

Les expériences brièvement décrites ci-dessous ont été réalisées par le docteur Lanming Chen, dans le laboratoire du Pr. Garrett, Institute of Molecular Biology, Copenhague, Danemark.

2.4.1 Extraction d'ADN à partir du gel de champ pulsé

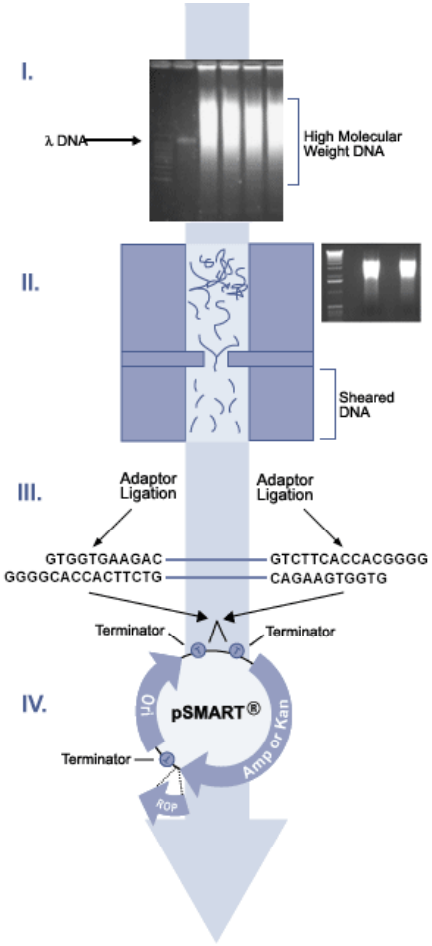
Les bandes correspondant à l'ADN bactérien, visualisées sur gel d'agarose LMP issu de l'électrophorèse en champ pulsé, sont excisées du gel. L'ADN est isolé de l'agarose par utilisation de la Gelase™ Agarose (Gel-Digesting Preparation, Epicentre Technologies).

2.4.2 Shot-gun Library

L'ADN extrait de l'agarose est nébulisé afin de produire au hasard des fragments d'environ 2 kb. Les fragments générés sont clonés dans un vecteur M13 en utilisant la méthode des doubles adaptateurs (figure 1.2) (Andersson et al., 1998). Le séquençage au hasard de quelques uns de ces clones permet de tester la qualité et la richesse de la banque en ADN bactérien. Les données issues du séquençage seront assemblées grâce à l'utilisation des programmes PHRED et PHRAP. Les intervalles entre les contigs seront résolus par Long-Range PCR. Les séquences seront ensuite organisées selon le programme CapDB et les ORF seront identifiées à l'aide du programme BioWish. Les annotations des ORF seront réalisées par une approche phylo-génomique par l'utilisation de BlastX.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.2 :</u> Schéma expliquant les étapes de la construction d'une Shot-gun Library en vue du séquençage du génome bactérien. I : Extraction d'ADN à partir du gel d'agarose; II : Fragmentation de l'ADN ; III : Ligation ; IV : Clonage.
(http://www.agencourt.com/services/shotgun_library/)

3. RESULTATS

3.1 Long-Range PCR

Toutes les expériences de LR PCR ont été effectuées lors de mon séjour dans le laboratoire du Pr. Kostas Bourtzis, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Héraklion, Grèce.

Au total, 144 couples d'amorces couvrant entièrement le génome de *w*Mel ont été testés en LR-PCR sur l'ADN génomique de *w*Vul. Quarante de ces couples ont donné un signal positif et se situent sur le contig 21336 de *w*Mel. Sept d'entre eux amplifient un

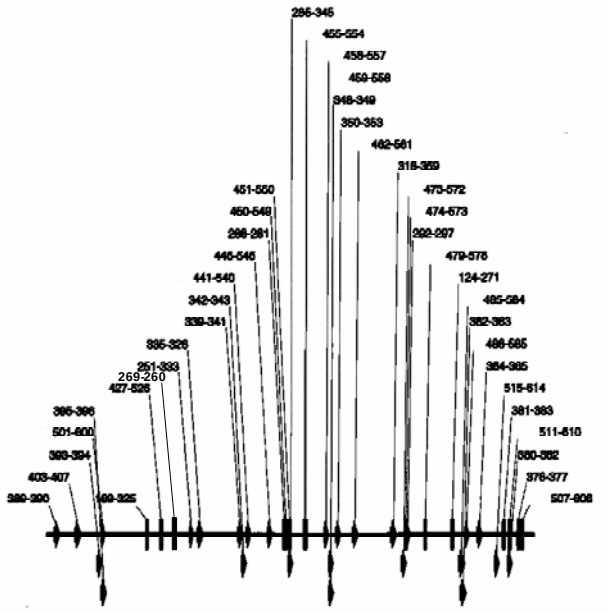
fragment exactement à la taille attendue selon le génome de *w*Mel (tableau 1.3). Pour chacune des LR PCR réalisées, les couples d'amorces ont parallèlement été testés sur ADN de *w*Mel et ont donner des signaux positifs à la taille attendue.

	Amorce sens		Amorce anti sens		
Taille attendue (kb)	**n°**	**position**	**n°**	**position**	**Taille obtenue *w*Vul (kb)**
14	389	17369	390	31393	*14
16,9	403	71423	407	86820	6,0
11,9	393	130310	394	142174	*11,9
10,6	501	139599	600	150260	10,0
13,6	395	140589	396	154186	7,5
5,2	169	165362	325	170513	*5,2
6,7	427	297006	526	303723	8,0
10,5	269	351293	260	361777	2,6
10,9	251	369796	333	380687	*10,9
15,4	335	388336	326	393336	5,0
10,1	281	423077	286	433864	5,2
12	339	496637	341	508632	7,0
13,9	342	504953	343	518838	0,5
12,7	441	517955	540	530655	3,0
13	446	573187	545	586220	0,5
10,4	450	622763	549	633211	3,4
12,8	285	627762	345	640472	3,0
9,2	451	631251	550	640473	0,5
5,1	455	671040	554	676140	*5,1
12,4	458	719653	557	732041	7,0
13,1	459	731472	558	744581	8,0
13,3	348	731499	349	744696	0,5
13,4	350	749872	353	763128	6,0
14,6	462	793291	561	807919	0,5
14,3	318	906524	359	910524	4,0
13,5	473	920429	572	933990	18,0
10,1	474	932342	573	942515	10,2
10,8	292	942575	297	931798	*10,8
9,4	479	983439	578	992891	12,0
14,9	124	1044345	271	1054345	10,0
16,8	485	1069701	584	1086470	15,0
15,4	362	1074760	363	1090043	5,0
12,5	486	1085173	585	1097654	5,0
15,3	364	1117450	365	1132739	0,5
10,2	515	1166487	614	1176487	10,0
9,2	381	1197147	383	1188171	0,5
7,8	511	1211368	610	1203547	*7,8
13,7	380	1210495	382	1196862	6,0
3,2	376	1229905	377	1226678	10,0
9,9	507	1245382	606	1235502	5,0
468,7					**261,1**

<u>Tableau 1.3:</u> LR-PCR positives sur ADN de *w*Vul, la taille attendue et la position sur le génome de *w*Mel sont indiquées, ainsi que le numéro attribué à l'amorce. * : fragment amplifié à partir d'ADN de *w*Vul ayant exactement la même taille que le fragment amplifié à partir d'ADN de *w*Mel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

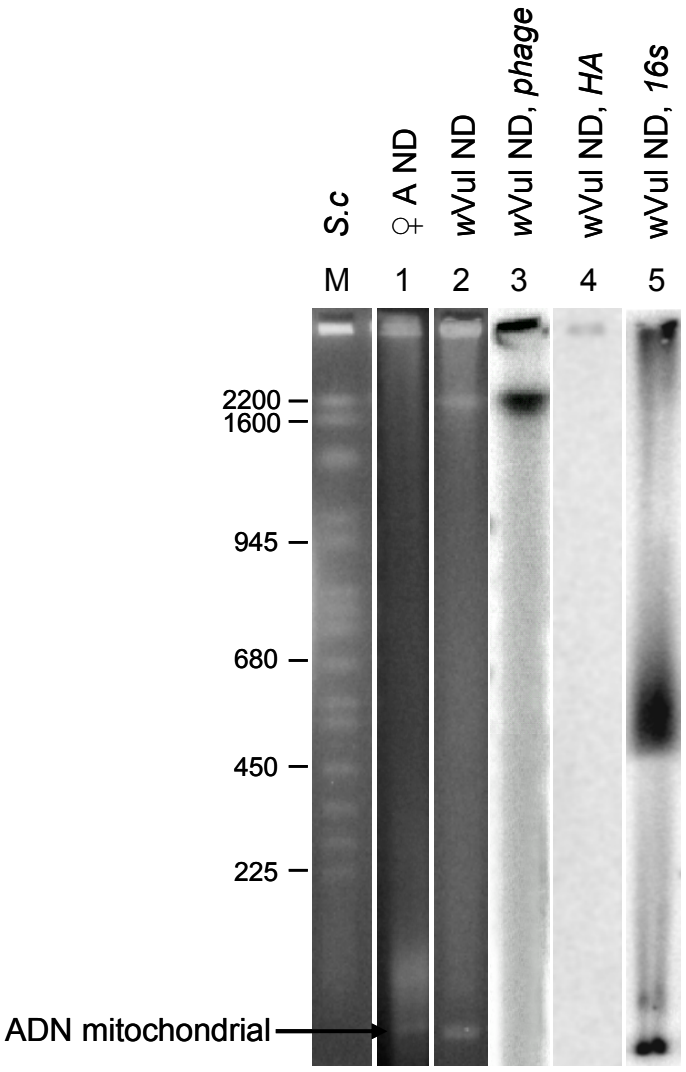
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.3 :</u> Positionnement sur le contig 21336 de *w*Mel des amplicons positifs obtenus par LR-PCR sur ADN de *w*Vul. Les nombres correspondent aux amorces utilisées.

Les autres couples d'amorces donnent des amplicons à des tailles différentes de celles attendues (de 13.4 kb à 0.1 kb). Cependant, les faibles différences de taille observées pour trois des amplifiats (couples d'amorces 501/600 ; 474/573 ; 515/614) peuvent être dues à des irrégularités de migration dans les gels d'agarose. La somme des fragments obtenus indique que 261.1 kb de l'ADN de *w*Vul ont été amplifiées (tableau 1.3). Ces amplifiats sont en cours de séquençage. Les mêmes PCR positives sur ADN de *w*Mel ont permis d'amplifier un total de 468.7 kb. Comme nous avons estimé la taille de *w*Vul à environ 1760 kb (voir chapitre I, § 3.2.2.3 Taille du génome de *w*Vul), nous pouvons estimer que les amplifications réalisées en LR-PCR représentent environ 15 % du génome. Le positionnement sur le contig 21336 de *w*Mel des quarante amplifiats obtenus sur ADN de *w*Vul montre une répartition homogène (figure 1.3). Il demeure néanmoins de grands intervalles, parfois d'une centaine de kb qui ne peuvent être amplifiés par LR PCR.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.4 :</u> Electrophorèse en champ pulsé d'ADN non digéré. Piste 1, ADN extrait de femelles *A. vulgare* non infectées (♀A); piste 2, ADN *w*Vul non digéré; piste 3, autoradiographie correspondante de la piste 2 hybridée avec la sonde bactérienne *phage*; piste 4, autoradiographie correspondante de la piste 2 hybridée avec la sonde *HA;* piste 5, autoradiographie correspondante de la piste 2 hybridée avec la sonde *ARNr 16 mitochondrial*; Piste M, Marqueur de taille *Saccharomyces cerevisae (*2200 kb, 1600 kb, 1125 kb, 1020 kb, 945 kb, 825 kb, 785 kb, 750 kb, 680 kb, 610 kb, 565 kb, 450 kb, 365 kb, 285 kb, 225 kb).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.2 Purification de l'ADN bactérien de *w*Vul

La méthode de centrifugations différentielles, adaptée à partir du protocole de Sun et al. (2001), nous a permis d'obtenir une fraction subcellulaire enrichie en *Wolbachia* à partir des ovocytes d'*A. vulgare*. Plusieurs paramètres ont cependant dû être modifiés et adaptés à notre matériel biologique. L'extraction d'ADN à partir du culot enrichi en bactéries nous a permis de caractériser le génome de *w*Vul et de produire de l'ADN bactérien en grande quantité afin de réaliser une banque d'ADN génomique.

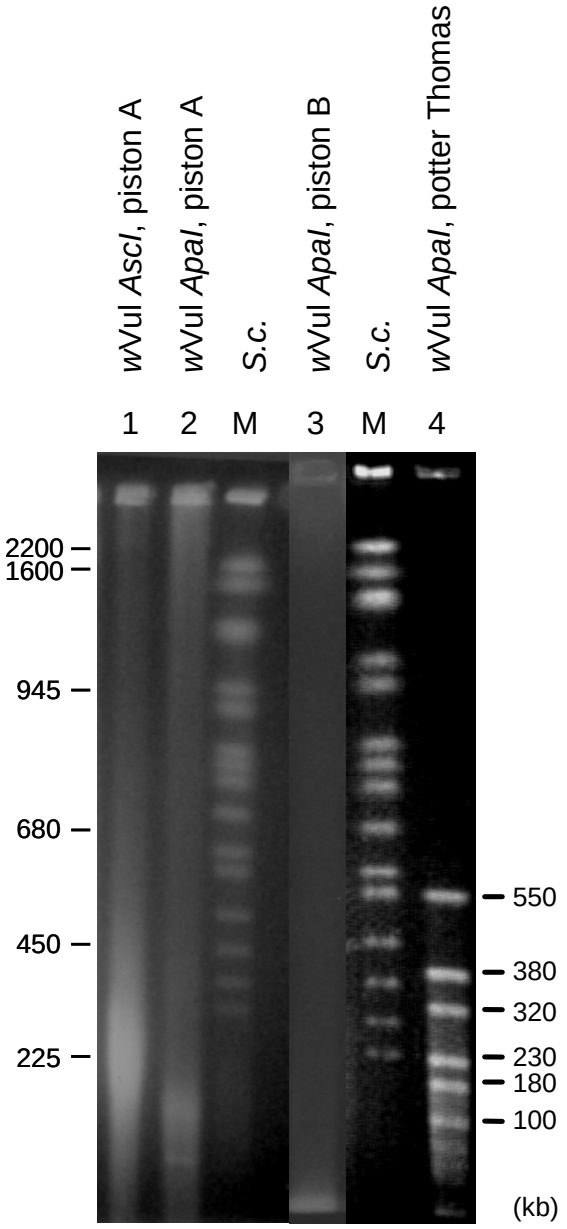
3.2.1 Adaptation du protocole expérimental

L'ADN génomique de *w*Vul non digéré a été mis en évidence par électrophorèse en champ pulsé et visualisé par le bromure d'éthidium (figure 1.4, piste 2). Cette bande n'est pas visible dans les préparations issues des ovocytes non infectés (piste 1). De plus, l'hybridation du Southern blot correspondant avec la sonde bactérienne *phage* révèle que cette bande correspond bien à de l'ADN génomique de *Wolbachia* (figure 1.4, piste 3). Aucun signal n'a été détecté sur ce même Southern blot hybridé avec une sonde d'ADNc codant l'HA (figure 1.4, piste 4). Cette expérience montre également qu'une quantité importante d'ADN de *Wolbachia* ne pénètre pas dans le gel et reste piégée dans le puits (figure 1.4, pistes 2 et 3). L'ADN mitochondrial d'*A. vulgare*, dont la taille a été déterminée à 28 kb (Raimond et al., 1999), a également pu être visualisé et identifié par cette technique (figure 1.4, piste 5). Enfin, l'absence de bande supplémentaire suggère que cette bactérie ne renferme pas de plasmide.

Afin d'obtenir de tels résultats, une longue mise au point des premières étapes du protocole a été nécessaire : le choix du broyeur de cellules, la taille des ovocytes et du noyau et le nombre d'ovaires par rapport au volume de tampon d'homogénéisation ont été des paramètres critiques pour l'obtention de résultats fiables et reproductibles, notamment après utilisation d'endonucléase de restriction.

L'étape du broyage des tissus est une étape critique car elle doit permettre de casser la membrane de la cellule hôte sans endommager les bactéries ni les noyaux de la cellule hôte. Ces derniers pourront être éliminés par centrifugation permettant l'isolement des bactéries dans le surnageant sans contamination par de l'ADN de l'hôte. Le choix d'un broyeur de tissus s'est donc effectué tout d'abord en fonction de l'espace « piston-cylindre », puis en

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.5:</u> Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul extrait après utilisation de différents types de broyeurs de tissus. Pistes 1 et 2, Homogénéiseur de dounce (piston A), espace « piston-cylindre » compris entre 25 et 76 µm; piste 3, Homogénéiseur de dounce (piston B), espace « piston-cylindre » compris entre 89 et 165 µm; piste 4, Potter de Thomas, espace « piston-cylindre » compris entre 130 et 180 µm; piste 1, ADN digéré par *AscI* ; pistes 2, 3 et 4 : ADN *w*Vul digéré par *ApaI*; piste M, Marqueur de taille *Saccharomyces cerevisae.*

fonction de l'aspect des profils des ADN bactériens obtenus après électrophorèse en champ pulsé.

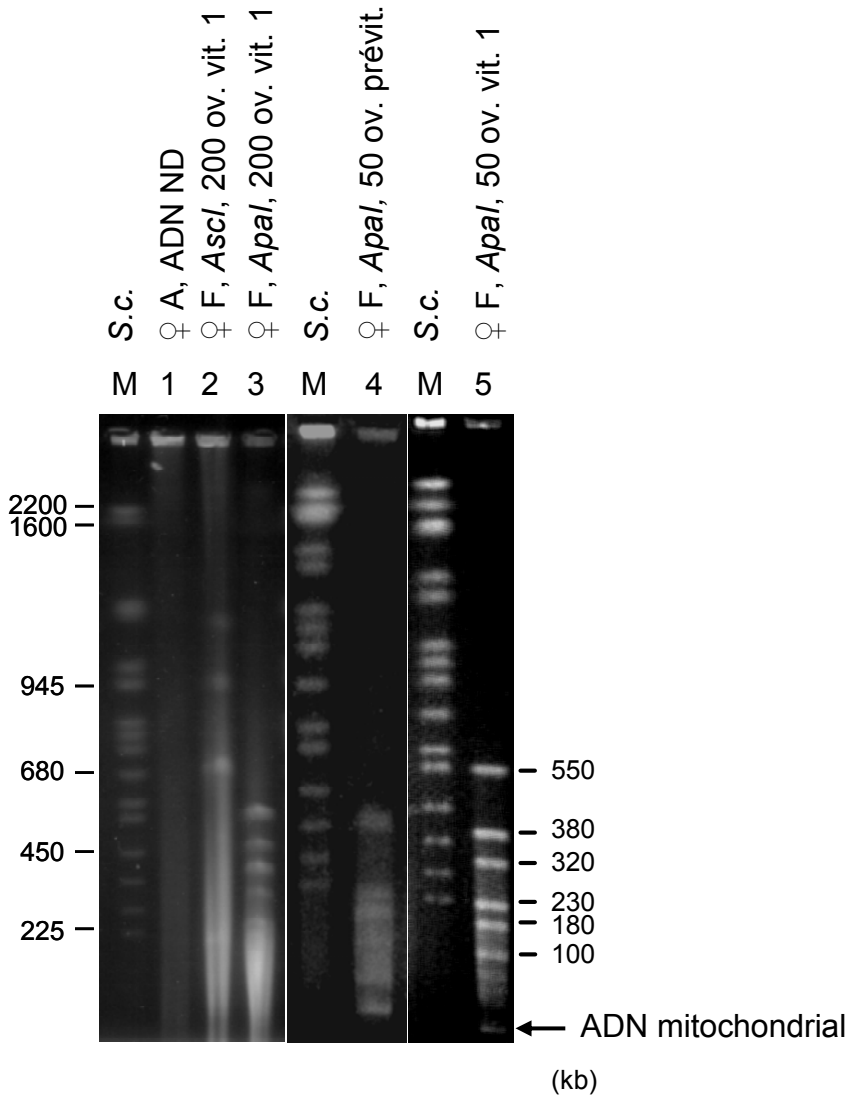
Deux broyeurs de tissus ont été testés : un homogénéiseur de dounce (Kontes, Glass Compagny) possédant un espace « piston-cylindre » compris entre 25 et 76 µm (piston A), ou entre 89 et 165 µm (piston B), et un homogénéiseur Potter de Thomas possédant un espace « piston-cylindre » compris entre 130 et 180 µm (Potter de Thomas, piston Téflon®, cylindre verre, tête de piston à embout rond strié). Seul ce dernier permet d'obtenir des profils d'ADN non dégradé. En effet, l'utilisation du piston A entraîne une dégradation de l'ADN (figure 1.5, pistes 1 et 2) et le piston B ne permet pas une récupération satisfaisante de l'ADN, les fragments du chromosome bactérien n'étant pas visible aux UV (figure 1.5, piste 3).

Il a également fallu tenir compte de la variation de la taille des ovocytes et de leur noyau au cours de la vitellogenèse. En effet, lors de la maturation des ovocytes, différents stades de développement sont observés (prévitellogenèse, 1ère et 2ème phase de vitellogenèse) au cours desquels l'augmentation de la taille des cellules (environ 7 fois) s'accompagne d'une augmentation de la taille des noyaux (de 2 à 3 fois) (tableau 1.4).

Lorsque des ovocytes à l'état de repos (prévitellogenèse) sont utilisés comme matériel de départ, les résultats d'électrophorèse en champ pulsé révèlent des profils d'ADN dégradé (figure 1.6, piste 4). Ceci est dû à l'espace piston-cylindre du broyeur qui n'est pas approprié pour casser les ovocytes et donc pour libérer les bactéries de la cellule hôte. Des expériences similaires ont également été réalisées à partir d'ovaires en vitellogenèse secondaire (2ème phase de vitellogenèse). Les électrophorèses en champ pulsé correspondantes révèlent également des profils d'ADN dégradé, et contaminés par de l'ADN de l'hôte (non illustré). En effet, certains noyaux d'ovocytes ont éclaté lors de l'homogénéisation du fait de leur taille plus importante et variable (tableau 1.4). De plus, même si l'espace piston-cylindre est plus grand que les noyaux des ovocytes, les mouvements mécaniques dus à l'homogénéisation semblent tout de même briser ces noyaux. Les meilleurs résultats ont enfin été obtenus en utilisant des ovocytes en vitellogenèse primaire (1ère phase de vitellogenèse), la taille de ces derniers étant relativement constante (figure 1.6, piste 5). Afin de standardiser les expériences ultérieures et d'obtenir des ovocytes en première phase de vitellogenèse lors des périodes hivernales de repos sexuel, les femelles ont été placées en photopériode stimulante (18 h de lumière, 6h d'obscurité). Dans ces conditions, les ovocytes ont une taille comprise entre 100 µm et 300 µm et le noyau conserve un volume constant (figure 1.1).

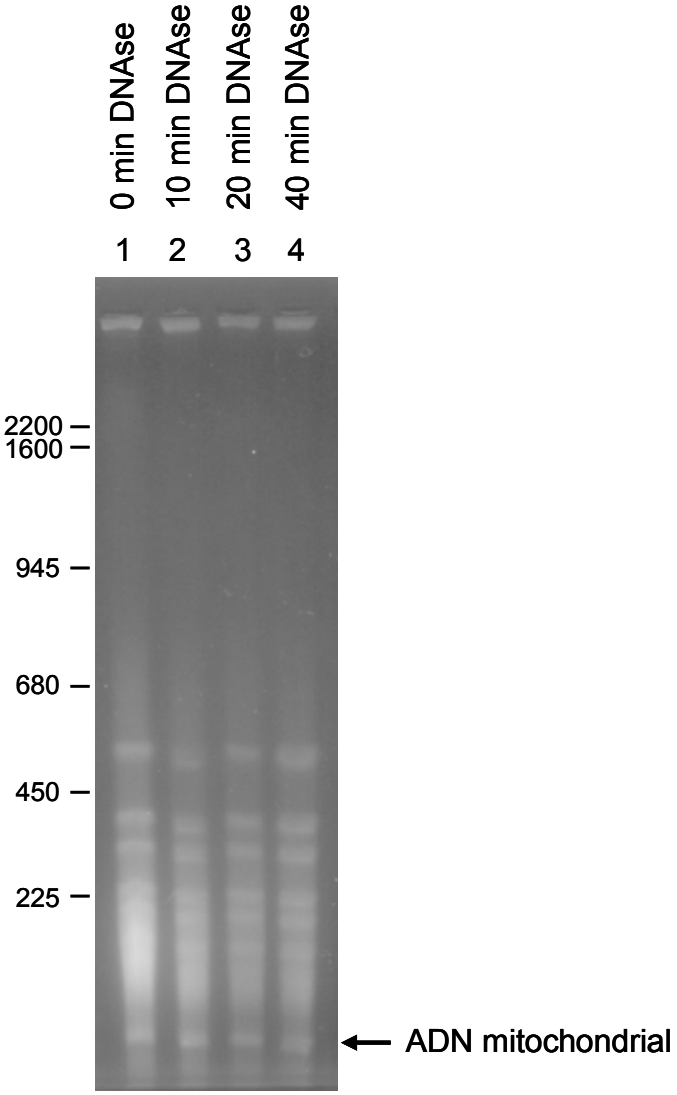
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.6 :</u> Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul digéré par les endonucléases de restriction *ApaI* ou *AscI*. Piste 1, ADN non digéré extrait de 200 ovaires de femelles non infectées (♀A) en vitellogenèse primaire; piste 2, ADN digéré par *AscI* extrait de 200 ovaires de femelles infectées (♀F) en vitellogenèse primaire; piste 3, ADN digéré par *ApaI* extrait de 200 ovaires de ♀F en vitellogenèse primaire; piste 4, ADN digéré par *ApaI* extrait de 50 ovaires de ♀F en prévitellogenèse; piste 5, ADN digéré par *ApaI* extrait de 50 ovaires de ♀F en vitellogenèse primaire (conditions optimales); piste M, Marqueur de taille *Saccharomyces cerevisae.*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.7 :</u> Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul traité à la DNAse I (40 µg/ml) digéré par l'endonucléase de restriction *ApaI*. La quantité d'ADN par piste correspond à une extraction des bactéries à partir de 8 ovaires. Piste 1, pas de traitement DNAse; piste 2, 10 min de traitement DNAse; piste 3, 20 min de traitement DNAse; piste 4, 40 min de traitement DNAse.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Enfin, nous avons déterminé le rapport optimal entre le nombre d'ovaires et le volume de tampon d'homogénéisation iso-osmotique pour les cellules de crustacés (670 milli-osmoles). Différentes expériences préliminaires ont consisté à faire varier le nombre d'ovaires (de n=10 à n=200). Comme illustré sur la figure 1.6, les électrophorèses en champ pulsé montrent qu'un homogénat trop concentré en ovaires augmente la quantité d'ADN dégradé (piste 2 et 3). Comme le montre ces deux pistes, l'utilisation de 200 ovaires comme matériel de départ augmente la présence d'ADN de l'hôte dégradé en bas du gel masquant ainsi la présence de certaines bandes d'ADN bactérien issues de la digestion par *ApaI*. Cet ADN dégradé n'est pas visible (piste 5) lorsque 50 ovaires sont utilisés lors de l'expérience.

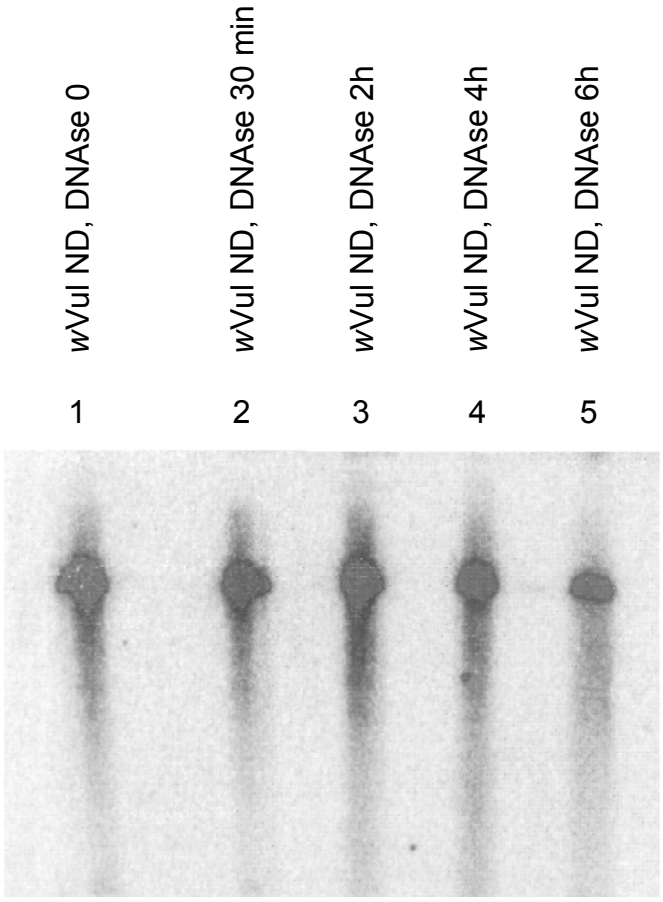
Taille des ovocytes	**Stade de développement**	**Taille du noyau**	**Espace piston – cylindre**
20-110 µm	prévitellogenèse	15 à 43 µm	100 à 300 µm
110-250 µm	1ère phase de vitellogenèse	43 à 50 µm	
250-700 µm	2ème phase de vitellogenèse	50 à 70 µm	

Tableau 1.4 : Taille des ovocytes et de leur noyau en fonction du stade de développement. (D'après Besse, 1976).

Le traitement des échantillons à la DNAse est une étape qui doit être déterminée empiriquement. Son rôle essentiel est de digérer l'ADN résiduel de l'hôte susceptible de contaminer l'échantillon, avant de procéder à la lyse bactérienne. Les conditions optimales de traitement à la DNAse des échantillons ont été déterminées à 40 µg de DNAse I par ml de tampon pendant une durée de 40 min. En effet, l'optimum de digestion de l'ADN dégradé est ainsi obtenu; la figure 1.7 illustre cette quasi disparition d'ADN dégradé notamment dans la partie basse du gel où apparaissent progressivement les bandes d'ADN bactérien. Une hybridation réalisée avec la sonde *HA* ne révèle aucun signal après 40 min de traitement à la DNAse (non illustré) ce qui signifie que l'ADN de l'hôte est majoritairement éliminé après ce traitement. Ce traitement provoque la diminution de la quantité d'ADN mitochondrial, sans pour autant entraîner sa disparition (figure 1.7).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Dans une autre expérience, l'action de la DNAse a été prolongée jusqu'à 6h et l'hybridation du Southern blot correspondant (figure 1.8) avec la sonde bactérienne *phage* montre que la quantité d'ADN de *w*Vul contenue dans les blocs d'agarose ne diminue qu'à partir de 2 h de traitement, sans pour autant le dégrader. Le temps de traitement à la DNAse de 40 min est donc approprié pour éliminer en grande partie l'ADN dégradé (bactérien et de l'hôte) issu de l'homogénéisation sans altérer le chromosome bactérien



<u>Figure 1.8 :</u> Autoradiographie du Southern Blot d'ADN de *w*Vul hybridé avec la sonde *phage*. L'ADN a été traité à la DNAse I à 40 µg/ml à différents temps. Piste 1, pas de traitement DNAse; piste 2, traitement DNAse de 30 min; piste 3, traitement DNAse de 2h; piste 4, traitement DNAse de 4h; piste 5, traitement DNAse de 6h.

.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

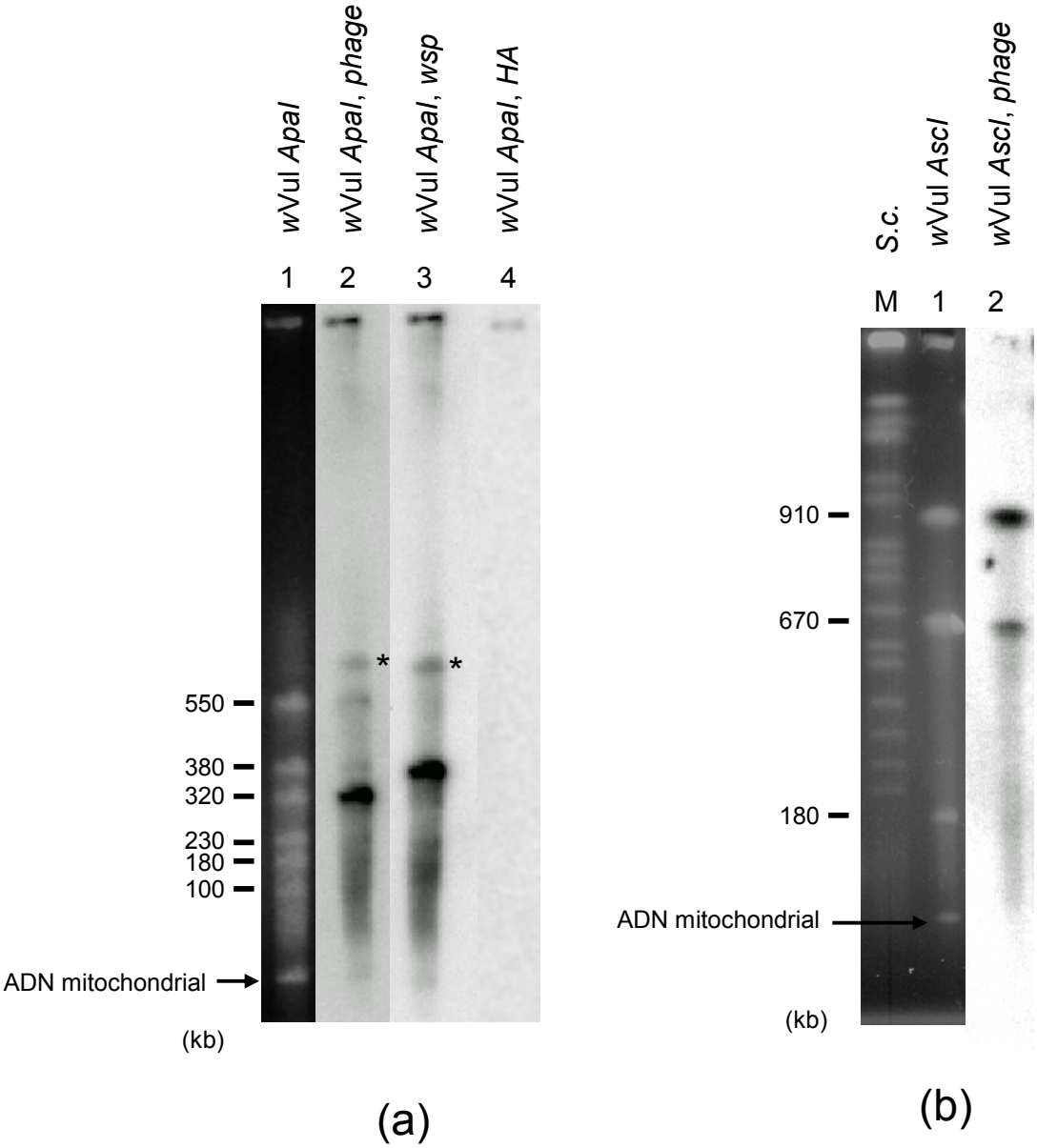


Figure 1.9 : Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul digéré par les endonucléases de restriction *ApaI* et *AscI* et autoradiographie des Southern blot correspondants. (a) Piste 1, fragments issus de la digestion par *ApaI*; piste 2, Southern blot hybridé avec la sonde *phage*; piste 3, Southern blot hybridé avec la sonde *wsp*; piste 4, Southern blot hybridé avec la sonde *HA*. *: bande issue de digestion partielle. (b), Piste 1, fragments issus de la digestion par *AscI*; piste 2, Southern blot hybridé avec la sonde *phage;* piste M, Marqueur de taille *Saccharomyces cerevisae.*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.2.2 Caractérisation du génome bactérien de *w*Vul

3.2.2.1 Digestion par les endonucléases de restriction *ApaI* et *AscI*

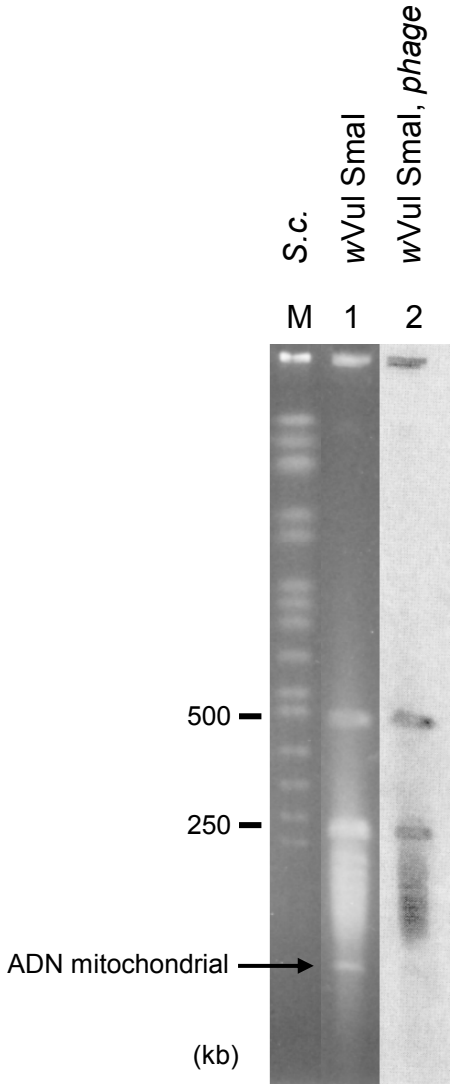
Comme les séquences des quelques gènes connus de *Wolbachia* suggèrent que les génomes de cette bactérie sont riches en A+T (65 à 70%) (Holden et al., 1993 ; Bourtzis et al., 1994 ; Masui et al., 1997 ; Braig et al., 1998), différentes endonucléases de restriction ayant un site de reconnaissance riche en G+C (tableau 1.1) ont été testées. Ces enzymes sont supposées posséder peu de sites de coupure dans le génome de *w*Vul, facilitant ainsi sa caractérisation. De plus, il a été montré que ces enzymes possèdent un faible nombre de sites de coupure dans les génomes de trois autres souches de *Wolbachia* (Sun et al., 2001 et 2003). La coupure du chromosome de *w*Vul par *ApaI* génère 6 fragments compris entre 100 et 550 kb (figure 1.9a). La somme de ces fragments donne un total de 1760 kb (550 kb, 380 kb, 320 kb, 230kb, 180 kb, 100 kb). L'hybridation réalisée avec la sonde *phage* sur le blot correspondant révèle trois fragments visibles aux UV (550, 380 et 320 kb) et l'hybridation avec la sonde *wsp* révèle le fragment de 380 kb. Ces hybridations révèlent également la présence d'une bande supplémentaire à environ 610 kb (figure 1.9a, pistes 2 et 3) correspondant à une digestion partielle, ce fragment de 610 kb donnant les deux bandes à 380 et 230 kb lorsque la digestion est complète.

AscI génère 3 fragments majeurs (910 kb, 670 kb, 180 kb) dont la somme est égale à 1760 kb (figure 1.9b). L'hybridation du Southern blot correspondant avec la sonde *phage* permet de révéler les fragments de 910 et 670 kb (figure 1.9b, piste 2) ; la sonde *wsp* ne révèle que le fragment de 670 kb (non illustré), signifiant qu'il n'existe pas de copie du gène *wsp* sur les fragments de 910 et 180 kb.

3.2.2.2 Digestion par les endonucléases de restriction *FseI*, *I-CeuI* et *SmaI*

Une autre enzyme, *SmaI*, génère 2 fragments de 500 et 250 kb (figure 1.10) et au moins 3 fragments plus petits dont les tailles restent à déterminer en modifiant les conditions d'électrophorèse en champ pulsé.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.10 :</u> Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul digéré par l'endonucléase de restriction *SmaI* et autoradiographie du Southern blot correspondant. Piste 1, fragments issus de la digestion par *SmaI*; piste 2, Southern blot hybridé avec la sonde *phage*; piste M, Marqueur de taille *Saccharomyces cerevisae.*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

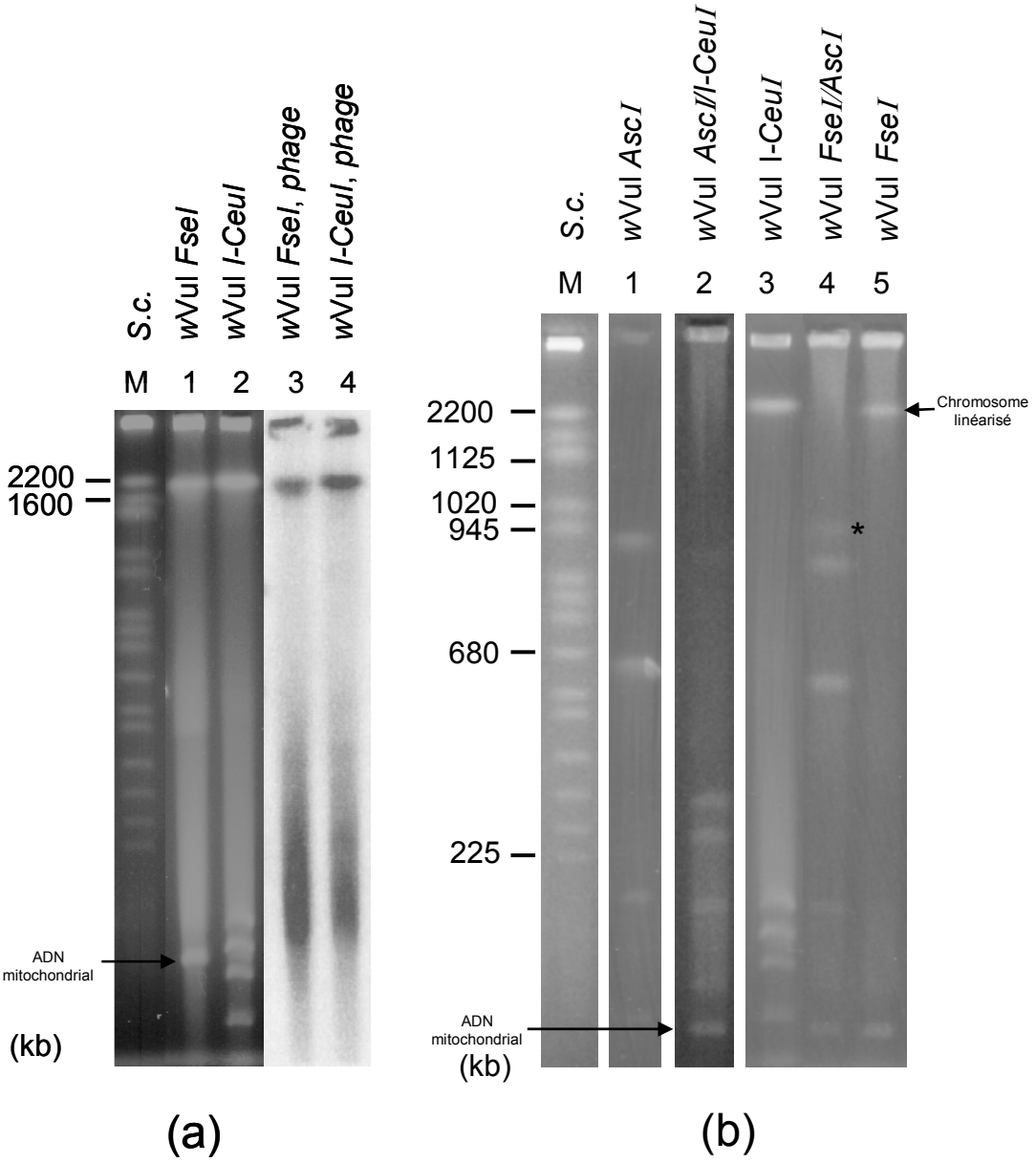


Figure 1.11 : Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de *w*Vul digéré par les endonucléases de restriction *AscI*, *FseI* et *I-CeuI*. (a). Piste 1, ADN de *w*Vul digéré par *FseI*; piste 2, ADN de *w*Vul digéré par *I-CeuI*; pistes 3 et 4, autoradiographie du Southern blot des pistes 1 et 2 hybridées avec la sonde *phage*. (b). Piste 1, ADN de *w*Vul digéré par *AscI; piste 2,* ADN de *w*Vul digéré par *AscI* et *I-CeuI; piste 3,* ADN de *w*Vul digéré par *I-CeuI;* piste 4, ADN de *w*Vul digéré par *FseI* et *AscI*; piste 5, ADN de *w*Vul digéré par *FseI*. *: bande issue de digestion partielle.

L'endonucléase de restriction *I-CeuI* coupe le chromosome en plusieurs sites, générant un grand fragment d'environ 1700 kb, et plusieurs autres petits fragments dont les tailles sont inférieure à 50 kb (figure 1.11a).

La digestion par *FseI* laisse apparaître une bande à la même hauteur que le chromosome linéarisé, laissant penser que cette enzyme possède un seul site de coupure dans le génome bactérien (figure 1.11a). Cependant, la double digestion *FseI/AscI* ne génère que les trois fragments caractéristiques de la simple coupure par *AscI*, signifiant que *FseI* ne coupe pas l'ADN bactérien (figure 1.11b). La bande observée à hauteur du chromosome bactérien est due à une linérisation mécanique qui se produirait lors de l'homogénéisation des tissus (Sun et al., 2001).

3.2.2.3 Taille du génome de *w*Vul

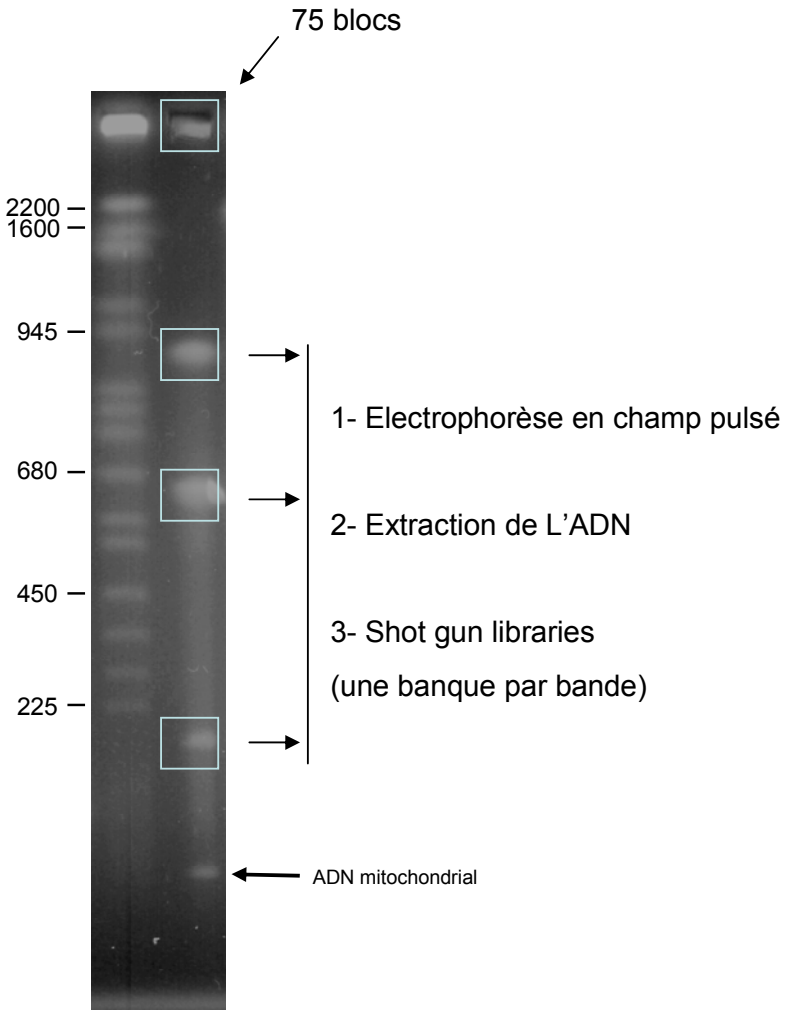
	Taille (kb) des fragments d'ADN après digestion par différentes endonucléases de restriction				
	ApaI	*AscI*	*I-CeuI*	*SmaI*	*FseI*
nombre de site de coupure	6	3	~5	≥5	0
nombre de fragments générés	6	3	≥5	≥5	1
*w*Vul	550, 380, 320, 230, 180, 100 (1760)	910, 670, 180 (1760)	1700, ?	550, 250, ?	1760

Tableau 1.5 : Taille et nombre des fragments d'ADN générés par digestion du génome de *w*Vul par différentes endonucléases de restriction.

Les différentes endonucléases de restriction testées génèrent un petit nombre de fragments, ce qui facilite le calcul de la taille du génome de *w*Vul. Parmi elles, *ApaI*, *AscI*, *I-CeuI* et *SmaI* coupent le génome de *w*Vul en plusieurs fragments. La taille de *w*Vul a été estimée à 1,76 Mb par addition des différents fragments de restriction pour chaque enzyme (tableau 1.5).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 1.12 :</u> Etapes préparatoires pour la construction d'une «shot gun library», réalisée pour le séquençage du génome de *w*Vul.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.3 Banque d'ADN bactérien

Les trois fragments d'ADN de *Wolbachia* obtenus après digestion par *AscI* sont supposés couvrir la totalité du génome. Ce profil de digestion est reproductible et les expériences d'hybridation montre que l'ADN bactérien semble être très faiblement contaminé par de l'ADN de l'hôte. En effet, l'extraction d'ADN bactérien à partir de bandes issues de la coupure enzymatique permet d'augmenter sa pureté, et minimise considérablement la présence d'ADN de l'hôte qui, même s'il n'est pas visible aux UV ou détectable par Southern blot, comigre très souvent avec l'ADN bactérien non digéré (Lanming Chen, communication personnelle). Ainsi, un grand nombre de blocs d'agarose contenant l'ADN bactérien digéré par *AscI* a été produit (75 blocs réalisés chacun à partir d'ADN extrait de 50 ovaires, soit 1875 animaux) et envoyés au laboratoire du Pr. Garrett (équipe danoise partenaire) où Lanming Chen a pu extraire l'ADN bactérien à partir de chacune des trois bandes (figure 1.12). Après concentration de l'ADN extrait à partir de la bande de 670 kb, une banque génomique a été réalisée. L'analyse partielle de quelques centaines de séquences a révélé une identité de l'ordre de 80 à 90% avec le génome de *w*Mel, témoignant de la très grande qualité de l'ADN matriciel. Le séquençage complet du fragment de 670 kb, ainsi que l'analyse des premières informations de séquences sont en cours d'étude. La construction des deux autres banques, à partir des fragments de 910 et 180 kb est également en cours.

4. DISCUSSION

Les études antérieures menées sur *Wolbachia* se sont fortement focalisées sur son aspect ultrastructural et sa localisation cellulaire, les phénotypes induits par la bactérie, et la phylogénie. Les difficultés rencontrées concernant la culture de ce microorganisme, et sa purification ont largement contribué à freiner les progrès des études génétique et moléculaire.

De façon très surprenante, malgré la grande diversité des hôtes de cette bactérie (arthropodes, nématodes) et de leur déterminisme du sexe, *Wolbachia* manipule toujours leur reproduction afin d'augmenter sa propre transmission. *Wolbachia* a-t-elle conservé une seule et même stratégie permettant d'altérer la reproduction chez tous ses hôtes ou au contraire, a-t-elle eu la capacité au cours de l'évolution de s'adapter aux mécanismes mis en place par chacun des différents hôtes ? Aujourd'hui, afin de progresser dans le déchiffrage de la biologie de cet organisme intracellulaire obligatoire, et de l'évolution de la symbiose

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

intracellulaire, de nouvelles approches ont été abordées. O'Neil et ses collaborateurs ont été les précurseurs de ce type d'étude avec la caractérisation des génomes de six souches de *Wolbachia* (Sun et al., 2001), puis de la carte physique et génétique de l'une d'entre elles (Sun et al., 2003). Un projet de séquençage du génome de *Wolbachia* symbiote de *Drosophila melanogaster* (*w*Mel) a fait suite à ces études (septembre 1999). Dans la même optique, nos recherches se basent sur une caractérisation du génome de *w*Vul, et sur la connaissance de ses caractéristiques spécifiques (taille, organisation des sites de restriction, présence des gènes *rrl*). Le projet européen *Euwol*, dans le cadre duquel nous avons mené nos recherches, avait également pour but le séquençage de trois souches de *Wolbachia* induisant trois altérations différentes de la reproduction (IC, parthénogenèse et féminisation). L'analyse des génomes complets de ces trois souches de *Wolbachia* sera l'un des moyens mis en œuvre pour identifier les gènes bactériens impliqués dans ces altérations de la reproduction.

Stratégie de LR PCR

Compte tenu des difficultés rencontrées pour isoler le chromosome bactérien à partir des tissus de l'hôte, comme tous les partenaires impliqués dans le programme *Euwol*, nous avons également abordé la mise en œuvre de la technique de Long Range PCR. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'amorces dessinées dans des régions conservées sur le génome de *w*Mel (en cours d'annotation à ce moment là). Les études phylogénétiques (Werren et al., 1995b ; Bandi et al., 1998 ; Bouchon et al., 1998 ; Lo et al., 2002), ont montré que *w*Mel et *w*Uni appartiennent au clade A, et *w*Vul et *w*No au clade B. Bien que *w*Mel et *w*No n'appartiennent pas au même clade, le Pr. Bourtzis et son équipe ont réussi à amplifier une grande partie du génome de *w*No (clade B) à partir des amorces dessinées sur le génome de *w*Mel (clade A). Suite à cette réussite, nous avons envisagé une approche similaire avec les mêmes amorces, pour *w*Vul bien que là aussi ces deux souches appartiennent à des clades différents. De plus, la conservation des séquences nucléotidiques jusque là étudiées entre différentes souches de *Wolbachia*, s'avère être suffisamment importante pour espérer obtenir une hybridation des amorces de *w*Mel sur le génome de *w*Vul.

Le criblage entier (par analogie avec le génome de *w*Mel) par LR PCR du génome de *w*Vul a donc été réalisé. Les résultats obtenus (261 kb amplifiés au total) nous montrent clairement que cette approche ne peut pas permettre d'amplifier le génome complet de *w*Vul. Le premier point est que les deux génomes semblent être trop divergents même si les comparaisons de séquences réalisées sur les gènes connus et identifiés chez toutes les souches

de *Wolbachia* révélaient des identités de séquences importantes (Bourtzis et al., 1994 ; Braig et al., 1998 ; Holden et al., 1993 ; Masui et al., 1997 ; Sun et al., 1999). Seuls 15 % des couples d'amorces utilisés sur le génome de *w*Vul ont donné un signal positif. Les contrôles parallèles de ces couples d'amorces sur ADN de *w*Mel se sont avérés positifs pour chacune des LR PCR réalisées. Ces résultats pourraient signifier que 85 % des amorces de *w*Mel n'avaient pas une séquence suffisamment homologue sur le génome de *w*Vul, ou que la distance entre chacune des deux amorces était trop longue pour pouvoir être amplifiée en LR PCR. Cependant, une mise au point des réactions de LR PCR n'a pas été tentée (température d'hybridation, durée d'élongation, conditions de stringence…); ces conditions convenant parfaitement pour l'amplification de l'ADN de *w*Mel. D'autre part, la caractérisation du génome de *w*Vul indique une différence de taille importante avec celle de *w*Mel (Sun et al., 2001). En effet, le génome de *w*Mel a été estimé à 1.36 Mb alors que nous avons estimé celui de *w*Vul à 1.76 Mb. Le génome de *w*Vul semble donc environ 30% plus grand sur celui de *w*Mel. De grandes différences de taille ont également été observées entre les amplicons de *w*Vul et de *w*Mel pour un même couple d'amorce. Il semble donc exister un polymorphisme important et il serait intéressant de réaliser des expériences permettant de comparer les profils de restriction des amplicons obtenus pour *w*Vul et *w*Mel. Cette technique nous permettrait de vérifier par hybridation si les amplicons de *w*Vul ont des cartes de restriction similaires à la région homologue de wMel. Quoi qu'il en soit, les divergences de taille et de séquences constatées entre les génomes de *w*Mel et de *w*Vul ne nous ont pas permis de poursuivre la stratégie de LR PCR envisagée.

Caractérisation du génome de *w*Vul

Nous avons donc focalisé nos efforts sur une méthode permettant la purification du chromosome bactérien en vue d'établir une caractérisation primaire et qui permettra par la suite de réaliser des cartes physiques et génétiques précises. Le développement de cette technique permet également la réalisation d'une banque d'ADN génomique. Le protocole de purification du chromosome bactérien que nous avons adapté au laboratoire est basé sur celui de Sun et al. (2001), où de jeunes adultes de *Drosophila melanogaster* entiers ont été utilisés pour l'extraction d'ADN. Chez *A. vulgare*, la cuticule étant très épaisse et dure, seuls les ovaires ont été utilisés. De plus, chez cette espèce, c'est dans ce tissu que la densité bactérienne est la plus importante (de 10 000 à 25 000 *Wolbachia* par ovaire) (Rigaud et al., 1991b). Des expériences préliminaires ont été réalisées à partir de quantités variables

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

d'ovaires, et à des stades de développement différents afin d'adapter le protocole de Sun et al. (2001) à notre matériel. Plusieurs étapes critiques ont ainsi du être modifiées : (i) la quantité optimale d'ovaires a été déterminée à 50, broyés dans 5 ml de tampon d'homogénéisation, les ovocytes devant être en vitellogenèse primaire (diamètre moyen compris entre 100 et 300 µm, taille du noyau constante à 50 µm), (ii) l'utilisation d'un tampon d'homogénéisation (PBS-glutamine-sucrose) couramment employé au laboratoire et iso-osmotique avec les cellules de crustacés, favorable également au maintien en survie de *Wolbachia*, (iii) l'utilisation d'un broyeur de tissus spécifique est nécessaire (Potter de Thomas, piston Téflon®, cylindre verre, tête de piston à embout rond strié) dont l'espace piston-cylindre compris entre 130 et 180 µm permet l'éclatement des ovocytes tout en préservant l'intégrité des noyaux, (iv) la centrifugation permettant d'isoler les bactéries dans le surnageant doit être répétée quatre fois, afin de réduire au maximum les contaminations par de l'ADN de l'hôte. La technique de purification de l'ADN bactérien ainsi optimisée nous a permis de caractériser le génome de *w*Vul et d'estimer sa taille à environ 1760 kb.

Les chromosomes bactériens peuvent s'observer sous différentes formes lors d'expériences d'électrophorèse en champ pulsé et tous n'ont pas une forme circulaire (Baril et al., 1989 ; Ferdows et Barbour, 1989). Sous forme circulaire, le chromosome est retenu dans les puits du gel d'électrophorèse (Schwartz et Cantor, 1984). Dans nos expériences, le fragment d'ADN non digéré (dont la taille a été estimé à environ 1760 kb) visualisé sur les gels d'électrophorèse en champ pulsé pourrait correspondre au chromosome linéarisé suite à une cassure mécanique due à l'homogénéisation. Nous avons également observé qu'une grande quantité d'ADN est retenue dans les puits. Les résultats que nous avons obtenu nous suggèrent donc très fortement que le génome de *w*Vul est circulaire, comme cela a été montré pour le génome de wMel (Sun et al., 2001 et numéro d'accession Genbank NC002978 pour *w*Mel) et que le chromosome linéarisé migre selon une taille de 1760 kb.

Les études précédemment menées ont révélé une diversité de taille parmi les génomes bactériens allant de 0.58 Mb pour *Mycoplasma genitalium* (Peterson et al., 1995) à 9.5 Mb pour *Myxococcus xanthus*.

Parmi les α-protéobactéries, il existe de grandes différences de taille de génome et de nombre de chromosome. Par exemple, *Bradyrhizobium japonicum* possède un génome de 9.1 Mb (Kaneko et al., 2002) et *Mesorhizobium loti*, un génome de 7 Mb (Kaneko et al., 2000), alors que les génomes de *Ehrlichia* spp. ont une taille comprise entre 0.87 Mb et 1.49 Mb (Rydkina et al., 1999). *Agrobacterium tumefaciens* (souche C58, CEREON) possède deux

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

chromosomes, l'un linéaire de 2 Mb, l'autre circulaire de 2.8 Mb et deux plasmides de 540 kb et 214 kb (Goodner et al., 2001). Parmi les différents biovars de *Brucella suis*, l'un d'entre eux possède un seul chromosome de 3.1 Mb et un autre en possède deux circulaires de 2.05 Mb et 1.15 Mb (Michaux et al., 1993).

Les tailles de génomes des α-protéobactéries libres connues se situent généralement autour de 3 Mb : 3.8 Mb pour *Rhodobacter capsulatus* (Fonstein et Haselkorn, 1993), 3.8 à 4.0 Mb pour *Caulobacter crescentus* (Ely et Gerardot, 1988 ; Ely et al., 1990) et 3.6 Mb pour *Sinorhizobium melitoti* (Capela et al., 2001).

La taille des génomes des bactéries libres est généralement plus grande que celles des bactéries intracellulaires obligatoires. La taille des génomes des bactéries intracellulaires strictes se situent généralement au dessous de 2.0 Mb : 1.6 Mb pour *Bartonella bacilliformis* (Krueger et al., 1995), 1.1 Mb pour *Rickettsia prowazekii* (Eremeeva et al., 1993 ; Andersson et al., 1998), de 0.9 à 1.5 Mb pour *Ehrlichia* spp. (Rydkina et al., 1999), et 650 kb pour *Buchnera* (Charles et Ishikawa, 1999). Dans notre étude, nous avons estimé la taille du génome de *Wolbachia* (souche *w*Vul) à 1.76 Mb. Cette taille réduite (inférieure à 2.0 Mb) est en accord avec celles connues de bactéries intracellulaires obligatoires. La taille du génome de *w*Vul se rapproche de celles déterminées par Sun et al. (2001) pour d'autres souches de *Wolbachia* symbiotes de différentes espèces de Drosophile : de 1.362 Mb à 1.659 Mb, mais s'éloigne des tailles des souches de *Wolbachia* présentes chez les nématodes : 0.995 à 1.117 Mb. Chez les nématodes, l'interaction hôte/bactérie ne se caractérise plus par une symbiose mais par un mutualisme. Les larges différences de taille observées entre les différents génomes de *Wolbachia* restent cependant intrigantes. Les *Wolbachia* de nématodes ont un génome environ 40% plus petit que celui de *w*Vul. Cependant, la réduction de taille de ces génomes est en adéquation avec les tailles réduites de génome concernant les autres symbiotes mutualistes (Andersson et Kurland, 1998 ; Wernegreen et al., 2000). Une étude récente a estimé la taille du génome de la souche *w*AlbB (symbiote du moustique *Aedes albopictus*) à 1790±17 kb (Fenollar et al., 2003). Cette taille de génome se rapproche considérablement de celle de *w*Vul, mais une comparaison des profils de restriction entre *w*AlbB et *w*Vul n'est pas possible pour le moment, car les enzymes utilisées par ces auteurs (*BssH*II, *Sac*II et *Sal*I) sont différentes de celles qui nous ont servi à caractériser le génome de *w*Vul. La comparaison des cartes physiques de ces deux souches serait très intéressante à réaliser, car elle nous permettrait de déterminer si la conservation de la taille du génome des *Wolbachia* est représentative de la conservation de l'organisation des gènes. L'utilisation des

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

enzymes utilisées par Fenollar et al., (2003) sur le génome de *w*Vul serait un bon moyen pour vérifier la conservation des sites de restriction entre génomes de *Wolbachia* de taille similaire. La taille des génomes de *Wolbachia* s'étend donc de 0.995 Mb à 1.790 Mb, avec deux groupes distincts : les *Wolbachia* de nématodes dont les tailles de génomes sont plus petites (de 0.995 à 1.117 Mb) et les *Wolbachia* d'arthropodes ayant un génome plus grand (de 1.362 à 1.790 Mb). Il n'est pas rare de rencontrer ce type de variation de taille de génomes et de séquences entre deux souches bactériennes proches. Par exemple, chez les Rickettsies qui sont proches des *Wolbachia*, le séquençage des génomes de *Rickettsia conorii* (1.268 Mb) et *Rickettsia prowazekii* (1.111 Mb) a révélé que 552 gènes de *R. conorii* n'avaient pas d'orthologues chez *R. prowazekii*, que de nombreuses ORFs montraient de larges différences de taille et de teneur en G+C, et enfin que *R. conorii* possédait une densité bien plus importante de séquences répétées d'ADN (Ogata et al., 2001). D'autres études soulignent que la taille et l'organisation des séquences des génomes bactériens sont plus variables que les séquences des gènes eux-mêmes (Huynen et Bork, 1998) et qu'entre deux souches de bactéries identiques, il se peut qu'il n'existe aucune corrélation entre la conservation de la séquence de l'ADNr 16S et la conservation de la taille du génome.

La caractérisation du génome de *w*Vul nous indique qu'il existe 6 sites de restriction pour *ApaI*, 3 pour *Asc*I, et aucun pour *Fse*I. Sun et al. (2001) ont déterminé que la souche *w*Mel possède 12 sites de reconnaissance pour *Apa*I, 2 pour *Asc*I, et un pour *Fse*I permettant de linéariser le chromosome. Ces enzymes ont donc le point commun de couper peu de fois dans les génomes des *Wolbachia*, mais leur nombre de coupure semble différer selon les souches étudiées. Parmi les bandes générées par *Asc*I après coupure du génome de *w*Vul, aucune n'a la même taille que celles générées après coupure sur le génome de *w*Mel. Après coupure de *w*Vul par *Apa*I, les bandes de 220 kb et 140 kb ont une taille comparable à celles de 230 kb et 146 kb générées par coupure par cette même enzyme de *w*MelPop, et une bande de 376 kb se retrouve pour *w*MelCS, *w*Mel et wVul (taille estimée à 375 kb pour cette dernière). Certains sites de restriction semblent donc conservés concernant les enzymes *Asc*I et *Apa*I, alors que ceux concernant *Fse*I et *I-Ceu*I ne le sont pas.

En effet, les études que nous avons menées concernant la présence des opérons *rrn* après coupure par *I-Ceu*I révèlent une disparité importante entre le génome de *w*Mel et le génome de *w*Vul. Un seul gène *rrl* est présent dans le génome de *w*Mel, et il existerait 5 gènes *rrl* ou opérons *rrn* dans le génome de *w*Vul. Des expériences complémentaires (Southern blot, séquençage) sont absolument nécessaires pour vérifier cet aspect assez inhabituel. Il est

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

cependant à noter que des études ont montré que des réarrangements chromosomiques sont dus à des recombinaisons homologues au niveau des loci *rrn* (Teyssier et al., 2003). Chez *Brucella* spp., les différences de taille des chromosomes et leur nombre peuvent s'expliquer par ces réarrangements au niveau des trois gènes *rrn* (Jumas-Bilak et al., 1998). La différence de taille entre les génomes de *w*Mel et *w*Vul pourrait elle être à l'origine de ce type de réarrangements ?

Enfin, nous avons pu produire de l'ADN de *Wolbachia* en grande quantité et suffisamment pur pour assurer la construction de trois banques d'ADN génomique à partir des trois fragments d'ADN générés par la digestion par *Asc*I, ces trois fragments couvrant la totalité de la séquence du chromosome. Le séquençage de *w*Vul nous éclairera sur la composition du génome, l'organisation de gènes et sur leur conservation entre différentes souches de *Wolbachia*.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La technique d'électrophorèse en champ pulsé permet aujourd'hui de réaliser des cartes physique et génétique des génomes bactériens apportant des informations sur l'organisation des génomes, des éléments génétiques et sur l'arrangement des loci des gènes et familles de gènes. La diversité génomique des espèces bactériennes est élucidée grâce à la cartographie des chromosomes. Les positionnements des sites de restriction et des loci des gènes d'intérêt servent de points de repère pour déterminer de grandes modifications chromosomiques telles que des insertions, des délétions ou des inversions. Des comparaisons intra et inter espèces de l'organisation des génomes donnent un aperçu de la structure et de la diversité des populations bactériennes.

La caractérisation du génome de *w*Vul nous indique que, d'une part, il présente des profils de restriction différents de ceux de *w*Mel, et d'autre part, que son génome est plus grand que celui des souches induisant l'IC (Sun et al., 2001 et 2003). L'application de la technique d'électrophorèse en champ pulsé à d'autres souches de *Wolbachia* induisant la féminisation chez différentes espèces de crustacés terrestres devra être entreprise. Ceci permettra de vérifier si la taille des génomes des souches de *Wolbachia* féminisantes est toujours plus importante que celles des souches induisant l'IC. De la même façon, il serait judicieux de s'intéresser à la caractérisation des souches des *Wolbachia* induisant l'IC, cette fois-ci, chez les crustacés isopodes terrestres et de réaliser une comparaison avec les souches

induisant l'IC chez les insectes diptères. Ces expériences nous permettront de savoir si, d'une manière générale, les génomes des *Wolbachia* féminisantes sont plus grands que ceux des *Wolbachia* induisant l'IC, ou si la taille des *Wolbachia* est fonction de l'espèce de son hôte. Autrement dit, la taille du génome est elle fonction des effets que *Wolbachia* peut induire ?

Le séquençage du génome de *w*Mel (numéro d'accession Genbank: NC002978) indique que 1309 gènes sont présents. L'analyse des séquences complètes des génomes des 3 souches de *Wolbachia* induisant chacune une altération de la reproduction différente (*w*Vul, *w*Ri et *w*Uni en cours de séquençage) montrera en quoi ces génomes divergent et quels sont les gènes conservés. L'annotation des séquences permettra d'attribuer une grande partie des fonctions suspectées des protéines correspondantes aux gènes présents, et ainsi, de mieux connaître la biologie de *Wolbachia*. Y a-t-il, par exemple, des différences élevées entre les trois génomes concernant les séquences d'ADN répétées? Le séquençage en cours de la souche *w*Uni révèle en effet la présence de nombreuses répétitions des gènes codant des transposases, des phages ou bien encore de pili (Siv Andersson, communication personnelle). Y a-t-il également entre les différentes souches, perte de séquences géniques ? Y a-t-il des gènes de virulence, de résistance ? Ces séquences nous révéleront également quels gènes n'ont pas d'orthologues au sein des trois génomes, et il sera approprié de s'intéresser à leur fonction. Et surtout, existe-t-il un (des) gène(s) dont la fonction est susceptible d'interagir avec le déterminisme du sexe de son hôte?

La réduction des génomes est aujourd'hui considérée comme une conséquence de l'évolution des bactéries intracellulaires (Andersson et al., 1998 ; Andersson et Andersson, 1999a et b), et les modifications que la bactérie apporte à son génome sont notamment acquises pour une meilleure adaptation à son hôte. *w*Vul aurait-elle eu moins besoin de s'adapter à son hôte *A. vulgare* que ne l'ont fait *w*Mel et *w*Uni ou l'infestation par *Wolbachia* chez *A. vulgare* serait elle plus récente?

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

CHAPITRE II
Etude génétique et transcriptionnelle du système de sécrétion de type IV chez *w*Vul

Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for a type IV secretion system in feminizing intracellular symbiont *Wolbachia.* C. Felix, P. Grève, C. Braquart-Varnier, H. Braig, G. Martin. (en préparation pour soumission à *Journal of bacteriology*).

1. INTRODUCTION

Dans de nombreux cas de bactéries pathogènes à Gram négatif, des protéines nécessaires à la virulence sont exportées dans l'environnement, qu'elles soient ou non dans la cellule eucaryote elle même. Pour pouvoir traverser la paroi bactérienne, ces protéines doivent franchir deux obstacles que sont la membrane interne et la membrane externe, toutes deux hydrophobes et donc imperméables aux composés hydrophiles. Pour ce faire, elles ont besoin de systèmes de sécrétion. Quatre système de sécrétion de protéines sont actuellement connus chez les bactéries à Gram négatif : les types I à IV (Cossart et al., 1996).

Les types I sont responsables de la sécrétion d'enzymes extracellulaires par les bactéries à Gram négatif, comme la sécrétion d'hémolysine α chez *Escherichia coli*, de l'adénylate cyclase chez *Bordetella pertussis*, de protéases chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wandersman, 1996). La sécrétion par des systèmes de type II met en jeu un système particulier, dit système sec, comprenant différentes protéines, dont une ATPase, une protéine chaperone et une peptidase. Les protéines exportées par ces systèmes possèdent une séquence en acides aminés hydrophobes dite « séquence signal », qui est nécessaire à leur exportation mais sera éliminée par la peptidase dans l'espace périplasmique. Ces systèmes sont responsables de la sécrétion d'enzymes pectiques et de cellulases par *Erwinia*, d'élactase, de phospholipase C et d'exotoxine A par *Pseudomonas aeruginosa*, de pullanase par *Klebsiella oxytoca* (Hobbs et Mattick, 1993).

Le type III est certainement le mécanisme de sécrétion le plus étudié (Hueck, 1998). Il met en jeu une vingtaine de protéines, dont beaucoup sont des homologues des composants de la biosynthèse des flagelles. Ce système permet la sécrétion de protéines responsables de

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

l'adhérence de la bactérie à la surface cellulaire (*E. coli* entéropathogènes), de l'entrée de la bactérie dans les cellules non phagocytaires (*Salmonella typhirium*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp.) ou au contraire de la résistance à la phagocytose par les macrophages (*P. aeruginosa*, *Yersinia* spp.), d'induction de l'apoptose des macrophages (Anderson et Schneewind, 1999). Les protéines bactériennes sécrétées interagissent avec des protéines cellulaires (protéines G, tyrosine kinases,…), conduisant, entre autres effets, à la réorganisation de l'actine du cytosquelette et à la phagocytose, ou, au contraire, à la dépolymérisation de l'actine et à l'inhibition de la phagocytose, ou encore à l'apoptose. L'activité des systèmes de sécrétion de type III est réglée à la fois aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel.

Le dernier système connu est la voie de sécrétion de type IV. Ce système permet la sécrétion de complexes nucléoprotéiques ou protéiques à travers la membrane des bactéries à Gram négatif (canal transmembranaire traversant les membranes interne et externe de la paroi bactérienne) (Christie et Covacci, 2000). Les plus connus jouent un rôle majeur dans l'échange de plasmides au cours de la conjugaison bactérienne, par exemple le système *tra* chez *E. coli*. Plus précisément, il a été démontré que ces systèmes de type IV jouent un rôle important dans la virulence de certaines bactéries telles que *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988 ; Zhu et al., 2000), *Bordetella pertussis* (Weiss et al., 1993, Covacci et al., 1993), *Helicobacter pylori* (Covacci et al., 1997), *Legionella pneumophila* (Vogel et al., 1998), ou bien encore *Brucella suis* (O'Callaghan et al., 1999).

Le plus anciennement décrit et le mieux connu des systèmes de sécrétion de type IV impliqués dans la virulence est celui d'*Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie pathogène pour les plantes. L'infection d'une plante par *A. tumefaciens* se traduit par l'apparition de tumeurs du collet appelées crown-galls. La bactérie infecte d'abord les cellules de la plante, puis lui transfert un plasmide, qui va s'intégrer dans son génome. Ce plasmide, nommé p*Ti* (pour *tumor-inducing*), contient à la fois des gènes responsables de son transfert et des gènes de synthèse de facteurs de croissance, déréglant la multiplication des cellules de la plante et conduisant à la formation de la tumeur (Zambryski, 1988). Le transfert de plasmide se fait par l'intermédiaire d'un complexe situé dans la paroi de la bactérie (Christie, 1997). Ce complexe protéique, VirB, met en jeu onze protéines (de VirB1 à VirB11) codées par onze gènes formant la région *virB* du plasmide et réunis en opéron. Plusieurs macromolécules (ADN-T/ VirD2, VirE2 et VirF) sont exportées par VirB sous forme d'un complexe nucléprotéique.

Le deuxième système de sécrétion de type IV participant à la virulence d'une bactérie a été décrit chez *B. pertussis*, responsable de la coqueluche. Sa virulence est en grande partie

déterminée par la synthèse et la sécrétion d'un complexe protéique, dit toxine pertussique. Cette toxine est formée de cinq sous unités protéiques, codées par cinq gènes juxtaposés formant le locus *ptx*. Deux autres groupes de gènes, contigus à *ptx*, sont situés dans la même région chromosomique : neuf gènes, appelés *ptl* (pour *pertussis toxin liberation*); deux gènes codant pour un système de régulation à deux composants, *bvgA* et *bvgS*. *ptx* et *ptl* forment un opéron, réglé par *bvgA*-*bvgS* suivant les caractéristiques du milieu (température, ions sulfates, acide nicotinique) (Scarlato et al., 1993). Le complexe Ptl, qui a une structure proche de VirB, correspond à un système de sécrétion de type IV et permet la sécrétion de la toxine pentamérique (Covacci et Rappuoli, 1993). Cette toxine, libérée dans le milieu extracellulaire, interagit avec les récepteurs glycoprotéiques des cellules cibles. Par ADP-glycosylation des protéines G, elle interfère avec la transduction du signal.

La bactérie *Helicobacter pylori* est responsable d'ulcères gastro-duodénaux, d'adénomes et de lymphomes gastriques. L'étude de sa virulence a montré qu'elle dépend de la présence ou de l'absence dans le chromosome d'une région de 40 kb appelés *cag* et contenant 31 gènes (Akopyants et al., 1998). Six de ces gènes sont homologues avec les gènes du système de transport de type IV. L'étude de mutants montre que cag induit plusieurs changements dans la cellule infectée, comme la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8), le remodelage de la surface cellulaire avec formation de piédestaux, l'activation de facteurs de transcription, l'expression de proto-oncogènes (Covacci et al., 1999). Récemment, il a été montré que le système de sécrétion de type IV permet l'exportation dans le cytoplasme de la cellule gastrique de CagA, une protéine de 141 kDa dont le gène est situé dans la région *cag* (Segal et al., 1999a). Après phosphorylation par les tyrosine kinases cellulaires, CagA participe à la formation du piédestal qui sert à l'adhérence de la bactérie (Stein et al., 2000 ; Odenbreit et al., 2000). Enfin, il est à noter que les isolats de patients contiennent toujours un mélange de souches *cag*+ et de souches *cag*-, avec une fluctuation dans le temps du rapport entre les deux populations.

L. pneumophila est responsable de la maladie des légionnaires se traduisant par une pneumopathie souvent grave chez l'homme. Cette bactérie, en pénétrant dans le macrophage, inhibe l'acidification du phagosome et la fusion de celui-ci avec les lysosomes, lui permettant d'échapper aux mécanismes bactéricides du phagocyte. Le compartiment où elle se multiplie, appelé « phagosome réplicatif », est entouré de réticulum endoplasmique rugueux. L'étude de mutants incapables de se multiplier dans les phagocytes a permis de localiser deux régions du chromosome impliquées dans la virulence, d'une vingtaine de kilobases chacune (Vogel et al.,

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

1998). Ces gènes, au nombre d'une trentaine, ont reçu le nom de *icm* (pour intracellular multiplication) ou *dot* (pour defective for organelle trafficking). Deux protéines DotG et DotB sont des homologues des protéines VirB10 et VirB11 de *A. tumefaciens*. Les mutants dotG et dotB ne peuvent plus se multiplier dans la cellule, ni inhiber l'acidification du phagosome et la fusion avec les lysosomes. Un système de sécrétion de type IV semble donc exister chez *L. pneumophila*, jouant un rôle dans la perturbation du trafic intracellulaire des membranes.

Brucella suis provoque chez l'homme la brucellose ou fièvre de Malte. Là aussi, l'infection par la bactérie entraîne l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome, mais contrairement à *L. pneumophila*, le phagosome est acidifié (Porte et al., 1999). L'étude des mutants incapables de se multiplier dans les macrophages a permis de mettre en évidence la participation de nombreux gènes à la virulence de *B. suis* (Foulongne et al., 2000), en particulier un groupe de douze gènes formant un opéron, dont les onze premiers montrent une forte homologie avec l'opéron VirB de *A. tumefaciens* et ptl de *B. pertussis* (O'Callaghan et al., 1999). Une étude récente a démontré que *virB* n'est pas induit au moment du contact entre la bactérie et la cellule, mais spécifiquement à l'intérieur du phagosome. Il existe donc chez *Brucella* un système de sécrétion de type IV nécessaire à la virulence. Il est certainement responsable de la sécrétion de protéines puisqu'il n'existe pas de plasmides naturels chez cette bactérie, mais la nature de la protéine ou des protéines exportée(s) n'est pas connue.

Récemment, des études chez des bactéries intracellulaires obligatoires ont permis de retrouver des équivalents des gènes du système de sécrétion de type IV. C'est le cas chez *Rickettsia prowazekii* (Andersson et al., 1998), *Rickettsia conorii* (Ogata et al., 2001), *Anaplasma phagocytophila* et *Ehrlichia chaffeensis* (Ohashi et al., 2002). Le rôle du système de sécrétion de type IV n'a pas encore été déterminé chez ces bactéries intracellulaires obligatoires.

Wolbachia est une bactérie intracellulaire obligatoire, qui se localise dans le cytoplasme de la cellule hôte, à l'intérieur ou non d'une vacuole selon les tissus considérés. Les expériences de microscopie électronique menées au laboratoire montrent que tous les tissus de l'hôte sont infestés : les hémocytes, le tissu nerveux, le tissu adipeux, le système digestif, le cœur et surtout les ovaires où elle est majoritairement représentée (Martin et al., 1973, Rigaud et al., 1991b). De plus, chez les mâles intersexués chez lesquels la bactérie a eu une action trop tardive pour reverser complètement le sexe de l'animal, la bactérie se retrouve également dans tous les tissus y compris dans le cytoplasme des cellules de la glande androgène. La présence de la bactérie dans la glande androgène provoque alors son

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

hypertrophie avec de nombreuses caractéristiques de tumorisation (voir photo introduction, chapitre III). La présence de la bactérie dans les glandes androgènes induit donc la formation d'une tumeur.

La localisation exclusivement intracellulaire de *Wolbachia* suggère que *w*Vul sécrète une ou des molécule(s) qui interagi(ssen)t avec les mécanismes moléculaires de la différenciation de la glande androgène, que ce soit au niveau du récepteur de l'hormone androgène par compétition ou par blocage de son expression, ou bien encore au niveau de la transduction du signal généré par la fixation du ligand sur son récepteur. L'entrée de *Wolbachia* dans les hémocytes suite à une injection expérimentale et sa survie à l'intérieur de ce type cellulaire suggère également que le rôle des hémocytes est modifié *via* des facteurs sécrétés par la bactérie. La voie endosomale normale est modifiée et la fusion avec les lysosomes ne semble pas avoir lieu.

Des gènes de ce système (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* et *virD4*) ont été identifiés chez les *Wolbachia* symbiotes du cricket de Taiwan *Teleogryllus taiwnemma* (*w*Tai) et de la pyrale de la farine *Ephestia Kuehnilla* (*w*KueYO) (Ohashi et al., 2002).

Toutes ces données nous ont conduit à caractériser ce système de sécrétion de type IV chez *w*Vul, et nos résultats sont présentés dans ce chapitre.

2. Matériels et méthodes

2.1 Animaux

Quatre espèces d'isopodes terrestres hébergeant différentes souches de *Wolbachia* ont été utilisées dans cette étude : *Armadillidium vulgare, Oniscus asellus, Porcellio dilatatus petiti* et *Porcellionides pruinosus*. *Wolbachia* induit la féminisation (F) chez *A. vulgare* (Martin et al., 1973), *O. asellus* (Rigaud et al., 1999) et *P. pruinosus* (Juchault et al., 1994), et l'incompatibilité cytoplasmique (IC) chez *P. d. petiti* (Legrand et al., 1978). Pour les populations utilisées, *Wolbachia* est présente chez la plupart des mâles et des femelles chez *O. asellus, P. pruinosus, P. d. petiti* et seulement chez les femelles d'*A. vulgare.*

2.2 Extraction d'ADN

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'un culot enrichi en bactéries (voir chapitre I, § 2.3.2. Isolement de bactéries). Le culot est solubilisé dans 400 µl de tampon Wilson (Tris 100 mM, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 0.1%, Dithiothréitol 50 mM, pH8), contenant 0.1 mg de protéinase K, puis incubé pendant 4 h à 37°C, avec renversement du tube toutes les 30 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 6000 rpm, pendant 5 min à 4°C. L'ADN est extrait du surnageant par un ½ volume de phénol et un ½ volume de chloroforme : alcool isoamylique (24 :1). Le mélange est agité par renversements successifs du tube, puis centrifugé à 12000 rpm pendant 8 min, à température ambiante. La même étape est renouvelée avec un ½ volume de phénol et un ½ volume de chloroforme, puis une nouvelle fois avec un volume de chloroforme. A chaque étape, la phase aqueuse est conservée. L'ADN est précipité par addition d'1/10ème de volume d'acétate de sodium (3 M, pH 7) et un volume d'isopropanol. La précipitation s'effectue à -20°C pendant une nuit. L'échantillon est ensuite centrifugé à 15000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot est rincé deux fois à l'éthanol 70°, séché à l'air libre et solubilisé dans 20 à 50 µl d'eau distillée stérile.

2.3 Choix des amorces

La comparaison des séquences des gènes *vir* et de leurs régions flanquantes, entre différentes souches de *Wolbachia*, *E. chaffeensis* et *A. phagocytophila* nous a permis de mettre en évidence des régions très conservées dans lesquelles ont été dessinées des amorces (tableau 2.1). Les comparaisons de séquences ont été réalisées avec le programme BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) et les alignements multiples avec le programme CLUSTALW (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustlw-in.pl).

Gène cible	Taille de l'amplicon (pb)	Amorces sens		Amorces anti sens	
		Séquences nucléotidiques	code	Séquences nucléotidiques	code
virB3	440	5'-GACCTMCVATGCTBTTTGGTG-3'	VirB3F*	5'-CCTCRTCATCKGCAGTTTCAAA-3'	VirB3R*
virB4	1907	5'-TTTGAAACTGCMGATGAYGAGG-3'	VirB4F*	5'-GCATCCTCAACACTYTGWGTMGC-3'	VirB4R*
virB6	2356 268	5'-GCKACWCARAGTGTTGAGGATGC-3' 5'-GAATTGATATAGGGTGCACGGAATTG-3'	VirB6F* VirB6-1F	5'-AAASGCAAAAAGKATWACMGGRTA-3' 5'-GATTACCAAAAGTCAAAGGATTGCGA-3'	VirB6R* VirB6-1R
phosphatase	693	5'-AAAATTTCATCGGTCCAGCATCTAAG-3'	P3F	5'-CTAGTTTTCATTTCGTCCATGCAC-3'	P3R
ribA	1670 337	5'-CAATGGGACACATGTCATTGTC-3' 5'-GTTATTGCACTGGACACGTCATTC-3'	RibAF RibA-1F	5'CAATGCCTCTTCCATCTTGCATC-3'	RibA-1R
virB8	446	5'-CGCTACAGCACAGTTATTGCTC-3'	VirB8-1F	5'-CTCACTTGAAGAGCATCATTACC-3'	VirB8-1R
virB9	508	5'-GAAGTCAGTAGTCGCACTAACATG-3'	VirB9-1F	5'-CAACTTCACTACCTTCATAACGC-3'	VirB9-1R
virB10	489	5'-GGTGGTAACGGTTGGCTCTAATC-3'	VirB10-1F	5'-GCCTTGTTCTCTCCACTACTACC-3'	VirB10-1R
virB11	484 342	5'-GGAGCCATTACAAGGGATATTTC-3' 5'-GGCAGGCTGATTGCTCAAG-3'	VirB11F VirB11-1F	5'-CTTACCGGTAGAAGTTCCACCAC-3'	VirB11-1R
virD4	382	5'-CAGAGAAAGACATACGAAAAGCAGG-3'	VirD4F	5'-CTTGTTCAGGCATGATTAGGTTAGC-3'	VirD4R
virB3-virB4	440	5'-GACCTMCVATGCTBTTTGGTG-3'	3'virB3F*	5'-CCTCRTCATCKGCAGTTTCAAA-3'	5'virB4R*
virB4-virB6	269	5'-CTGGACGTGCAGAAAGTGTTCT-3'	3'virB4F	5'-CAATCAGGATTAGAGGCACGAC-3'	5'virB6R
phosphatase-ribA	431	5'-TTTGTGCATGGACGAAATGAAAAC-3'	3'phosphF	5'-GGCCACTTCTAATTTCGCTGATAGC-3'	5'ribAR
ribA-virB8	190	5'-CTAGGCCATGGATTAAGGGTTTTTTAG-3	3'ribAF	5'-GAGCAATAACTGTGCTGTAGCG-3'	5'virB8R
virB8-virB9	219	5'-GCATCGCTTGAAATGAATGATCAG-3'	3'virB8F	5'-CCGTAAATACCTCATTAGGGCT-3'	5'virB9R
virB9-virB10	199	5'-GCGTTATGAAGGTAGTGAAGTTG-3'	3'virB9F	5'-CACTCCACCAGCCAGAAGCAC-3'	5'virB10R
virB10-virB11	231	5'-GATATAGTATTTCCTCCACAGGC-3'	3'virB10F	5'-CTTGAGCAATCAGCCTGCC-3'	5'virB11R
virB11-virD4	224	5'-GAACTTGTAGGGGCAGAAGAATC-3'	3'virB11F	5'-CACACTATCTGGACCGTCAAC-3'	5'virD4R

Tableau 2.1: Amorces oligonucléotidiques utilisées en PCR. (*: Séquences d'amorces dégénérées selon le code IUB [International Union of Biochemistry])

2.4 PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées avec le kit TaKaRa LA Taq™ (TaKaRa Bio Inc.). La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, contenant 500 ng d'ADN, 10 pmoles de chaque amorce, 2.5 mM de chaque dNTP, le tampon II de LA PCR™ (1X) (composition non communiquée) et 2.5 U de TaKaRa LA Taq™. Les conditions de PCR comportent successivement une étape de dénaturation de pré-amplification à 95°C pendant 10 min, 40 cycles de dénaturation (95°C pendant 1 min), d'hybridation (50°C ou 55 °C selon la Tm de l'amorce utilisée, pendant 1 min) et d'extension (72°C, 1 min par Kb), puis un dernier cycle à 72°C pendant 5 min.

2.5 Séquençage

Pour les amplicons de taille inférieure à 1 kb, le séquençage d'ADN est réalisé selon une méthode dérivée de celle de Sanger (Sambrook et al., 1989): la PCR incorpore des didéoxynucléotides fluorescents. La réaction est réalisée avec le kit ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster city, CA). Le séquençage s'effectue à partir de 100 ng d'amplicon purifié (Kit Jet Pure, Genomed), 3 pmoles d'amorce et 4 µl de mix du kit utilisé. La réaction de PCR consiste en une étape à 96°C pendant 30 sec, 30 cycles de dénaturation à 96°C pendant 45 sec,

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

hybridation à 55°C pendant 30 sec, et élongation à 60°C pendant 240 sec. Les échantillons sont analysés par le séquenceur ABI PRISM 310 et les séquences sont lues par le logiciel Sequencing Analysis (Perkin Elmer).

Pour les amplicons de taille plus importante (operons entiers), la méthode de "marche sur le chromosome" a été utilisée. L'opéron *virB8-D4* (groupe de gènes *virB8, virB9, virB10, virB11* et *virD4*) a été séquencé par la compagnie ESGS et l'opéron *virB3-B6* (groupe de gène *virB3, virB4* et *virB6)* a été séquencé par la compagnie QIAGEN selon cette même méthode.

2.6 Extraction d'ARN

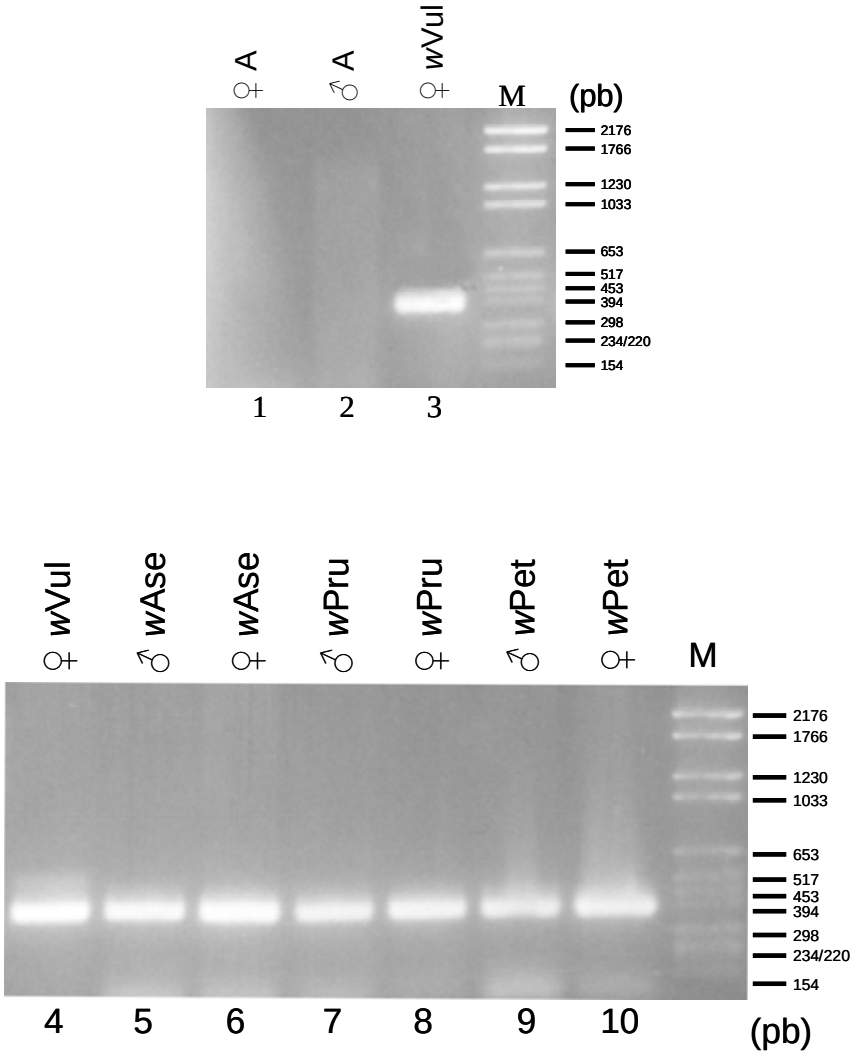
L'extraction d'ARN est réalisée à partir d'un culot enrichi en bactéries (voir chapitre I, § 2.3.2. Isolement de bactéries), la solution de prélèvement des tissus (PBS-Sucrose-Glutamine) contient 1 U d'inhibiteur de RNAse (Sigma). Le culot est solubilisé dans 100 µl de tampon TE 1X contenant 40 µg de lysozyme, puis incubé pendant 5 min à température ambiante. L'extraction d'ARN est ensuite réalisée avec le kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. L'ADN contaminant est digéré avec 3 à 5 U de DNAse (RQ1 DNAse – RNAse free, Promega) dans le tampon de la Reverse Transcriptase (Thermoscript™ RNase H^- Reverse Transcriptase, Invitrogen Life Technologies), pendant 10 min à température ambiante. La DNAse est inhibée par une incubation pendant 10 min à 65°C.

2.7 RT-PCR

L'ARN est préalablement linéarisé par chauffage à 65°C pendant 5 min, en présence d'hexamères aléatoires (1.5 OD), et de dNTP (1 mM). La solution réactionnelle contient 5 µg d'ARN, 2 µg de BSA (Albumine de Sérum Bovin), et a lieu dans un volume final de 20 µl. Puis, du DTT (5 mM), du tampon de la RT (1X), 1 U d'inhibiteur de RNAse, 15 U de Thermoscript™ RNase H^- Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) sont ajoutés. La réaction est placée à 25°C pendant 10 min, puis à 50°C pendant 60 min. L'enzyme est inactivée par chauffage à 85°C pendant 5 min.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 2.1:</u> Détection par PCR du gène *virD4* sur différentes souches de *Wolbachia* avec les amorces VirD4F et VirD4R. Puits 1, ADN extrait de femelle non infectée *A. vulgare*; puits 2, ADN de mâle non infecté *A. vulgare*; puits 3 et 4, ADN de femelle *A. vulgare* hébergeant *w*Vul; puits 5, ADN de mâle *O. asellus* hébergeant *w*Ase; puits 6, ADN de femelle *O. asellus* hébergeant *w*Ase; puits 7, ADN de mâle *P. pruinosus* hébergeant *w*Pru; puits 8, ADN de femelle *P. pruinosus* hébergeant *w*Pru; puits 9, ADN de mâle *P. d. petiti* hébergeant *w*Pet; puits 10, ADN de femelle *P. d. petiti* hébergeant *w*Pet ; puits M, ADN marqueurs de masses moléculaires.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.8 Southern blot et hybridation

Voir également Chapitre I, § 2.3.6. Southern blot et hybridation

L'ADN de *w*Vul est digéré par deux endonucléases de restriction dont les sites de coupure se situent de part et d'autre des opérons (figure 2.4). L'enzyme *Sph* I possède un site de coupure en 5' de l'opéron *virB3-B6* et *Hae* II en 3' de ce même opéron. Les enzymes *Nco*I et *Bstx*I ont été utilisées pour l'opéron *vir B8-D4*. Les matrices utilisées correspondent aux fragments de PCR interne obtenus à partir de deux couples d'amorces (VirB3F/VirB6R et VirB8F/VirD4R) situés dans les régions codantes des opérons *vir* (tableau 2.1 et figure 2.4).

3. RESULTATS

3.1 Identification du gène *virD4*

A partir des alignements du gène *virD4* réalisés pour différentes souches de *Wolbachia* (*w*Tai, *w*KueYo, *w*Mel), des amorces non dégénérées situées dans la séquence codante du gène *virD4* ont été dessinées et nommées VirD4F (amorce sens) et VirD4R (amorce anti sens) encadrant une séquence de 382 pb (tableau 2.1 et figure 2.4). La réaction de PCR a été réalisée à partir d'ADNs génomiques bactériens extraits de quatre espèces différentes d'isopodes terrestres hébergeant *Wolbachia*:

- *Armadillidium vulgare : w*Vul,
- *Oniscus asellus : w*Ase,
- *Porcellionides pruinosus : w*Pru,
- et *Porcellio dilatatus petiti : w*Pet.

Pour les quatre souches testées (*w*Vul, *w*Ase, *w*Pru et *w*Pet), la PCR VirD4F/VirD4R a permis d'amplifier un fragment d'ADN d'environ 390 pb à partir d'ADN génomique de femelles d'*A. vulgare*, et à partir d'ADN génomique de mâles et de femelles d'*O. asellus*, de *P. pruinosus*, et de *P. d. petiti* (figure 2.1).

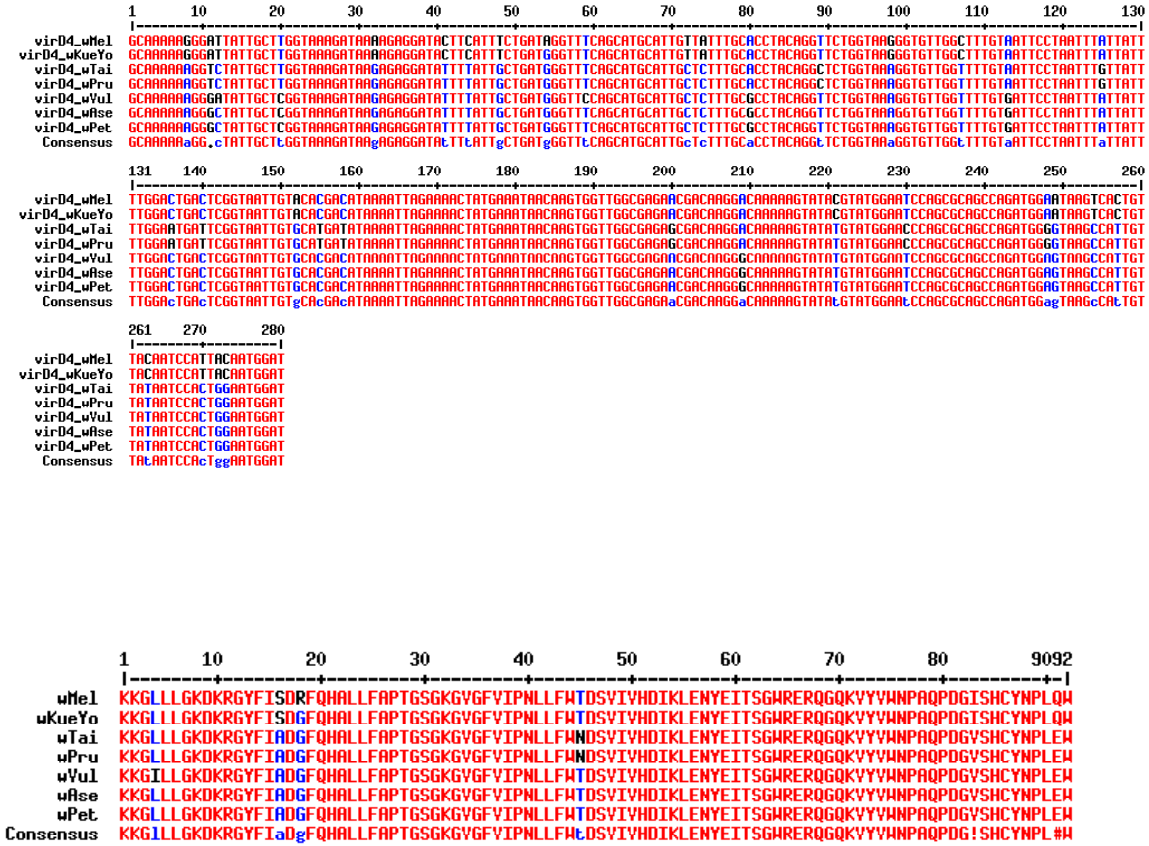


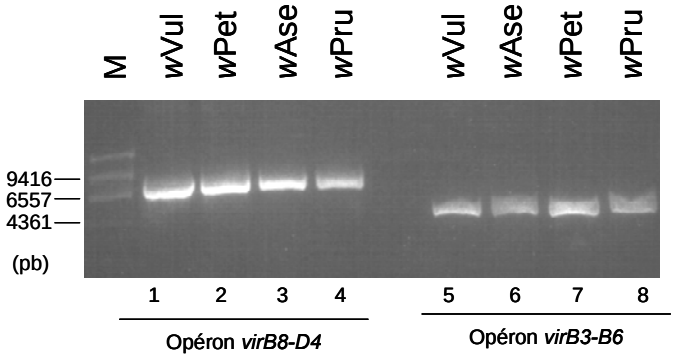
Figure 2.2: **Alignement des séquences partielles (a) du gène *virD4* amplifiées avec les amorces VirD4F et VirD4R sur *w*Mel, *w*KueYo, *w*Tai, *w*Pru, *w*Vul, *w*Ase et *w*Pet et (b) des séquences en acides aminés correspondantes. Indications des couleurs : rouge, 100% de conservation ; bleu, > 50% de conservation ; noir, < 50% de conservation.**
(http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les fragments de PCR de ces quatre souches ont alors été purifiés (kit jet pure, Genomed®) puis séquencés. Les données ainsi obtenues ont été comparées entre elles et avec celles de *w*Tai, *w*KueYo et *w*Mel (figure 2.2). Les alignements réalisés sur la portion génique encadrée par les amorces VirD4F et VirD4R montrent des similarités de séquences très élevées ce qui suggère très fortement que le fragment amplifié par ces amorces correspond à une partie du gène *virD4* (figure 2.2). Cette portion de gène est très conservée (de 98.6 à 99.7% d'identité) entre les différentes souches de *Wolbachia* comparées.

3.2 Identification des opérons *virB8-D4* et *virB3-B6*

Les données partielles obtenues sur le gène *virD4* nous ont amenés à rechercher la présence d'autres gènes *vir* sur le génome de *w*Vul. Pour cela, des amorces dégénérées ou non ont été dessinées à partir des séquences les plus conservées des gènes *virB8*, *-B9*, *-B10*, *-B11* et *-D4* présents sur les génomes de *w*Tai et *w*KueYo (Masui et al., 2000b). Pour les gènes *virB3*, *-B4* et *-B6*, les amorces ont été dessinées à partir des séquences d'*E. chaffeensis* et d'*A. phagocytophila* (Ohashi et al., 2002). Ces deux bactéries possèdent en effet une organisation similaire de l'opéron *virB8-D4* comparée à *w*Tai et *w*KueYo, suggérant que l'opéron *B3-B6* pouvait également présenter des homologies de séquences et d'organisation avec *Wolbachia*. Le premier couple d'amorces RibAF/VirD4R permet de tester par PCR la présence de l'opéron *virB8-D4*, et le second couple VirB3F/VirB6R celle de l'opéron *virB3-B6* (tableau 2.1 et figure 2.4). Les PCR réalisées sur ADN de *w*Vul, *w*Ase et *w*Pru et *w*Pet se sont révélées positives (figure 2.3).



<u>Figure 2.3:</u> Détection par Long Range PCR des deux opérons *virB8-D4* et *virB3-B6* sur différentes souches de *Wolbachia* avec les amorces RibAF/VirD4R et VirB3F/VirB6R. Puits 1 et 5, ADN extrait d'*A. vulgare* hébergeant *w*Vul; puits 2 et 6, ADN de *P. d. petiti* hébergeant *w*Pet; puits 3 et 7, ADN de *O. asellus* hébergeant *w*Ase; puits 4 et 8, ADN de *P. pruinosus* hébergeant *w*Pru.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les amplicons *virB8-D4* (6.342 kb) et *virB3-B6* (4.619 kb) obtenus à partir de l'ADN de *w*Vul ont été séquencés révélant la composition des deux opérons. Les séquences nucléotidiques relatives aux deux opérons ont été déposées dans la banque de données Genbank (xxxx *: phosphatase-virD4* et xxxx : *virB3-virB6*). Le premier opéron est composé de 5 gènes *vir* (*virB8, virB9, virB10, virB11* et *virD4*), et le second de 3 gènes *vir* (*virB3, virB4* et *virB6*). La présence de ce second opéron *vir* est mise en évidence pour la première fois chez une souche de *Wolbachia* (figure 2.4). Les tailles des gènes et des protéines correspondantes sont mentionnées dans le tableau 2.2. Enfin, les 4 gènes orthologues à *virB1, virB2, virB5* et *virB7* d'*Agrobacterium tumefaciens* n'ont pas été détectés au niveau des deux loci *vir* mis en évidence.

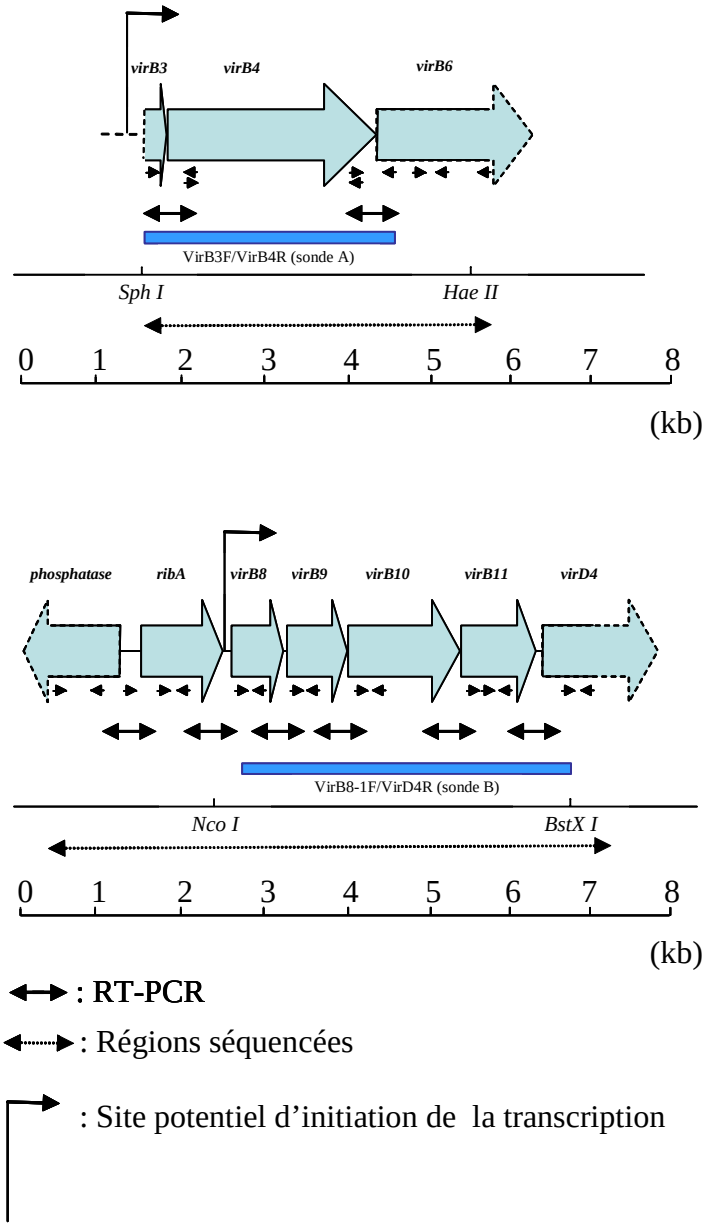
3.3 Identification des gènes en amont de l'opéron *virB8-D4*

L'utilisation d'amorces situées en 5' de l'opéron *virB8-D4* (tableau 2.1) nous a permis d'identifier les deux gènes situés en amont de cet opéron (figure 2.4 et tableau 2.2). Le premier code pour une Phosphatase, et le second, plus en aval, code pour RibA, une GTP cyclohydrolase II qui est une enzyme bi-fonctionnelle possédant les activités de 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase et de GTP cyclohydrolase II. Cette enzyme est connue pour catalyser deux étapes essentielles de la biosynthèse des riboflavines. Les séquences nucléotidiques relatives aux gènes *phosphatase* et *ribA* ont été déposés dans la banque de données Genbank (xxxx : *phosphatase-virD4*).

Gène	Taille du gène (en pb)	Taille de la protéine correspondante (en acides aminés)
virB3	>223	>72
virB4	2406	801
virB6	>1947	>649
phosphatase	>739	>246
ribA	1083	360
virB8	681	226
virB9	792	263
virB10	493	493
virB11	993	330
virD4	>757	>143

Tableau 2.2 : Taille des gènes *vir, phosphatase* et *ribA*, et taille des protéines correspondantes chez la souche *w*Vul.

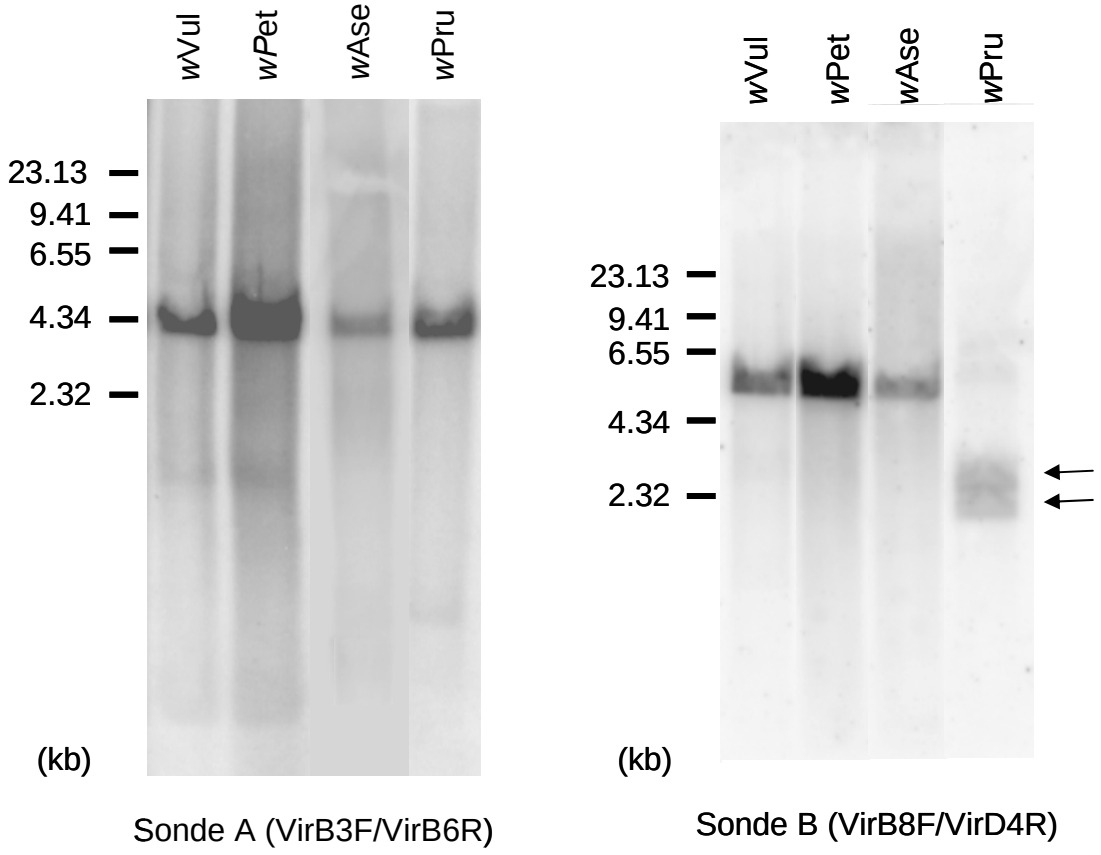
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 2.4 :</u> Représentation schématique de l'organisation en deux opérons des gènes *vir* chez *w*Vul. Les cadres de lectures sont représentés par des flèches pleines indiquant leur orientation. Les lignes bordées par des flèches se faisant face indiquent les régions amplifiées par RT-PCR pour l'analyse transcriptionnelle. Les rectangles bleus indiquent les sondes d'ADN utilisées pour les analyses génomiques par Southern blot.

Les expériences de Southern blot réalisées sur les deux opérons indiquent que les opérons sont localisés à des loci différents sur le génome de *w*Vul (figure 2.5). Par analogie avec le génome de *w*Mel (annotation en cours), la distance minimale entre les deux loci a été estimée supérieure à 685 kb. De plus, ces expériences nous indiquent qu'il n'existe pas de paralogue sur le génome de *w*Vul et ce pour chacun des huit gènes *vir* identifiés. Ce résultat

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 2.5:</u> Analyses génomiques par Southern blot des opérons *virB8-D4* et *virB3-B6* chez *w*Vul, *w*Pet, *w*Ase et *w*Pru. L'hybridation a été réalisée avec les sondes A et B indiquées en figure 2.4.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

est similaire à celui observé chez *E. chaffeensis*, mais différent de celui démontré chez *A. phagocytophila* et *Rickettsia prowazekii* chez lesquelles la présence d'un paralogue du gène *virB4* a été mis en évidence (Andersson et al., 1998 ; Ohashi et al., 2002). Pour *w*Pru, la présence de deux bandes peut s'interpréter par le fait qu'il existe un site de reconnaissance pour l'une des deux endonucléases de restriction (*Nco*I ou *Bstx*I) utilisées pour digérer l'ADN.

3.4 Analyse transcriptionnelle des gènes virB et virD (wVul) dans les ovocytes d'*Armadillidium vulgare*

Les espaces intergéniques entre les gènes *virB8, -B9, -B10, -B11, -D4* pour le premier locus et *virB3, -B4,-B6* pour le second locus étant très courts, voire inexistants (figure 2.4), nous avons présumé que ces groupes de gènes étaient cotranscrits comme cela a été montré chez *w*Tai et *w*KueYO (Masui et al., 2000b). L'expression de chaque gène constituants les deux opérons *vir* a été testée par RT-PCR à partir d'ARN totaux isolés des ovocytes de l'hôte infecté et retrotranscrits (ADNc). Nous avons tout d'abord testé l'expression par RT-PCR de chaque gène *vir* par *w*Vul dans les ovocytes de son hôte. L'expression des gènes *phosphatase* et *ribA* situés en amont de l'opéron *virB8-D4* (figures 2.6 et 2.7) a également été étudiée. La position des amorces utilisées est indiquée sur la figure 2.4.

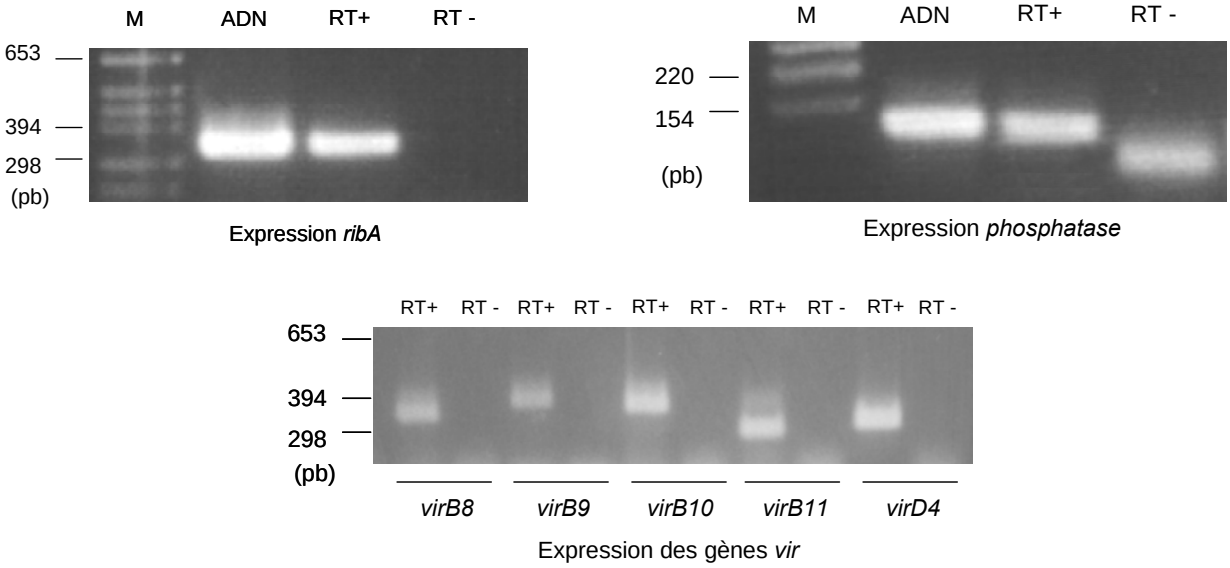
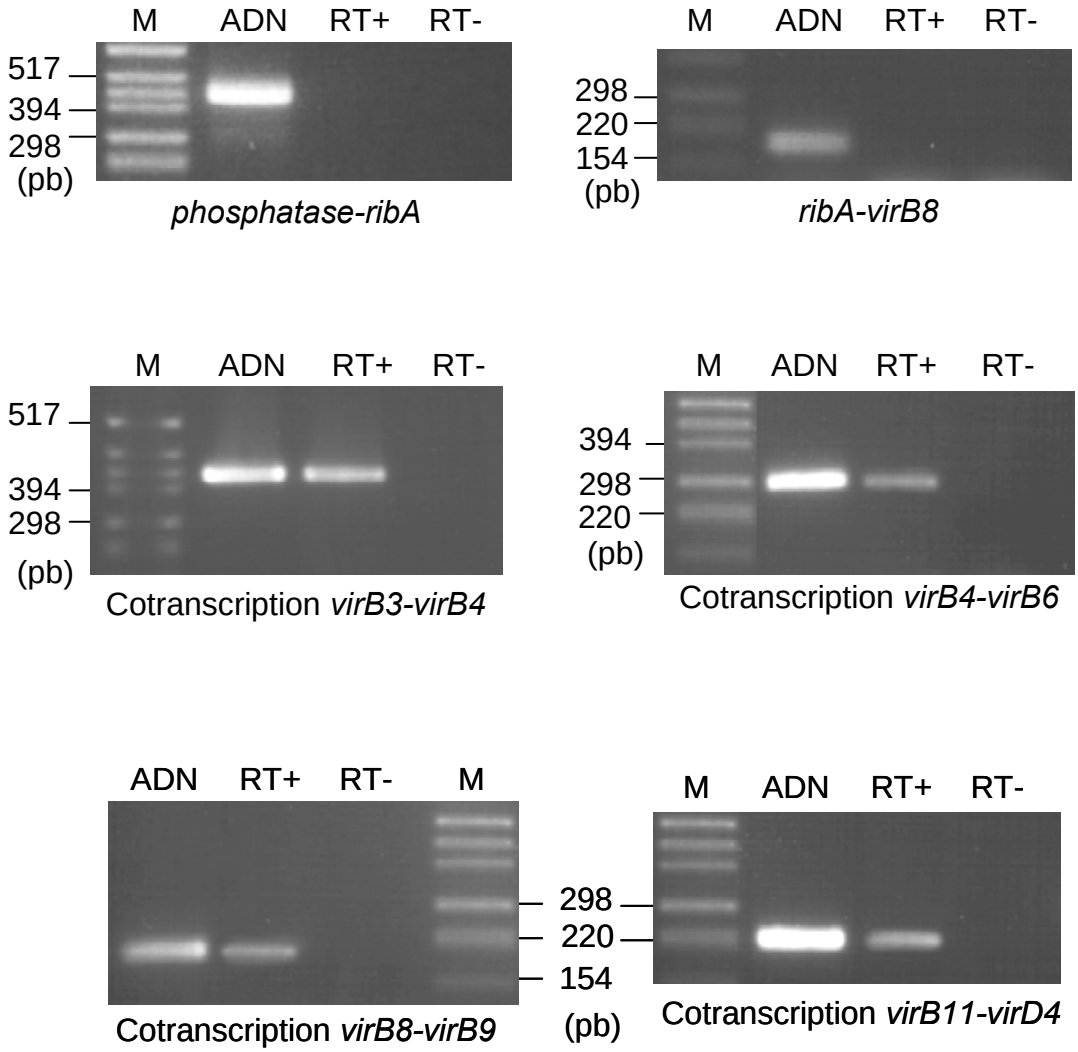


Figure 2.6 : Analyse en RT-PCR de l'expression des gènes *phosphatase, ribA, virB8, -B9, -B10, -B11, -D4,* chez *w*Vul isolée à partir d'ovocytes. Piste ADN, contrôle positif ; piste

RT+, PCR réalisée avec Reverse Transcriptase ; RT-, PCR réalisée sans Reverse Transcriptase. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 2.1 et la figure 2.4.



<u>Figure 2.7 :</u> Analyse transcriptionnelle des groupes de gènes *vir* chez *w*Vul isolée à partir d'ovocytes. Piste ADN, contrôle positif ; piste RT+, RT réalisée avec Reverse Transcriptase ; RT-, RT réalisée sans Reverse Transcriptase. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 2.1 et la figure 2.4. Piste M, marqueur de taille.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les PCR sur ADNc nous ont permis de détecter les transcrits des gènes *virB3*, *virB4*, *virB6* (non illustré), *phosphatase*, *ribA*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* et *virD4* dans les ovocytes (figure 2.6). En l'absence de Reverse Transcriptase, aucun amplicon n'est détecté quelque soit le couple d'amorces utilisé. Ce témoin indique l'absence de contamination par de l'ADN génomique dans les échantillons d'ARN.

Par la suite, la cotranscription des gènes adjacents pris par paire (*phophatase-ribA*, *ribA-virB8*, *virB8-virB9*, *virB9-virB10*, *virB10-virB11*, *virB11-virD4*, *virB3-virB4* et *virB4-virB6*), a été testée à l'aide d'amorces chevauchantes (figure 2.4), l'amorce sens se situant dans la partie 3' codante du premier gène et l'amorce antisens dans la partie 5' codante du deuxième gène situé en aval. Comme il est montré sur la figure 2.7, les transcrits de gènes *vir* adjacents incluant leur espace intergénique lorsqu'il existe (*virB8-virB9*, *virB9-virB10*, *virB10-virB11*, *virB11-virD4*, *virB3-virB4* et *virB4-virB6*), ont été révélés positifs par analyse en RT-PCR (figure 2.7, *virB9-virB10*, *virB10-virB11* non illustrés). Les transcrits des gènes adjacents situés en amont de l'opéron *virB8 -D4* (*phophatase-ribA* et *ribA-virB8*) n'ont pas été détectés par analyse en RT-PCR (figure 2.7). Ces résultats nous indiquent que le groupe de gènes *virB3*, *virB4* et *virB6* est cotranscrit en un opéron, ainsi que le deuxième groupe de gènes *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* et *virD4*, alors que les gènes *phosphatase* et *ribA* sont transcrits individuellement et séparément des gènes *vir*. Le site d'initiation de la transcription n'a pas été déterminé mais sa localisation est fortement présumée dans la région 5' de l'opéron. La caractérisation des régions promotrices chez *E. chaffeensis* indique qu'il existe deux sites d'initiation de la transcription. Le premier se trouve dans l'espace intergénique *ribA-virB8*, et le second se situe dans la région 3' codante du gène *ribA*, suggérant que l'expression du gène *ribA* pourrait influencer la transcription de l'opéron *virB8-D4*.

3.5 Analyse transcriptionnelle des gènes *virB* et *virD* dans les hémocytes de *w*Vul

Chez *A. vulgare*, les hémocytes peuvent véhiculer *Wolbachia* alors que leur rôle initial escompté est de les phagocyter. Un mécanisme encore inconnu permet à la bactérie de rester intacte dans les hémocytes au sein d'un système membranaire (figure B-b, Introduction). Dans ce contexte, il nous a donc semblé intéressant de tester l'expression des gènes *vir* par

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

*w*Vul dans les hémocytes. Nous avons testé comme précédemment dans les ovocytes, l'expression de ces gènes par RT-PCR. De façon inattendue, aucun des transcrits des gènes *vir*

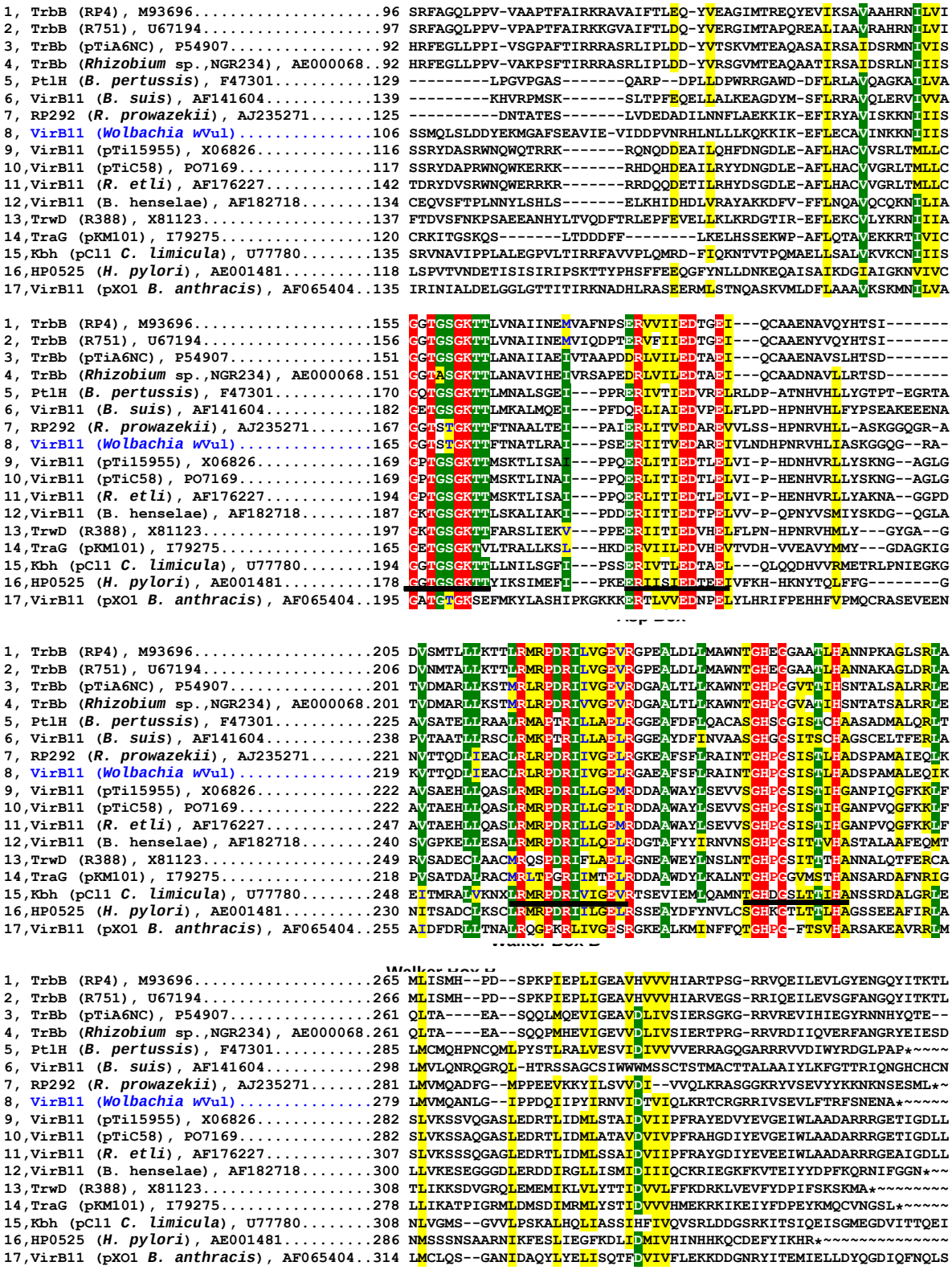


Figure 2.8 : **Alignement des NTPases de la famille de VirB11. Les séquences d'acides aminés ont été alignées et comparées avec le programme EDTALN. (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/edtaln_in.pl). Acides aminés sur fond rouge et lettres**

blanches : 100% d'identité ; Acides aminés sur fond vert et lettres blanches : au moins 75% de conservation de résidus identiques ; Acides aminés sur fond jaune : au moins 75% d'identité de conservation de résidus similaires. Les quatre motifs communs des NTPases de la famille de VirB11 sont indiqués par un trait horizontal.
1,TrbB (plasmide RP4), M93696; **2**, TrbB (plasmide R751), U67194 ; **3**, TrbB (plasmide pTiA6NC), P54907 ; **4**, TrbB (*Rhizobium* sp. Plasmide ; NGR234), AE000068 ; **5**, VirB11 (*Bordetella pertussis*), F47301 ; **6**, VirB11 (*Brucella suis*), AF141604 ; **7**, RP292 (*Rickettsia prowazekii*), AJ235271; **8**, VirB11 (*Wolbachia* souche wVul) ; **9**, VirB11 (plasmide pTi15955), X06826 ; **10**, VirB11 (plasmide pTiC58), PO7169 ; **11**, VirB11 (*Rhizobium etli*), AF176227 ; **12**, VirB11 (*Bartonella henselae*), AF182718 ; **13**, trwD (plasmide R388), X81123; **14**, TraG plasmide pKM101), I79275 ; **15**, Kbh (*Chlorobium limicula*), U77780 ; **16**, HP0525 (*Helicobacter pylori* cag), AE00148 ; 17, VirB11 (*Bacillus anthracis* plasmide pXO1), AF065404

n'a été détecté (non illustré), bien que l'expression du gène *wsp* (témoin positif bactérien) ait été mise en évidence par cette méthode. Ces résultats devront être confirmés par une technique de détection plus sensible. Un problème de quantité de transcrits des gènes *vir* peut être à l'origine de cette non détection.

3.6 Analyse des protéines codées par les gènes *vir*

La localisation cellulaire des protéines orthologues Vir de *w*Vul a été étudiée grâce au programme d'analyse PSORT (tableau 2.3). La prédiction de localisation de ces protéines est identique à celle montrée par Christie (2001) pour les protéines du système de transfert du T-DNA, excepté pour la protéine VirB11. A partir des analyses PSORT, la localisation de VirB11 de *w*Vul est prédite cytoplasmique, alors que celle proposée par Christie concernant l'othologue VirB11 est périphérique à la membrane interne. Parmi les différentes protéines homologues à VirB11, la protéine RP4 TrbB a été détectée dans la fraction cytoplasmique (Grahn et al., 2000), et les protéines Ti VirB11 (Rashkova et al., 1998 ; Christie et al., 1989) et R388 TrwD (Rivas et al., 1997) ont été mises en évidence à la fois dans les fractions cytoplasmiques, de la membrane interne et externe. La localisation de la protéine VirB11 ne semble donc pas commune selon les différents orthologues. Par contre, l'une des caractéristiques retrouvée chez toutes les protéines orthologues à VirB11 est la présence de motifs NTPases nécessaires à une réaction de transport transmembranaire. En effet, les NTPases des systèmes de sécrétion de type II et de type IV partagent quatre motifs hautement conservés (figure 2.8) : Walker Box A, Asp Box, Walker Box B et His Box (Rivas et al., 1997). Ces NTPases sont généralement hydrophiles et ne présentent pas de domaines transmembranaires ni de signaux d'exportation N-terminaux. La protéine VirB11 de *w*Vul répond à ces paramètres : elle est cytoplasmique et possède ces quatre motifs de NTPases (figures 2.8 et 2.10). Elle serait liée au complexe transmembranaire par l'intermédiaire d'autres protéines Vir ancrées dans la membrane bactérienne.

Parmi les bactéries Gram négatives intracellulaires étudiées, VirB11 est également la protéine la plus conservée ; elle partage 28.5% d'identité avec les protéines orthologues

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Protéine Vir	Analyse PSORT[a]	Localisation[b]	% d'identité en acide aminés								
			Wolbachia sp. souche *w*Vul	*Wolbachia sp.* souche *w*Tai	*Wolbachia sp.* souche *w*KueYo	*Ehrlichia chaffeensis*	*Anaplasma phagocytophila*	*Rickettsia prowazekii*	*Bordetella pertussis*	*Brucella suis*	*Agrobacterium tumefaciens*
VirB3	IM	OM	100 (72, partiel)	ND	ND	59,7 (97)	54,2 (97)	43,1 (ND[c],95)	15,7 (104)	16,9 (116)	17,6 (108)
VirB4	Cytoplasmique	Integral IM	100 (801)	ND	ND	76,3 (800)	71,1 (801)	58,4 RP103 (805) 26 RP784 (810)	31,7 (824)	31,4 (832)	30,9 (789)
VirB6	IM	Polytopic IM	100 (649, partiel)	ND	ND	39,5 (826)	33,7 (486, partiel)	17,9 RP104 (1124) 20,7 RP105 (672) 18,3 RP106 (971) 18,4 RP107 (888) 18,1 RP108 (1155)	17,1 (463)	15,8 (347)	16,9 (295)
VirB8	IM	IM	100 (226)	93,6 (226)	88,5 (226)	50,8 (237)	49,1 (234)	19,7 (247) 33,1 RP289 (202)	27 (233)	29,2 (239)	22,4 (237)
VirB9	OM	OM	100 (263)	91,3 (263)	88 (266)	44,4 (273)	43,1 (281)	24,2 (157) 29 RP286 (250)	25,1 (273)	23,3 (289)	21,2 (293)
VirB10	IM	Bitopic IM	100 (493)	73,6 (503)	80,7 (486)	37,5 (447)	37,5 (434)	27,8 (483)	21,1 (374)	20,2 (391)	22,3 (377)
VirB11	Cytoplasmique	Périphérique IM	100 (330)	93 (330)	91,8 (330)	77,4 (330)	72,5 (332)	66,5 (334)	37,6 (339)	31,7 (397)	28,5 (344)
VirD4	IM	Integral IM	100 (143,partiel)	95,1 (666)	91,6 (667)	57,2 (714)	55,9 (740)	50,4 (591)	ND	ND	18,3 (668)

<u>Tableau 2.3:</u> Prédiction de localisation des protéines Vir de *w*Vul, identité en acides aminés (aa), nombre d'acides aminés (entre parenthèses) des orthologues Vir de bactéries Gram négative sélectionnées comparées à celle de *w*Vul. IM : Inner Membrane ; OM : Outer Membrane

[a] : Localisation selon le programme PSORT

[b] : Localisation selon Christie (2001)

ND : non déterminé

d'*Agrobacterium tumefaciens*, 37.6% avec *Bordetella pertussis*, 77.4% avec *E. chaffeensis* et jusqu'à 93% avec *w*Tai (tableau 2.3). La protéine VirB10, la plus variable, présente 73.6%

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

d'identité avec *w*Tai et 80.7 % avec *w*KueYo. Sa séquence est aussi significativement plus longue chez les bactéries intracellulaires obligatoires (*Wolbachia* sp., *E. chaffeensis*, *A. phagocytophila*, et *Rickettsia prowazekii*) que chez les bactéries intracellulaires facultatives (*Agrobacterium tumefaciens, Brucella suis, Bordetella pertussis*), allant de 374 acides aminés chez *Bordetella pertussis* à 503 chez *w*Tai.

Les protéines orthologues VirB8, -B9, -B10, -B11 et -D4 de *w*Vul ont de fortes identités de séquences avec celles de *w*Tai et *w*KueYo, et dans une moindre mesure avec celles de *E. chaffeensis, A. phagocytophila*, et *Rickettsia prowazekii*. Toutes ces bactéries sont des α-protéobactéries intracellulaires obligatoires.

Parmi les différentes souches de *Wolbachia*, les protéines Vir de *w*Vul offrent, globalement, des identités de séquences plus élevées avec celles de *w*Tai qu'avec celles de *w*KueYo. Les identités de séquences élevées entre les différentes souches de *Wolbachia* suggèrent que la fonction de transport moléculaire à travers la membrane bactérienne du système de sécrétion de type IV est conservée. Cette forte identité de séquences des protéines Vir peut être étendue au groupe des bactéries intracellulaires obligatoires. Par contre, comparées au groupe des bactéries intracellulaires facultatives, les divergences de séquences sont plus notables. Ceci semble suggérer que le système de sécrétion de type IV n'est pas strictement identique, voire ne joue pas le même rôle dans les deux groupes de bactéries (Ohashi et al., 2002).

4. DISCUSSION

L'utilisation d'ovaires de femelles adultes infestées par *Wolbachia* nous a permis d'obtenir par centrifugations différentielles des fractions enrichies en *Wolbachia* pour l'extraction d'ADN et d'ARN bactériens (voir chapitre I, 2.3.2. Isolement de bactéries). Des expériences préliminaires réalisées sur des ADN ou ARN issus de fractions non enrichies ont en effet donné des résultats inconstants du fait de la quantité et de la qualité insuffisantes des ADN ou ARN bactériens extraits.

Grâce à l'utilisation d'amorces et au séquençage par marche sur le chromosome, un total de 8 gènes orthologues à *virB3*, *virB4*, *virB6*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* et *virD4*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

constituant le système de sécrétion de type IV a été caractérisé dans le génome de *w*Vul. Selon certains auteurs, le système de sécrétion de type IV, ne peut être considéré comme fonctionnel que s'il comporte au moins les sept protéines Vir suivantes : VirB4, VirB7 (ou VirB8), VirB9, VirB10, VirB11 et VirD4 (Covacci et al., 1999 ; Winans et al., 1996). Les gènes identifiés chez *w*Vul représentent donc plus que le minimum nécessaire au fonctionnement du système de sécrétion de type IV chez les bactéries Gram négatives. Les gènes *vir* sont organisés en deux opérons situés à deux loci différents. L'un est composé de *virB3*, *virB4* et *virB6* (opéron *virB3-B6*), et le second de *virB8, virB9, virB10, virB11* et *virD4* (opéron *virB8-D4*). Cette organisation est similaire à celle décrite chez deux autres α-protéobactéries intracellulaires obligatoires : *A. phagocytophila* et *E. chaffeensis* (Ohashi et al., 2002), et à celle décrite chez *w*Tai et *w*KueYo pour l'opéron *virB8-D4* (Masui et al., 2000b). Comme chez *A. phagocytophila* et *E. chaffeensis*, les gènes orthologues à *virB1, virB2, virB5,* et *virB7* d'*Agrobacterium tumefaciens* n'ont pas été détectés chez *w*Vul au niveau des loci contenant les opérons *virB3-B6* et *virB8-D4*. Cependant, ces gènes pourraient être éventuellement présents sur le génome de *w*Vul mais avec une identité de séquence très faible avec des orthologues putatifs chez d'autres bactéries Gram négatives. De plus, les gènes codant les protéines VirB2 et VirB5 sont de petite taille donc assez difficiles à détecter par identité de séquences. Leur absence probable peut également s'expliquer par le fait que les gènes *virB1, virB2* et *virB5* codent des protéines exocellulaires impliquées dans l'attachement à la cellule receveuse. Cependant, chez *Bordetella pertussis*, le gène codant la protéine VirB5 est absent, mais du fait que le système IV de cette bactérie est impliqué dans la formation du pilus, c'est la protéine VirB2 qui pourra jouer le même rôle que VirB5. L'absence des gènes *virB2* et *virB5* laisse supposer que le système IV chez *w*Vul n'est pas impliqué dans la formation du pilus. Lorsque l'infection par *w*Vul est établie dans les cellules de son hôte, on peut concevoir que la libération de molécules d'origine bactérienne (facteurs de virulence) au travers du système IV intervienne directement dans le cytoplasme hôte. Une adhésion à la membrane cellulaire n'est donc pas nécessaire. Cette dernière hypothèse n'est pas en faveur d'une exotoxine sécrétée dans le milieu interne baignant les organes (plasma). Lors de l'infection expérimentale d'un *Armadillidium vulgare* sain, il est cependant vraisemblable que *Wolbachia* adhère à la surface externe de la membrane des hémocytes et des cellules non phagocytantes pour y induire son internalisation. Les hémocytes peuvent phagocyter la bactérie mais cette dernière semble échapper à la dégradation. Les cellules constitutives des organes ne sont pas, en principe, capables de phagocytose, et la bactérie

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

réussit à les coloniser progressivement. On peut donc supposer que la bactérie induit son internalisation. Ceci rappelle la capture de bactéries comme *Yersinia* par l'invasine dans des cellules non phagocytantes en culture (Isberg et Barnes, 2001). Chez les isopodes terrestres, il est possible que *Wolbachia* adhère à la surface des cellules de l'hôte et établisse ainsi des contacts avec les chaînes β des récepteurs intégrines. Chez *w*Mel, aucun des gènes annotés ne correspond à une séquence codant une protéine de type invasine, cependant il existe, dans le génome, une séquence avec des identités non négligeables. Cette séquence pourrait correspondre à un gène de l'invasine mais qui ne serait pas fonctionnel (gène tronqué de 486 pb). Chez *Wolbachia*, d'autres molécules participent vraisemblablement à son internalisation. Chez *Salmonella* spp., le processus d'internalisation des bactéries est le résultat d'une interaction entre ces bactéries et les cellules (Galan et Zhou, 2000). Immédiatement après contact, *Salmonella* délivre plusieurs protéines effectrices dans le cytosol de la cellule hôte au moyen d'un organite spécialisé, le système de sécrétion de type III. L'activation des petites protéines liant le GTP, cdc 42 et Rac, par SopE et SopB est suivie de réarrangement de l'actine et du cytosquelette. Ces réarrangements se poursuivent et sont amplifiés par SipA. SopE est un facteur d'échange pour ces GTPases et SopB est une phosphatase inositol polyphosphate. Ce mécanisme parfaitement coordonné dans le temps qui délivre ces facteurs de virulence protéique, nous amène à nous interroger sur la différence fonctionnelle entre les systèmes de sécrétion de type III et IV. Le complexe du système III a permis de comprendre le transit des protéines effectrices à travers la paroi bactérienne. Cependant, la translocation des protéines sécrétées à l'intérieur de la cellule hôte n'est pas parfaitement élucidée. Ce mécanisme nécessite différentes translocases SipB, SipC et SipD (Fu et Galan, 1998). Ces protéines sécrétées sont nécessaires à la translocation de la tyrosine phosphatase SptP qui antagonise l'action de cdc42 et Rac (Galan et Zhou, 2000). Une recherche dans la banque TIGR (génome *w*Mel) n'a pas permis d'identifier de protéines ayant des analogies de séquences significatives. Ces protéines Sip pourraient former un canal permettant aux protéines effectrices de traverser la membrane de la cellule eucaryote (Neyt et Cornelis, 1999). De plus, les salmonelles possèdent un deuxième système de type III qui ne devient fonctionnel que lorsque les bactéries sont entrées dans la cellule hôte. Peut-on concevoir que chez *Wolbachia* le système de sécrétion de type IV puisse remplir, suivant les conditions extra ou intracellulaires, ces mêmes fonctions ? Des études récentes ont signalé chez certaines bactéries Gram négatives la présence de deux systèmes de sécrétion de type IV. Cependant, les effecteurs et le sens de transit semblent différents.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

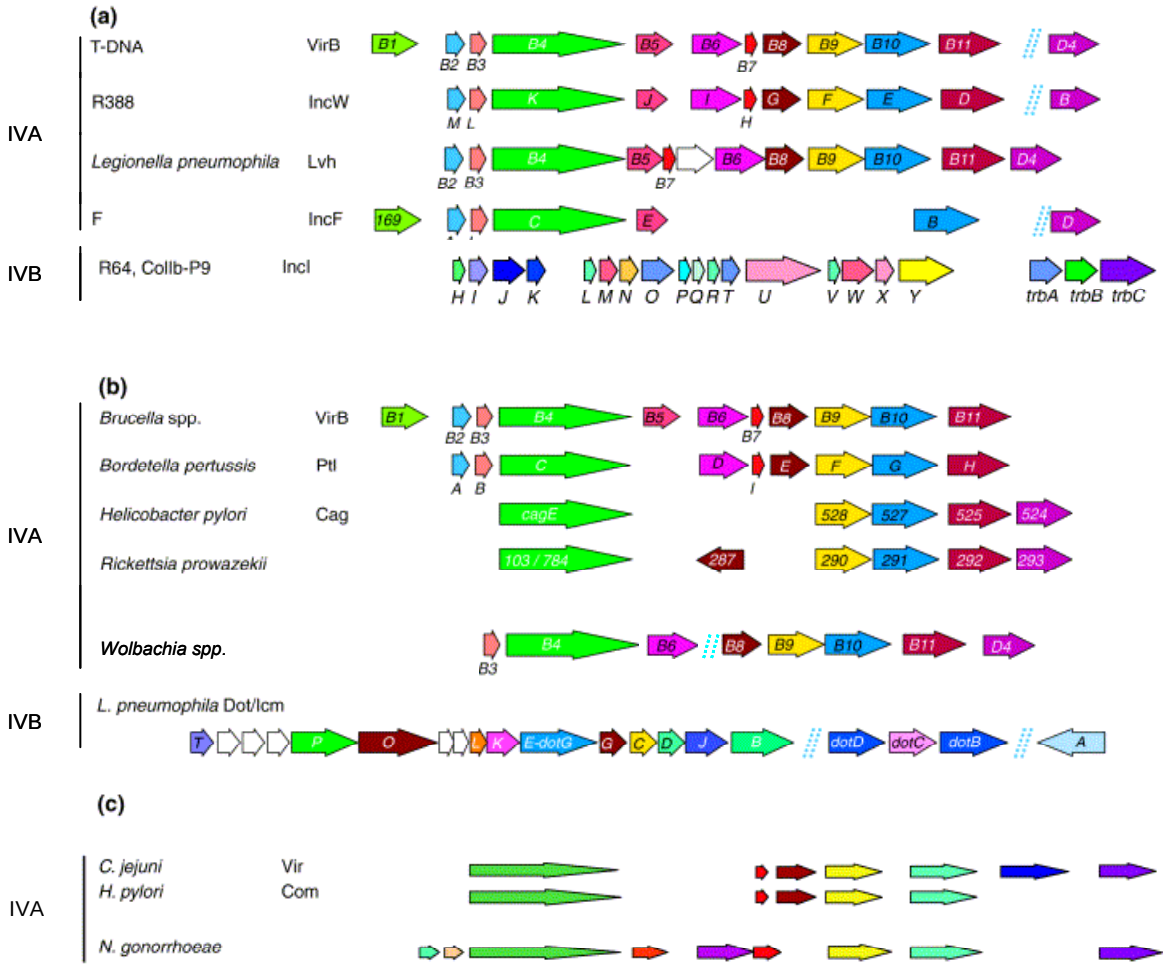
Les analyses génétiques nous ont permis de montrer que ces gènes *vir* qui sont organisés en deux opérons localisés en deux loci distincts sur le chromosome bactérien, sont cependant cotranscrits dans les ovocytes d'*Armadillidium vulgare*. Dans les hémocytes des femelles infectées par *w*Vul, l'expression des gènes *vir* n'a pas été mise en évidence. Le système de sécrétion de type IV est donc susceptible d'être fonctionnel dans les ovocytes.

Les systèmes de sécrétion de type IV ont récemment été classés en deux groupes (Christie, 2001). Le premier groupe (A) réunit les types dont les gènes sont orthologues aux gènes *virB* et *virD* de *Agrobacterium tumefaciens* ainsi que les systèmes de sécrétion de type IV de la plupart des bactéries dont *Legionella pneumophila lvh* (figure 2.9). Le second groupe (B) contient les gènes *dot-icm* de *Legionella pneumophila* (Segal et al., 1998 et 1999b) et les gènes *colIb* (IncI) de *Shigella flexnerii* (Christie, 2001). Le système Lvh de *L. pneumophila* fonctionne comme un système de conjugaison (transfert d'ADN), tandis que le système *dot-icm* est nécessaire pour la virulence des bactéries.

Le système de sécrétion de type IV identifié dans notre étude appartient au groupe A, les gènes *vir* de *w*Vul étant des orthologues des gènes *vir* de *Agrobacterium tumefaciens*. Cependant, alors que les gènes *virB* et *virD* des bactéries intracellulaires ou extracellulaires facultatives sont situés en un même locus, ceux de *w*Vul ont été localisés en deux loci distincts. Ceci est également le cas pour *A. phagocytophila* et *E. chaffeensis* (deux loci) et *Rickettsia* spp. (trois loci), qui sont, comme *Wolbachia*, des bactéries intracellulaires obligatoires. Cet arrangement de gènes peut permettre un contrôle de la transcription indépendant des loci distincts, assurant, par ce biais, que le système de sécrétion de type IV ne soit assemblé complètement que lorsque deux conditions sont réunies.

L'organisation des gènes *vir* du système de sécrétion de type IV de *w*Vul est très similaire chez *A. phagocytophila, E. chaffeensis*, et *Rickettsia* spp., groupes frères des *Wolbachia.* Cependant, des paralogues des gènes *virB4* et *virB6* ont été identifiés sur les génomes de *Rickettsia prowazekii* et *A. phagocytophila*. Chez *E. chaffeensis* et *w*Vul, aucun paralogue des gènes *vir* n'a été mis en évidence et chez ces bactéries, le gène *ribA* se retrouve en 5' de l'opéron (*virB8-D4*). Ces informations renforcent les similarités d'organisation des gènes *vir* entre *E. chaffeensis* et *w*Vul.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 2.9 :</u> Conservation des gènes du système de sécrétion de type IV. Le système de référence *virB-D4* d'*Agrobacterium tumefaciens* est de type IVA (ligne T-DNA), composé de 11 protéines VirB et de VirD4. Les gènes codant les protéines orthologues de VirB et VirD4 sont représentés par couleur. (a), Systèmes de conjugaison ; (b), Système de translocation d'effecteurs ; (c), Transfert d'ADN (D'après Christie et Vogel., 2000 et Ding et al., 2003).

Chez *E. chaffeensis*, il a été montré que l'une des régions promotrices du gène *virB8* est probablement localisée dans la région 3' codante du gène *ribA* (Ohashi et al., 2002), suggérant que l'expression de *ribA* puisse influencer la transcription de l'opéron *virB8-D4*. Les similarités du système de sécrétion de type IV observées entre *E. chaffeensis* et *w*Vul

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

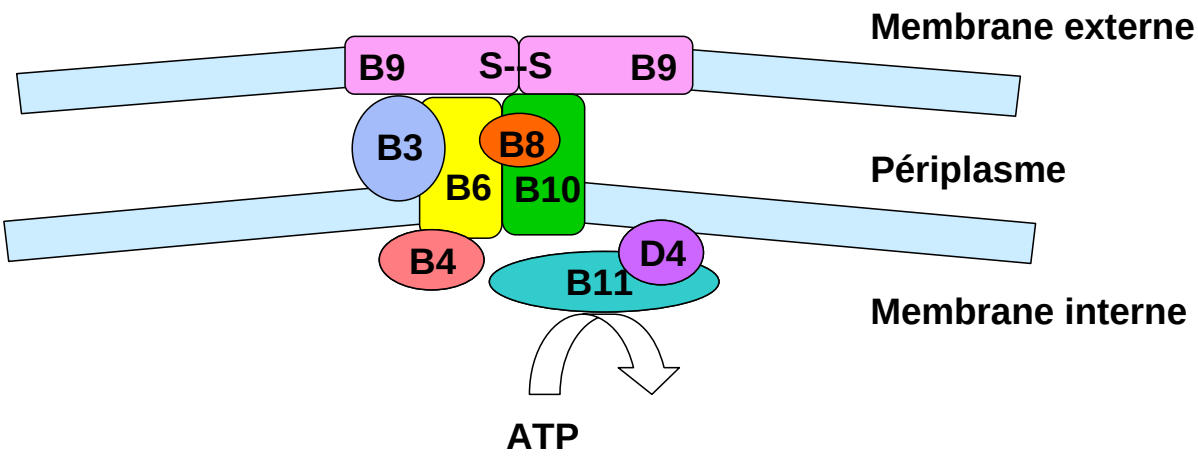
nous permettent de penser que l'expression de *ribA* pourrait également influencer la transcription de l'opéron *virB8-D4* chez *w*Vul. De plus, l'espace intergénique entre *ribA* et *virB8* chez *w*Vul (72 pb) est plus petit que chez *E. chaffeensis* (134 pb).

Le gène en 3' de l'opéron *virB8-D4* de *w*Vul n'a pas été identifié du fait d'une très grande variabilité de séquences dans cette région. En effet, les alignements entre les séquences en 3' du gène *virD4* de *w*KueYo, *w*Tai, *A. phagocytophila* et *E. chaffeensis* n'ont pas pu aboutir à une séquence consensus. Un gène codant une protéine antigénique de la membrane externe (paroi) a été localisé en aval de l'opéron *virB8-D4* chez *A. phagocytophila, E. chaffeensis, w*KueYo et *w*Tai mais pas chez *E. chaffeensis.* Ohashi et al. (2002) ont montré que ce gène est cotranscrit avec l'opéron *virB8-D4*. Cet antigène spécifique à chaque bactérie peut être associé au système de sécrétion de type IV. Chez la bactérie Gram négative *Helicobacter pylori,* pathogène pour l'homme et l'animal, la protéine sécrétée par le système de sécrétion de type IV avait tout d'abord été identifiée comme un antigène (Tummuru et al., 1993), puis elle a été colocalisée au niveau de l'îlot de pathogénicité « cag » constitué des gènes du système de sécrétion de type IV (Censini et al., 1996). Chez *H. pylori*, la toxine sécrétée (ou effecteur) est donc génétiquement liée aux gènes formant le système de sécrétion. C'est également le cas chez *Bordetella pertussis*, où les gènes codant les 5 sous unités de la toxine pertussique (opéron *ptx*) ont été localisés 55 pb en amont de l'opéron *ptl* regroupant les gènes du système de sécrétion de type IV (Nicosia et al., 1986). Il a été proposé que cette espace intergénique de 55 pb contienne des informations pour une terminaison de la transcription faible de l'opéron *ptx*, et qui serait alors responsable de la régulation de la transcription de l'opéron *ptl.* Cette région de 55 pb serait donc responsable de l'équilibre entre la quantité de toxine pertussique sécrétée et la quantité de protéines formant le système de sécrétion (Ricci et al., 1996).

Bien que le rôle du système de sécrétion de type IV ne soit pas élucidé chez *w*Vul, la présente étude montre que ce système est exprimé dans les ovocytes de l'hôte et que les gènes nécessaires à la formation du canal transmembranaire ainsi que les ATPases associées à son fonctionnement sont présents. La structure prédite des protéines VirB8 à VirB10 (tableau 2.3) permet d'en faire les constituants probables du pore transmembranaire. La protéine VirB1, dont le gène semble absent du génome de *w*Vul, possède une activité transglycosylase. Cette protéine est donc susceptible de provoquer un lyse locale de la paroi de la bactérie permettant l'assemblage des autres constituants du pore. Chez *Bordetella pertussis*, le gène codant VirB1 est également absent, mais le gène codant la protéine VirB8 est présent. Cette protéine VirB8

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

possède un domaine lytic transglycosylase, et peut donc remplir le rôle de VirB1. La protéine VirB8 de *w*Vul ne possède pas de domaine à activité transglycosylase. La lyse locale de la paroi bactérienne serait soit réalisée par une autre protéine encore inconnue, soit non nécessaire à la formation du pore, et ce serait un autre mécanisme qui serait mis en place. VirB6 et VirB10 sont des protéines de membrane interne alors que VirB9 est une protéine associée à la membrane externe. De nombreuses interactions ont été démontrées entre les protéines VirB8, VirB9 et VirB10 mais VirB10 qui présente un domaine périplasmique carboxy-terminal de grande taille pourrait être le lien entre les éléments de la membrane externe et ceux de la membrane interne (Christie, 2001). La comparaison de séquences en acides aminés parmi différentes bactéries Gram négatives (tableau 2.3) montre que VirB 10 est aussi la protéine la plus variable. Le gène codant l'homologue de CagY chez *Helicobacter pylori*, contient un nombre important de répétitions de séquences pouvant mener à de nombreux réarrangements. Les délétions ou duplications se produisant résultent en la production de nombreuses protéines CagY différentes en taille dans une population cellulaire de *H. pylori*. Ce processus permet d'exposer une sous unité de la protéine CagY variable et ainsi de minimiser voire d'éviter sa reconnaissance par des anticorps de l'hôte. Le gène *virB10* de *w*Vul ne possède pas de séquences répétées pouvant conduire à ce genre de phénomène, même si la variabilité de séquence de la protéine VirB10 est la plus élevée entre les différents orthologues connus chez les bactéries Gram négatives.



<u>Figure 2.10 :</u> Représentation schématique de la localisation des protéines Vir du système de sécrétion de type IV chez *w*Vul selon leur fonction probable : VirB3, VirB6, VirB8, VirB9 et VirB10 formant le pore, et VirB4, VirB11 et VirD4 étant les ATPases de la membrane cytoplasmiques. Schéma adapté selon les études menées par Ding et al., 2003.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les deux protéines VirD4 et VirB11 sont des ATPases, VirD4 étant associée à la membrane interne et VirB11 étant cytoplasmique chez *w*Vul (tableau 2.3). Ces deux protéines apparaissent comme des moteurs potentiels du système de transport en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour diriger soit l'assemblage du système de transport, soit la translocation du substrat (Christie, 2001).

Notre compilation bibliographique relative au système IV nous a montré que ces systèmes de sécrétion sont constitués d'un nombre variable de protéines mais toutes ne semblent pas indispensables (neuf chez *B.pertussis*, huit chez *w*Vul) à la réalisation d'un pore fonctionnel. En outre la diversité des facteurs de virulence nous est apparue, ce qui nous a conduit à étendre notre concept de virulence que nous avions tendance à limiter aux relations intracytoplasmiques bactérie-cellule hôte. Les facteurs de virulence sont également impliqués dans les processus conduisant à l'internalisation des bactéries et peut être aussi à leur ségrégation lors du développement embryonnaire.

Le fait que certaines toxiques bactériennes (Yop J ou endotoxine (Fan et al., 1996)) soient capables d'interférer avec les voies de signalisation ne fait que conforter notre hypothèse de travail en la complétant et en démontrant la localisation intracellulaire de l'interaction.

Ces facteurs de virulence sont très nombreux et spécifiques, ils ont en commun de transiter dans un même appareil de sécrétion de type IV, aussi pourrait-on s'attendre à ce qu'ils présentent tous un ou plusieurs microdomaines d'interférence avec un ou plusieurs composants du système IV.

Le prochain chapitre de la thèse sera consacré à la recherche des facteurs de virulence de *Wolbachia* principalement dans deux tissus cibles (ovaires et glandes androgènes) par une analyse protéomique sans oublier les protéines participant à l'adaptation locale.

La recherche des facteurs de virulence ne doit pas occulter le fait que *Wolbachia* est particulièrement bien équipée pour la transposition (82 gènes de transposases dans *w*Mel). Une publication récente (Kondo et al., 2002) démontre que *Wolbachia* peut insérer une séquence partielle de son propre génome dans le chromosome X d'un insecte (*Callosobruchus chinensis*). Ce travail crédibilise l'une des hypothèses effectuées en 1984 par Legrand et Juchault, à savoir que dans la lignée f, *Wolbachia* pourrait avoir inséré dans le génome d'*A. vulgare* un segment de son propre ADN. De façon vraisemblable, cette thélygénie induite (mais sans présence physique de *Wolbachia*) serait due à un effet positionnel. En effet, tous les mâles ne sont pas inversés en néofemelles. De plus, un tiers d'entre eux transmettent le

facteur féminisant f ; cette dernière observation renforce l'hypothèse d'un effet positionnel car si les gènes bactériens insérés étaient fonctionnels, les mâles porteurs de l'insertion devraient être transformés en néofemelles. En référence à l'étude de Kondo et al. (2002), chez *A. vulgare,* il est probable que, si l'hypothèse est vraie, nous soyons en présence de pseudogènes. Ces mêmes gènes (dans le cas de la thélygénie en présence de *Wolbachia*) ne codent probablement pas les facteurs de virulence impliqués dans la féminisation que nous recherchons dans cette étude.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour clore ce chapitre, il faut se poser la question suivante : Par quel mécanisme *Wolbachia* aurait elle pu transposer des segments d'ADN ? Les protéines connues à ce jour qui s'associent à de l'ADN afin de réaliser son transit à travers les systèmes de sécrétion (VirD2 et MobA) sont absentes du génome de *w*Mel, ces mécanismes sont ils encore fonctionnels ? Existerait-il un deuxième système d'injection comme l'attestent des travaux sur certaines bactéries Gram négatives ?

Il existe donc chez *w*Vul un système de sécrétion de type IV. Il est certainement responsable de la sécrétion de protéines, puisqu'il n'existe pas de plasmides naturels chez cette bactérie, mais la nature de la protéine ou des protéines exportée(s) reste à identifier.

Les systèmes de secretion de type IV sont impliqués dans la sécrétion de nombreux facteurs de virulence. Ces systèmes sont capables d'injecter des toxines ou des complexes nucléoprotéiques qui interagissent avec la physiologie de la cellule cible, en induisant différentes réponses cellulaires. Les bactéries intracellulaires *Legionella pneumophila* et *Brucella suis* possèdent des systèmes de sécrétion de type IV permettant l'exportation d'un facteur encore inconnu assurant leur multiplication et leur survie dans la cellule hôte (Vogel et al., 1998 ; Porte et al., 1999). L'action de l'effecteur se produirait par interaction avec le trafic intracellulaire ou avec les cascades des voies de signalisation, et le système de sécrétion de type IV serait nécessaire à la virulence.

De nombreuses questions concernant le système de sécrétion de type IV chez *w*Vul se posent désormais. Quel est l'effecteur et quel est son rôle dans la cellule hôte ? Comme chez *Helicobacter pylori* et *Bordetella pertussis*, l'effecteur est-il situé sur le même locus que les gènes formant le pore ? Dans cette hypothèse, l'étude plus approfondie du gène de la phosphatase situé en amont de l'opéron *virB8-D4* chez *w*Vul serait intéressante. Le gène de la

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

phosphatase est en effet un candidat potentiel pouvant interagir avec le récepteur de l'hormone androgène ou sa voie de signalisation chez *A. vulgare*, d'autant plus que l'expression de ce gène a été démontrée dans les ovocytes. En effet, il existe des récepteurs à l'hormone androgène sur les ovaires. Des expériences de greffe de glande androgène chez des femelles d'*Armadillidium vulgare* provoquent en effet une inhibition de la vitellogenèse.

Quels sont les signaux qui régulent l'expression de ce système ? Nous n'avons en effet pas pu mettre en évidence l'expression de ce système dans les hémocytes de l'hôte. Selon Christie (2001), le système de sécrétion de type IV apparaîtrait nécessaire à la survie et à la multiplication de la bactérie dans la cellule hôte en provoquant l'inhibition de l'acidification du phagosome et la fusion avec les lysosomes; par ce biais, les rôles principaux (phagocytose et destruction) des hémocytes seraient détournés. Comme chez *Brucella* spp, l'acidification du phagosome dans les cellules après phagocytose induit-elle l'expression des gènes *vir* (Boschiroli et al., 2002)? Le système de sécrétion de type IV chez *w*Vul permet-il la sécrétion d'effecteurs encore inconnus qui inhiberaient la voie endosomale de la cellule hôte afin de créer un compartiment intracellulaire dans lequel la bactérie pourrait se répliquer ?

L'identification de l'effecteur nous apporterait en partie des réponses à ces nombreuses questions. Pour cela, des expériences de double-hybride mettant en jeu les interactions des protéines Vir entre elles, et des protéines Vir avec l'effecteur peuvent être réalisées. Une alternative à cette méthode qui peut générer des « faux positifs », est la technique du « GST pull down » permettant de mettre en évidence une interaction physique *in-vitro* entre deux protéines.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

CHAPITRE III
Etude protéomique de tissus infectés par *Wolbachia*

1. INTRODUCTION

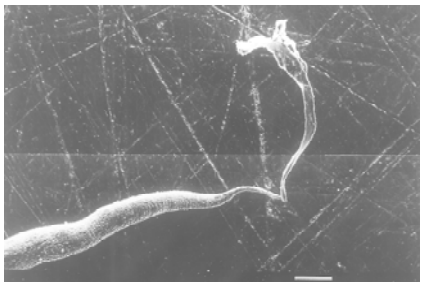
Dans les populations d'*A. vulgare*, présentant un sex-ratio fortement biaisé produisant essentiellement des femelles (descendance thelygène), il faut admettre que la majorité des mâles génétiques est inversée en néofemelles fonctionnelles. Cette inversion sexuelle précoce provoquée par *Wolbachia* peut être rapportée à l'inhibition de la différenciation de la glande androgène (GA). En effet, cette GA doit se différencier pour orienter le développement de la gonade dans le sens mâle (Charniaux-Cotton, 1954) et induire l'acquisition des caractères sexuels secondaires externes. Expérimentalement, la réversion de la gonade indifférenciée peut être obtenue pendant un laps de temps limité aux premières mues. En pratiquant une ablation des GA chez un jeune individu mâle (*A. vulgare*), Suzuki et Yamasaki (1991) ont pu obtenir une femelle fonctionnelle. Ce dernier résultat montre qu'en l'absence d'une GA, la gonade d'un individu génétiquement mâle évolue en ovaire fonctionnel. Parallèlement, l'implantation d'une GA ou des injections répétées d'hormone androgène (HA) chez une jeune femelle (avant la 8^{e} exuviation) va conduire à une masculinisation de la gonade et à une inversion fonctionnelle de la femelle en néomâle. L'HA est donc un inducteur de la différenciation sexuelle mâle. Le sexe femelle s'établit en l'absence d'induction hormonale (HA). L'analyse des résultats précédents conduit à penser que *Wolbachia* dans son action précoce s'oppose à la différenciation de la GA : s'agit-il d'une interférence avec les parties régulatrices du gène codant l'HA ou d'une interaction avec les récepteurs (et/ou leurs voies de signalisation) de l'HA? Les récepteurs à l'HA ne sont pas encore caractérisés, cependant ces récepteurs existent chez les femelles adultes normales (dépourvues de *Wolbachia*). Les femelles saines sont sensibles à l'HA toute leur vie et peuvent être masculinisées au niveau de leurs caractères sexuels secondaires externes (brosses, appendices copulateurs). L'HA est un inhibiteur de la synthèse de la vitellogénine par le tissu adipeux.

Les femelles hébergeant *Wolbachia*, ne présentent plus cette sensibilité à l'HA (Juchault et Legrand, 1985). De cette expérience, nous pouvions déduire qu'une substance (toxine, facteur de virulence) produite par *Wolbachia* :

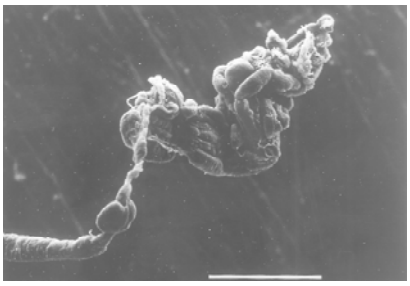
- soit s'oppose à la différenciation des récepteurs à l'HA
- soit entre en compétition avec le ligand naturel de ces récepteurs ou bloque les voies de signalisation du récepteur.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Dans les populations de *A. vulgare* hébergeant *Wolbachia*, il apparaît des animaux (iM) intersexués, stériles, et présentant des GA hypertrophiés (Martin et al 1973) (figure 3.1). Ces individus iM ont été produits en grand nombre au sein du laboratoire par inoculation d'un « extrait bactérien » à des mâles. Après 5 à 6 mois, les GA sont devenues hypertrophiées et accumulent l'HA. Cette dérégulation du contrôle de la croissance de la GA peut être attribuée à *Wolbachia*. Expérimentalement, une hypertrophie similaire de la GA peut être induite par ablation de la région médiane du protocérébron qui contient les cellules neurosécrétrices synthétisant la neurohormone impliquée dans le contrôle de la croissance et du fonctionnement de la GA (Juchault et Legrand 1985). Cette hormone AIH (Androgenic Inhibiting Hormone), a été purifiée chez *A. vulgare* à partir des glandes du sinus et séquencée (Grève et al., 1999). Chez les femelles avec ou sans *Wolbachia*, cette hormone est également présente et est appelée VIH (Vitellogenin Inhibiting Hormone). Chez les femelles saines, la VIH contrôle la synthèse de la vitellogénine par le tissu adipeux (Picaud, 1980) et son up-take par l'ovocyte.



a) glandes androgènes normales



b) glandes androgènes hypertrophiées

<u>Figure 3.1 :</u> Glandes androgènes (a) normales et (b) hypertrophiées chez *Armadillidium vulgare* observées en microscopie électronique à balayage.

En résumé, une action tardive de *Wolbachia* (survenant après la différenciation de la GA et des récepteurs neurohormonaux) va supprimer le rétrocontrôle inhibiteur de la GA (compétition avec le récepteur ou interruption de la voie de signalisation).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Il faut noter que chez une femelle hébergeant naturellement ou expérimentalement *Wolbachia*, ce retrocontrôle inhibiteur ne semble pas perturbé et n'affecte pas la reproduction qui est maintenue saisonnière. Faut-il interpréter cette observation comme un indice qu'il doit exister un signal cellulaire (Mekalanos, 1992), ce signal permettant la synthèse et la libération du facteur bactérien responsable de l'inhibition du retrocontrôle inhibiteur de la GA ? Chez *A. vulgare*, au sein de la lignée thelygène de Niort (avec *Wolbachia*), les femelles intersexuées (type iF) de toute taille et la plupart des néofemelles (taille 5-6 mm de long ; mâles féminisés par *Wolbachia*) sont masculinisées lorsqu'elles sont élevées à 35° pendant 47 jours puis replacées à 20° (Juchault et al. 1980b, Rigaud et al., 1991a). Les animaux les plus masculinisés peuvent acquérir une néoglande androgène sur l'un des utricules testiculaires. Cependant cette physiologie mâle (conforme au sexe génétique) n'est que transitoire et généralement après un retour de 2 à 4 mois à 20°C, la féminisation se réinstalle. Cette étude montre que la température de 35°C ne suffit pas à éradiquer *Wolbachia*, cependant elle permet de penser que, dans ces conditions thermiques, *Wolbachia* survit difficilement et surtout qu'elle ne synthétise plus suffisamment de facteurs de virulence pour maintenir la féminisation des caractères sexuels secondaires et même primaires (gonades masculinisées temporairement). Les études en microscopie électronique attestent que la charge bactérienne est drastiquement diminuée rendant impossible toute observation de la bactérie intracytoplasmique quelque soit le tissu considéré. Les données précédentes suggèrent également qu'il existe chez cette *Wolbachia* une barrière thermique au-delà de laquelle elle ne produit plus de facteurs de virulence. D'autre part il apparaît que cette bactérie peut intégrer des informations provenant de l'environnement.

L'étude protéomique entreprise est basée sur le fait que *Wolbachia* « modifie» les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation du sexe de l'hôte en libérant des facteurs protéiques dans le cytoplasme des cellules cibles. La localisation précise de la cible des facteurs féminisants est encore hypothétique. Elle peut tout aussi bien se situer dans le cytoplasme que sur les membranes cellulaires (récepteurs membranaires) ou bien encore dans le noyau de la cellule hôte. La stratégie employée ici a consisté à extraire la totalité des protéines cytoplasmiques solubles à partir de tissus infectés ou sains et à comparer les deux profils protéiques ainsi obtenus. Nous avons également étudié les protéines circulantes contenues dans l'hémolymphe d'animaux sains ou infectés dans l'hypothèse que le(s) facteur(s) féminisant(s) pourrai(en)t être véhiculé(s) et acheminé(s) vers la cible *via* l'hémolymphe.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

La technique utilisée est l'électrophorèse bidimensionnelle de protéines. Les protéines sont séparées selon deux caractéristiques : une première migration (isofocalisation) sépare les protéines selon leur point isoélectrique, une seconde migration sépare les protéines selon leur masse moléculaire. La comparaison de profils protéiques issus de tissus infectés et non infectés permet de détecter des différences :

- soit d'intensité ce qui signifie que la protéine en question est plus ou moins exprimée selon les conditions testées (présence ou absence de *Wolbachia*),
- soit la présence surnuméraire d'une protéine ce qui signifie que la protéine visualisée peut avoir une origine bactérienne ou que la bactérie induit l'expression d'une protéine qui n'est pas exprimée en condition non infectée,
- soit la disparition d'une protéine ce qui signifie que la bactérie inhibe l'expression d'une protéine de l'hôte.

Notre protocole d'extraction des protéines cytoplasmiques consiste à isoler les protéines solubles des autres organites cellulaires. L'utilisation d'un homogénéiseur de dounce (espace piston-cylindre 89-165µm) permet de casser la membrane plasmique des cellules hôtes, tout en préservant l'intégrité des noyaux et celle des bactéries présentes dans le cytoplasme. Une centrifugation à grande vitesse du broyat cellulaire obtenu permet d'isoler dans le surnageant les protéines cytoplasmiques ainsi libérées, et de concentrer les noyaux, les bactéries et les débris cellulaires dans le culot. Cette méthode permet de réduire considérablement la présence d'acides nucléiques (ADN et ARN) dans les échantillons.

L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines est une méthode de choix pour leur séparation résolutive, c'est une technique sensible, fiable et reproductible. En outre, la sensibilité de la détection, donc l'identification et la caractérisation des protéines peu abondantes peuvent être améliorées par la technique «DIGE : DIfference Gel Electrophoresis». Dans cette méthode, les protéines des deux échantillons à comparer sont chacun colorés par un marqueur fluorescent différent (Cyanine dyes, Cy3 et Cy5), puis sont réunis dans un même tube afin de continuer l'expérimentation avec un seul échantillon. Ceci supprime les variations dues aux différentes étapes de la manipulation (hétérogénéité des gels de polyacrylamide, champs électriques et pH, variations thermiques …). La sensibilité est augmentée par un marquage fluorescent, et la réalisation de carte différentielle (identification de différence d'expression protéique selon les échantillons) en est largement facilitée.

Toutes les expériences de «DIGE» ont été effectuées dans le laboratoire du Dr Henk Braig, School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, Gwynedd, United Kingdom. (deux séjours de 4 semaines).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Animaux

Les animaux utilisés appartiennent à l'espèce *A. vulgare* Latreille (1804), et la souche utilisée a pour origine le site de Celles-sur-Belle (79, France). Les animaux sont maintenus dans une salle à 20°C, en photopériode naturelle avec nourriture *ad libitum*.

2.2 Prélèvement des tissus

L'extraction de protéines a été réalisée à partir d'ovaires et de glandes androgènes disséquées, et d'hémolymphe ponctionnés d'animaux sains ou infectés par *Wolbachia* (voir Annexe 1, § 8 Dissection des animaux).

2.2.1 Isolement des hémocytes à partir de l'hémolymphe

Le volume d'hémolymphe prélevé (environ 15 µl par animal) est dilué de moitié dans une solution anticoagulante (citrate de sodium 27 mM, glucose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7.0) contenant un inhibiteur de protéase (aprotinine 40 µM) et un inhibiteur de mélanisation (phénylthiocarbamate 200 µM). Le plasma est séparé des hémocytes par centrifugation à 800 X *g*, pendant 15 min à 4°C. Le culot d'hémocytes est dilué dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline : NaCl 0.137 M, $Na_2HPO_{4,12H2O}$ 7.8 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, pH 7.4) contenant un inhibiteur de protéase (AEBSF 1X [4-(2-AminoEthyl)-Benzene-Sulfonyl Fluoride]), et maintenu sur de la glace jusqu'à l'extraction protéique.

2.2.2 Prélèvement des glandes androgènes

Les glandes androgènes normales (n=600) ou hypertrophiées (n=120) prélevées par dissection sont immédiatement congelées et stockées dans l'azote liquide. Le jour de l'extraction, les glandes androgènes sont décongelées dans une solution de PBS contenant un inhibiteur de protéase (1 mM AEBSF), et maintenues sur de la glace jusqu'à l'extraction protéique.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.2.3 Prélèvement des ovaires

Des femelles infectées ou non par *Wolbachia* sont sélectionnées selon leur âge, leur taille et le stade de développement de leurs ovocytes de façon à obtenir des échantillons les plus homogènes et reproductibles possibles. Les ovaires prélevés (n=30) sont immédiatement déposés dans une solution de PBS contenant un inhibiteur de protéase (1 mM AEBSF), et maintenus sur de la glace jusqu'à l'extraction protéique.

2.3 Extraction protéique

Les tissus (hémocytes, ovaires ou glandes androgènes) sont broyés dans un volume de PBS d'environ 150 µl à l'aide d'un homogénéiseur de dounce (espace piston-cylindre 89-165 µm, permettant la réduction des agrégats sans dommage pour les noyaux des cellules). L'homogénat est centrifugé deux fois successivement à 12 000 X *g*, pendant 10 min à 4°C. Le culot de débris cellulaires est éliminé et les protéines du surnageant sont précipitées par 6 volumes d'acétone froid, pendant au minimum 2 heures à -20°C. Une centrifugation à 15 000 X *g* pendant 10 min à 4°C permet de concentrer les protéines précipitées. Ce culot est rincé avec 900 µl d'acétone, puis une nouvelle centrifugation à 15 000 X *g* pendant 10 min à 4°C est réalisée. Après avoir délicatement éliminé le surnageant, le culot protéique est séché soit à l'air libre quelques minutes pour une utilisation rapide, soit au concentrateur sous vide réfrigéré (Speed Vac, Savant®) pendant quelques minutes pour un stockage à température ambiante.

2.4 Electrophorèse unidimensionnelle

Les protéines ont été analysées par SDS-PAGE selon la technique donnée par Laemmli (1970); nous avons réalisé des gels dont la concentration en acrylamide est comprise entre 7.5% et 15% à pH 8.8. La migration électrophorètique est conduite à 100 V pendant 2h30 (sortie du front) à température ambiante. Des marqueurs de masse moléculaire (Biorad®) colorés au bleu de Coomassie sont utilisés. La coloration des gels 1-D est identique à celle des gels 2-D, elle est fonction des étapes suivantes de l'étude.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.5 Electrophorèse bidimensionnelle

2.5.1 Solubilisation des protéines

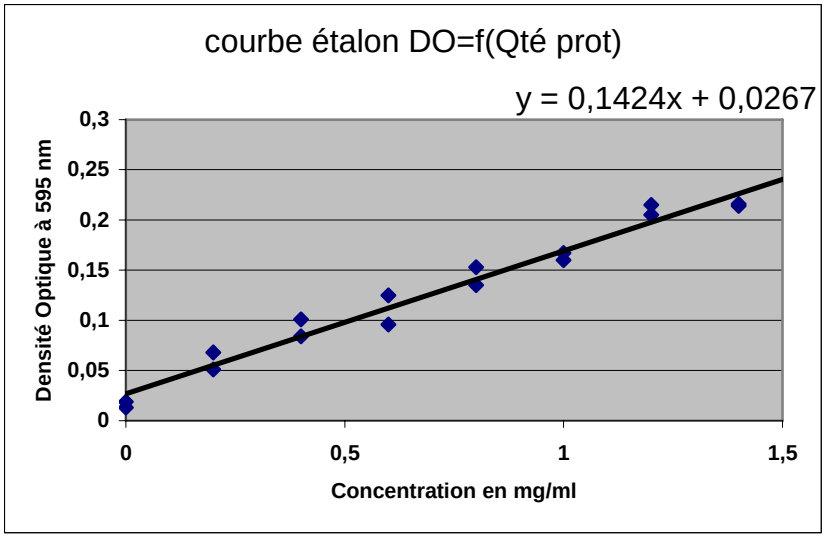
Les culots issus de l'extraction protéique (voir chapitre III, 2.3 Extraction protéique) sont dissous dans du tampon de lyse (urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 4%, IGEPAL CA-630 0.75%, DTT 10 mM). Le volume de tampon de lyse utilisé dépend de la taille du culot, et peut varier entre 20 et 300 µl. L'échantillon est placé sur de la glace et homogénéisé régulièrement à l'aide d'une pipette jusqu'à solubilisation complète du culot (de quelques minutes à 1 heure).

2.5.2 Dosage des protéines

La méthode utilisée est celle de Bradford. C'est une méthode de détermination de la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible. La densité optique (DO) de chaque échantillon est donc mesurée par l'absorbance à 595 nm.

2.5.2.1 Préparation de la gamme étalon

Une gamme étalon de protéine standard (BSA) est préparée pour des concentrations allant de 0 mg/ml à 1.6 mg/ml (incrément de 0.2 mg/ml). Les protéines sont diluées avec 800 µl d'eau distillée stérile. La réaction s'effectue avec 200 µl de réactif de Bradford (Sigma®, Bradford reagent, protein dye reagent). Après 5 minutes d'incubation, la DO à 595 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.



$$[C] = \frac{DO_{595} - 0.0267}{0.1424}$$

La courbe étalon correspond à la régression linéaire de la DO en fonction de la quantité de protéine de la gamme (DO_{595nm}=f(quantités de protéines)). L'équation de la droite de régression est obtenue par le logiciel Excel. La quantité de protéines de chaque échantillon peut alors être estimée à partir de cette équation.

2.5.2.2 Dosage des échantillons protéiques

Afin d'estimer la concentration protéique, 1 µl de l'échantillon est dilué à 800 µl d'eau distillée stérile, puis 200 µl de réactif de Bradford sont ajoutés. Un µl de tampon de lyse est utilisé pour le « blanc ». Après 5 minutes d'incubation, la DO à 595 nm est mesurée. La quantité de protéines de chaque échantillon peut alors être estimée à partir de l'équation issue de la courbe de régression : $[C]=(DO_{595} - 0.0267)/0.1424$

2.5.3 Réhydratation

La réhydratation consiste à faire pénétrer les protéines de l'échantillon dans un gel d'acrylamide accolé à une fine languette de plastique : une strip (Readystrip IPG Strip, Bio-

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Rad®), cette étape est appelée la réhydratation. La strip utilisée couvre la gamme de pH la plus grande, de 3 à 10.

L'échantillon est centrifugé à 13 000 rpm, pendant 2 min et seul le surnageant est déposé sur la strip. Cette étape permet d'éliminer les protéines précipitées ou le matériel insoluble resté présent dans l'échantillon. Un volume d'échantillon correspondant à une quantité de 100 à 200 µg de protéines est prélevé et le volume est ajusté avec du tampon de lyse additionné de 1% de Bio-Lytes couvrant la gamme de pH 3-10 (Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, Bio-Rad®). Le volume final dépend de la taille de la strip utilisée (tableau 3.1).

	Strip 7 cm	Strip 11 cm	Strip 17 cm
Volume minimum (permet d'obtenir un gel de 0.5 mm d'épaisseur)	125 µl	185 µl	300 µl
Volume maximum (permet de déposer une quantité plus importante de protéines)	250 µl	370 µl	600 µl

Tableau 3.1 : Volume d'échantillon à déposer pour la focalisation en fonction de la strip utilisée.

Le volume d'échantillon approprié est placé dans une rigole du plateau à focalisation, et la strip est délicatement posée dans le réceptacle, le gel en contact avec la solution protéique, coté + à l'anode. L'ensemble est recouvert d'huile minérale afin d'éviter tout phénomène d'évaporation. La réhydratation est « active », c'est-à-dire qu'elle s'effectue à 50 Volts, pendant 12 heures.

Des papiers wicks (Bio-Rad®) préalablement humidifiés avec de l'eau distillée stérile sont placés sur chacune des électrodes. Ces papiers jouent le rôle de pièges à sels et autres composés non amphotériques présents dans l'échantillon.

Ce mode de réhydratation améliore l'entrée des protéines de hauts poids moléculaires dans le gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.5.4 Focalisation isoélectrique (IEF)

Le plateau à focalisation est placé dans un appareil PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad®) optimisé pour réaliser la focalisation isoélectrique.

Le programme doit être adapté en fonction de la longueur de la strip utilisée. Seul le programme relatif aux strips de 17 cm sera détaillé ici ; en effet, ce sont celles qui ont été le plus couramment utilisées.

Première étape : Conditionnement (faible voltage pour éliminer les excès de sel)

IPG Strip		Voltage	Temps	Température
17 cm	↱ R	250 V	15 min	20°C

Deuxième étape : Montée en voltage (montée du voltage en gradient)

IPG Strip		Voltage de départ	Voltage de fin	Temps	Température
17 cm	↗ G	250 V	8000 V	2 h	20°C

Troisième étape : Focalisation finale (définir un voltage constant et une quantité de Volts x heures)

IPG Strip		Voltage	Volts x Heures	Temps	Température
17 cm	↱ R	8000 V	60 000 Vhs	~6 h	20°C

Avec ↱ R : montée rapide du voltage

↗ G : montée du voltage en gradient

Tableau 3.2 : Conditions de focalisation pour une strip de 17 cm.

2.5.5 Equilibration

Avant de déposer la strip sur le gel de deuxième dimension, il est nécessaire de l'équilibrer avec du tampon contenant du SDS. Une première incubation de 20 min dans la solution I d'équilibration (Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, urée 6 M, glycérol 20%, SDS 2%, DTT

130 mM) permet de saturer le gel en SDS et en agent réducteur (DTT). L'agent réducteur utilisé étant le DTT, il est nécessaire de procéder à une seconde incubation avec de l'iodoacétamide dans la solution II d'équilibration (Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, urée 6 M, glycérol 20%, SDS 2%, iodoacétamide 135 mM) pendant 20 min, afin de prévenir la ré-oxydation des résidus cystéine des protéines au cours de l'électrophorèse et d'alkyler le DTT résiduel, minimisant ainsi les traînées verticales sur le gel. Cette solution d'équilibration II contient également quelques gouttes de bleu de bromophénol qui permet lors de la deuxième dimension de suivre le front de migration. Après cette étape, les strips peuvent être conservées à -80°C dans des portoirs prévus à cet effet pendant plusieurs semaines.

2.5.6 Deuxième dimension : électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

2.5.6.1 Généralités

Après avoir séparé sur une strip les protéines selon leur pI, la séparation selon leur masse moléculaire s'effectue sur gel de polyacrylamide 12% (gel de séparation). Les protéines sont tout d'abord concentrées sur le gel de concentration, puis la migration selon la masse moléculaire s'effectue sur le gel de séparation.

Les gels de séparation (acrylamide/PDA 12%, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1%, TEMED 0.05%, ammonium persulfate 0.05%) et de concentration (acrylamide/PDA 3.7%, Tris-HCl 128 mM, pH 6.8, SDS 0.1%, TEMED 0.05%, ammonium persulfate 0.025%) sont réalisés à partir d'acrylamide/PDA (acrylamide 30% / PDA 8.23 mM [Piperazine Di-Acrylamide]).

La solution constituant le gel de séparation est tout d'abord coulée entre deux plaques de verre, une couche de butanol saturé en eau est ensuite déposée au dessus de la solution d'acrylamide afin d'éviter les irrégularités dans le haut du gel et d'obtenir un front de migration droit. Après polymérisation, le butanol est éliminé et l'espace entre les plaques de verre est rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Le gel de concentration peut être coulé et, comme précédemment, du butanol est ajouté en surface. L'étape suivante, après élimination du butanol, consiste à placer la strip en contact étroit avec la surface du gel de concentration. Pour ce faire, de l'agarose LMP 1% (Low Melting Point) est coulé entre les deux plaques, au dessus du gel de concentration, puis très rapidement, la strip est glissée à travers l'agarose de façon à être en parfait contact sur toute l'épaisseur du gel de

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

concentration. Il faut veiller à chaque étape à enlever toutes les bulles qui peuvent se former, et l'agarose LMP est utile car il empêche la présence d'air entre la strip et le gel de concentration.

2.5.6.2 Migration

La migration s'effectue dans du tampon Laemmli (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3).

Au début de l'électrophorèse de seconde dimension en SDS, l'application d'un faible voltage, 25 Volts pendant une heure, permet l'élution par le SDS et l'urée des protéines contenues dans la strip. La migration s'effectue ensuite à 100 Volts, pendant 18h environ, à une température optimale de 20°C. L'arrêt de la migration s'effectue lorsque le front de migration sort du gel.

2.5.7 Coloration des gels

Deux types de colorations peuvent être réalisées : la coloration au nitrate d'argent et la coloration au bleu de Coomassie. D'une manière générale, la coloration au nitrate d'argent est plus sensible et plus résolutive, mais ne permet pas une analyse directe en spectrométrie de masse. Lors de la coloration au nitrate d'argent, du fait de la plus faible quantité de protéines déposée, plusieurs spots doivent être prélevés pour une analyse en spectrométrie de masse. La coloration au bleu de Coomassie, légèrement moins sensible, est la méthode utilisée lorsqu'une analyse de spots en spectrométrie de masse ou microséquençage est prévue. En effet, la quantité de protéines contenue dans un spot est suffisante pour une analyse.

2.5.7.1 Coloration au nitrate d'argent

Le protocole décrit ci-dessous correspond au « Protocole Bobigny », et a été adapté par T. Rabilloud.

Dès la fin de la migration, les deux plaques de verre sont décollées libérant ainsi le gel d'acrylamide. Le gel est lavé 5 min dans de l'eau ultrapure déionisée (MilliQ), puis incubé sous agitation 2 fois 30 min dans la solution de fixation (éthanol 30%, acide acétique 5%, eau MilliQ q.s.p) à température ambiante. Quatre lavages de 10 min en eau MilliQ sont ensuite

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

réalisés puis le gel est incubé pendant 1 min dans une solution de thiosulfate de sodium à 0.02%. Deux nouveaux lavages en eau MilliQ pendant 1 min ont lieu, puis le gel est placé dans la solution de coloration (nitrate d'argent 11.8 mM, formaldéhyde 0.01%) pendant 30 à 45 min. L'étape de révélation débute par le lavage du gel en eau MilliQ 2 fois 30 sec, puis le gel est incubé dans la solution de révélation (carbonate de sodium 226.4 mM, thiosulfate de sodium 0.125 ‰, formaldéhyde 0.01%) jusqu'à obtention de l'intensité désirée. La réaction est stoppée par incubation dans une solution d'arrêt (Tris 0.33 M, acide acétique 1%, glycine 66.6 mM) pendant 30 min à 1 heure.

Toutes ces solutions doivent être préparées le jour même et l'ajout de formaldéhyde doit se faire extemporanément.

Le gel peut ensuite être conservé quelques semaines dans une solution de préservation (10% Glycérol, 2% PEG (PolyEthylenGlycol 20 000)).

2.5.7.2 Coloration au bleu de Coomassie

Les solutions de coloration doivent être préparées la veille.

La solution A ($(NH_4)2SO4$ 772.2 mM, acide orthophosphorique 1%) est mélangée à la solution B (bleu de Coomassie G250 5% w/v) dans un rapport de 98% de solution A et 2% de solution B. La solution résultante appelée solution C est agitée de façon soutenue toute une nuit. Un volume de méthanol et 4 volumes de solution C sont ensuite mélangés. La solution ainsi obtenue correspond à la solution de coloration et est prête à l'emploi.

Le gel est placé dans une solution de fixation (méthanol 40%, acide acétique 10%) pendant une heure, puis dans la solution de coloration au minimum 3 heures, et au maximum une nuit. La décoloration du fond s'effectue ensuite dans l'eau jusqu'à obtention de l'intensité désirée.

2.6 Differential Gel Electrophoresis: DIGE (Unlu, 1999)

Seules les étapes spécifiques à ce protocole sont détaillées ci-dessous.

2.6.1 Préparation des échantillons

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les protéines concentrées après précipitation à l'acétone sont tout d'abord diluées dans du tampon ASB14 (Tris 10 mM, pH 8, acétate de magnésium 0, 5 mM, urée 8 M, ASB-14 2%). L'ASB-14 est un détergent zwitterionique (amidosulfobétaine) et donne son nom au tampon ASB14. Ce tampon ne contient pas de DTT ni de Bio-Lytes car ces composés interfèrent avec la réaction de marquage. En général, un volume de tampon équivalent au volume du culot est utilisé, ce qui permet de maintenir une concentration protéique finale élevée. L'échantillon est ensuite incubé 1 heure à température ambiante. Après une centrifugation à 13 000 rpm, pendant 5 min à 4°C, le surnageant est collecté. Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Bradford décrite antérieurement et le volume est ajusté de façon à obtenir une concentration finale de 5 µg/µl.

2.6.2 Marquage des échantillons

Afin de comparer deux échantillons, l'un d'entre eux est marqué avec la cyanine 3 (Cy3) tandis que le second est marqué avec la cyanine 5 (Cy5). Les cyanines 3 et 5 sont des marqueurs fluorescents ou « CyDyes » qui se fixent sur les résidus lysine des protéines, et induisent des adduits de 500 Da modifiant la masse de la protéine. Un marquage réciproque est également réalisé afin d'éliminer tout artefact dû au marquage.

Le marquage s'effectue à partir de 50 µg de protéines totales avec 200 pmoles de marqueur fluorescent préalablement vortexé dans un volume de 10 µl (tableau 3.3). La réaction est incubée pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Afin de bloquer les molécules en excès, 1 µl de lysine (1 mM) est ajouté (1 nmole correspondant à un excès de 5 fois). Le mélange est vortexé puis centrifugé rapidement, et incubé pendant 10 min, à température ambiante à l'abri de la lumière. Si la concentration de départ n'a pas pu être ajustée à 5 µg/µl, cette dernière peut être complétée avec des « protéines invisibles », c'est-à-dire non marquées. Les deux échantillons peuvent alors être regroupés en un seul et l'échantillon résultant peut être stocké à -20°C pendant plusieurs jours.

	Echantillon A	Echantillon B
Volume nécessaire pour 50 µg de protéine (en µl)	X	Y
Volume de tampon ajouté pour normaliser les volumes (en µl)	Z	Z
Volume de marqueur fluorescent	1 µl	1 µl
Volume de lysine	1 µl	1 µl
Volume total (en µl)	X+Z+2	X+Z+2
Volume de protéines invisibles	X	Y
Volume total après pool des deux échantillons	2(Z+X+Y)+4	
Volume de tampon d'échantillon 2X[1] à ajouter	2(Z+X+Y)+4	
Tampon de réhydratation q.s.p. 300 µl[2,3]	300-(2Z+X+Y)	

[1] : Composition du tampon d'échantillon 2X: ASB-14 2%, urée 7M, thiourée 2 M, DTT 130 mM, Bio-Lytes 2% avec le DTT et les Bio-Lytes ajoutés extemporanément.

[2] : Le volume de réhydratation dépend de la taille de la strip utilisée (voir tableau 3.1), ici 300 µl correspond à une strip de 17 cm.

[3] : Composition du tampon de réhydratation : ASB-14 2%, Urée 7M, ThioUrée 2 M, DTT 13 mM, Bio-Lytes 1% avec le DTT et les Bio-Lytes à ajouter extemporanément.

<u>Tableau 3.3 :</u> Etapes du marquage fluorescent des échantillons protéiques utilisés pour la technique DIGE.

2.6.3 Première dimension, préparation des strips

L'échantillon marqué est centrifugé à 13 000 rpm, pendant 2 min à température ambiante et seul le surnageant sera chargé sur la strip, cela permet d'éliminer des protéines précipitées. La méthode utilisée est ensuite la même que pour une électrophorèse bidimensionnelle classique.

2.6.4 Deuxième dimension

(voir chapitre III, § 2.5.6 Deuxième dimension : électrophorèse en gel de polyacrylamide 12% (SDS-PAGE)).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

2.6.5 Détection des protéines fluorescentes

La migration de deuxième dimension terminée, les plaques de verre « low fluoresence » de 3 mm d'épaisseur contenant les gels sont rincées à l'eau distillée puis à l'alcool, et sont ensuite déposées dans le détecteur de fluorescence afin de réaliser le scan des gels. Après acquisition des images à deux longueurs d'onde différentes, les profils protéiques sont superposés et analysés à l'aide du logiciel Phoretix®.

2.7 Analyse des gels

La coloration au bleu de Coomassie utilisée après électrophorèse bidimensionnelle classique ou DIGE est compatible avec l'analyse des protéines en spectrométrie de masse. Après comparaison des profils protéiques de tissus infectés ou non par *Wolbachia*, les spots d'intérêt sont délicatement prélevés à l'aide d'un scalpel stérile, puis déposés à sec dans un tube Eppendorf®.

Suite à la mise en œuvre de la méthode DIGE, les spots d'intérêt ont été prélevés à l'aide d'un automate (Investigator ™ ProPic Robotic Workstation, Genomic Solutions™), après enregistrement de différents paramètres du gel avec le logiciel Investigator HT Analyser version 2.2, et l'utilisation de la fonction « triangulation ».

2.8 Analyse des spots d'intérêt

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (UMR CNRS-ULP Strasbourg, dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer), par le Dr Jean-Marc Strub.

Les spots sont digérés à la trypsine puis les analyses MS et MS/MS sont effectuées sur un Q/TOF 2 (Micromass Ltd., Manchester, UK). Le spectromètre de masse est utilisé pour l'acquisition des données MS et MS/MS. La sélection de l'énergie de collision pour la fragmentation d'un ion isolé par le quadrupôle est basée sur la charge et la masse de cet ion.

2.8.1 Traitement et analyses des données

Les données MS/MS sont traitées par le logiciel ProteinLynx de Micromass. L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel Mascot (Matrix Science Ltd., London UK) dans la

banque NCBI nr (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz) et la banque TIGR (http://www.tigr.org/). L'analyse de l'ensemble des microséquences issues d'un spot est réalisée avec le site hhttp://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html.

3. RESULTATS

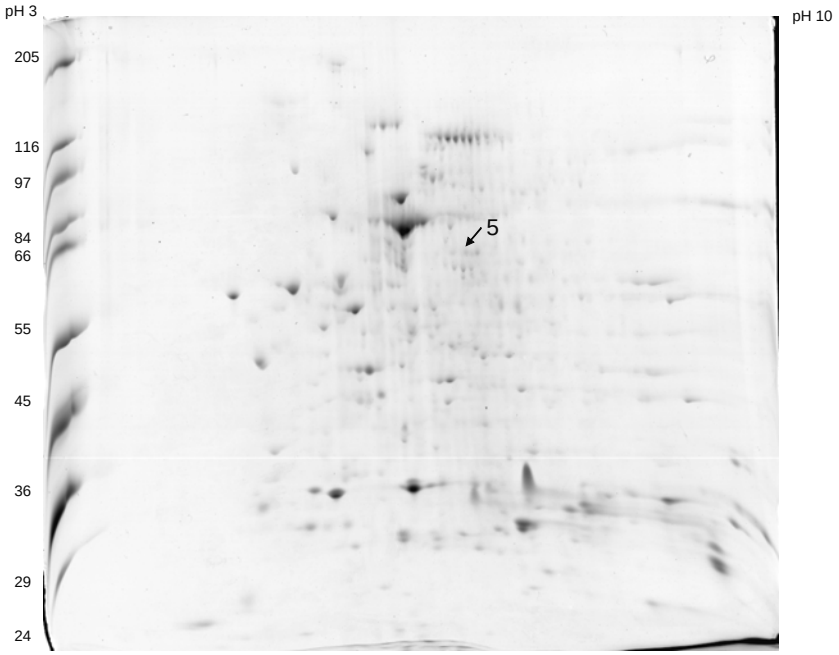
3.1 Gel d'électrophorèse 1 Dimension

Cette méthode constitue une étape préliminaire à notre étude en 2-D et son but est de déterminer si une comparaison de deux échantillons (sains/infestés) montre des différences perceptibles avec cette méthode d'analyse.

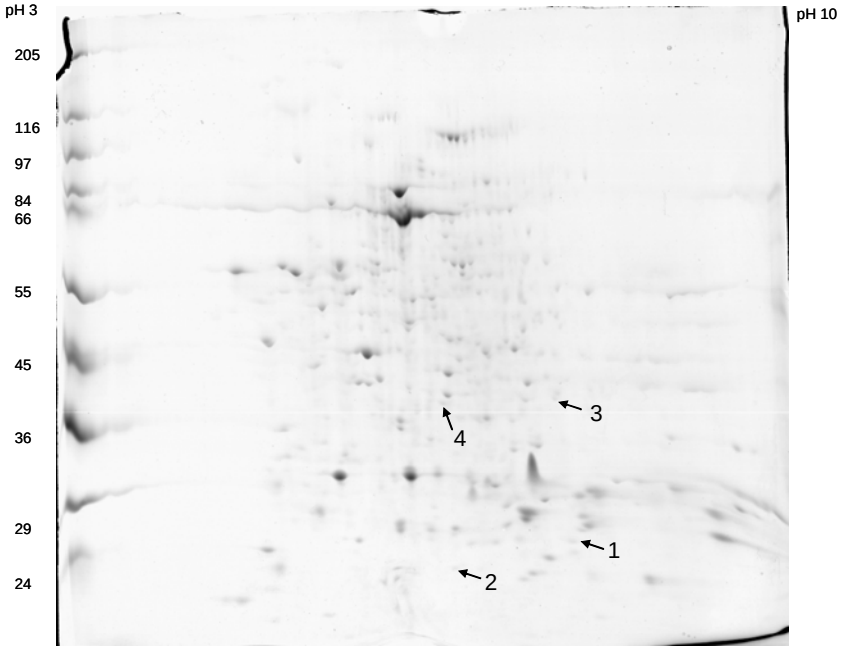
Notre étude a porté sur les protéines de l'ovaire, de la glande androgène et du plasma (hémolymphe). Des différences notables ont pu être observées sur les protéines solubles des échantillons et ceci quelque soit la concentration en acrylamide du gel (7.5% à 15%). Ce travail préliminaire laisse entrevoir que la technique différentielle en 2-D peut affiner la séparation de protéines en particulier celles déjà repérées en 1-D.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



a) Protéines cytoplasmiques d'ovaires sains



b) Protéines cytoplasmiques d'ovaires infestés par *Wolbachia*

<u>Figure 3.2 :</u> Analyse par électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques d'ovaires sains (a) ou infestés par *Wolbachia* (b). Chaque gel est chargé avec 200 µg de protéines et coloré au nitrate d'argent. L'apparition ou la disparition de protéines est indiquée par une flèche. Les protéines analysées sont numérotées de 1 à 5. Les masses moléculaires sont indiquées sur la gauche et les points isoélectriques sont notés en haut du gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.2 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle

3.2.1 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques d'ovaires

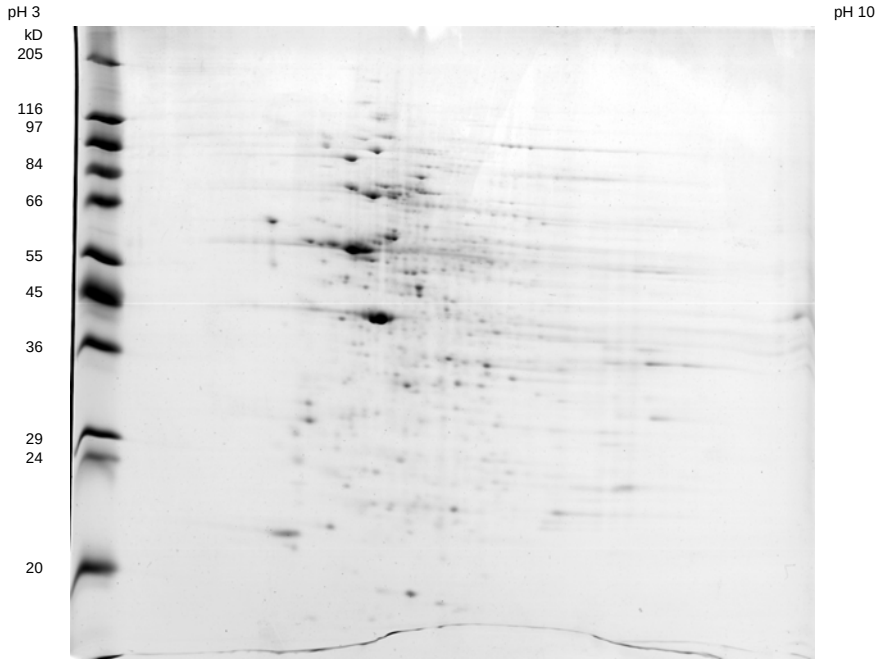
Des gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques extraites à partir d'ovaires sains ou à partir d'ovaires infestés ont été réalisés (figure 3.2). Après comparaison des deux profils, 5 protéines supplémentaires, numérotées de 1 à 5, ont été détectées comme présentes sur l'un des gels, mais absentes sur l'autre (tableau 3.4).

Spot	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Gel	Analyse en spectrométrie de masse	Information de micro-séquences	Identification
1	**20**	**7.9**	**♀F**	**oui**	**non**	**non**
2	**20**	**6.7**	**♀F**	**oui**	**oui**	**non**
3	**40**	**7.8**	**♀F**	**non**	**non**	**non**
4	**42**	**6.3**	**♀F**	**oui**	**oui**	**vitellogénine**
5	**62**	**7.0**	**♀A**	**non**	**oui**	**non**

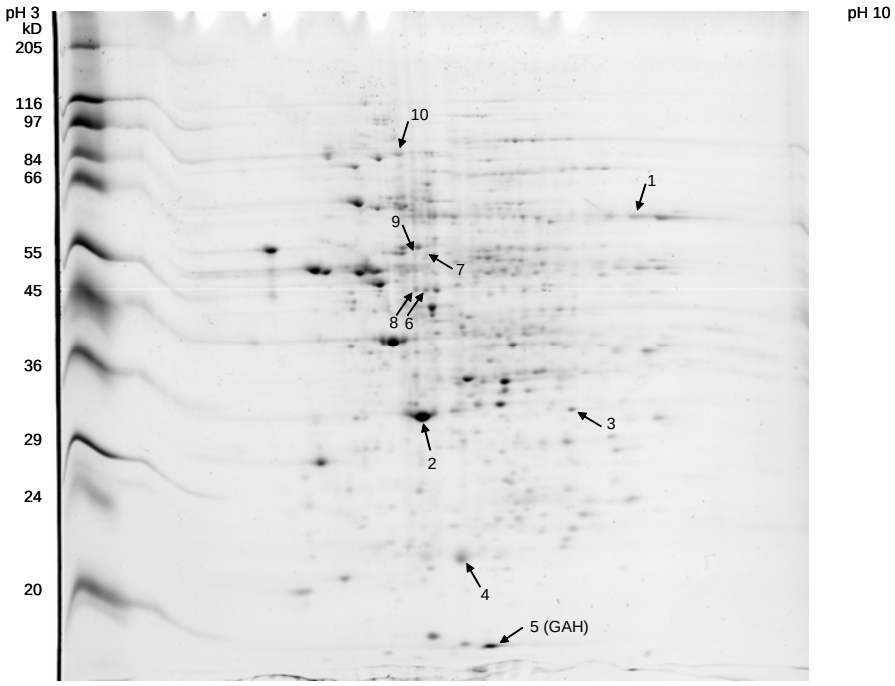
Tableau 3.4 : Caractéristiques des protéines supplémentaires présentes sur l'un des deux gels de protéines d'ovaires mais absentes sur l'autre, et analyses de ces protéines réalisées.

Les protéines 1, 2 et 4 ont été analysées en spectrométrie de masse. La protéine 4 a été identifiée comme étant de la vitellogénine (Okuno et al., 2000) (numéro d'accession Genbank : AB037247) avec 53% de recouvrement chez *A. vulgare*. Il s'agit donc ici d'une protéine de l'hôte surexprimée en condition d'infestation par *Wolbachia*. L'analyse des microséquences issues des spots 1, 2, 3 et 5 n'a pas abouti à un résultat probant.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



a) Protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales



a) Protéines cytoplasmiques de glandes androgènes hypertrophiées

<u>Figure 3.3:</u> Analyse par électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales (a) ou hypertrophiées infestées par *Wolbachia* (b). Chaque gel est chargé avec 200 µg de protéines et coloré au nitrate d'argent. L'apparition de la protéine supplémentaire nommée GAH est indiquée par une flèche. Les masses moléculaires sont indiquées sur la gauche et les points isoélectriques sont notés en haut du gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.2.2 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes

Des gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques extraites à partir de glandes androgènes normales ou à partir de glandes androgènes hypertrophiées ont été réalisés (figure 3.3).

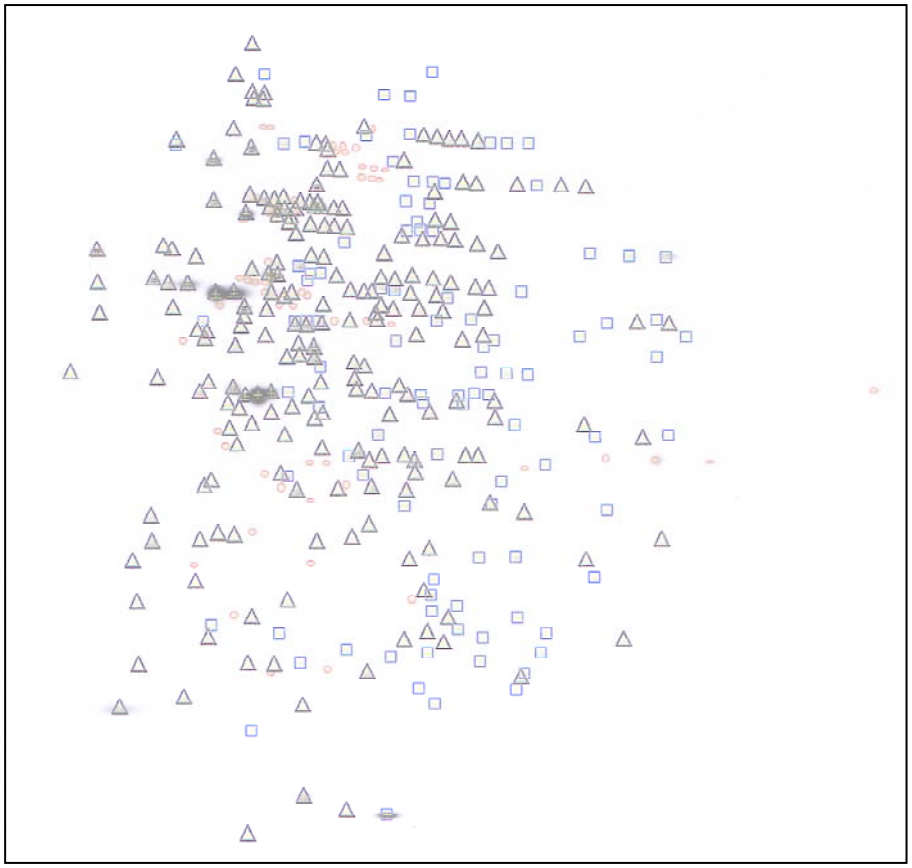
Après comparaison des deux profils, plusieurs protéines supplémentaires ont été détectées sur les gels de glandes androgènes hypertrophiées. Le spot supplémentaire 5 indiqué dans le tableau suivant, de 18 kDa (pI de 6.2) de forte intensité, indiquée « GAH » sur la figure 3.3, a été systématiquement détectée sur tous les gels de protéines de glandes androgènes hypertrophiées réalisés ; cette protéine étant toujours absente sur les gels de protéines de glandes androgènes normales.

Spot	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Gel	Analyse en spectrométrie de masse	Information de micro-séquences	Identification
1	**60**	**8.7**	**GAH**	**oui**	**oui**	**non**
2	**32**	**6.1**	**GAH**	**oui**	**oui**	**non**
3	**33**	**8.0**	**GAH**	**oui**	**oui**	**Lactate-deshydrogénase**
4	**22**	**6.5**	**GAH**	**oui**	**oui**	**Glutathione S transferase**
5	**18**	**6.9**	**GAH**	**oui**	**oui**	**ABC transporteur**
6	**45**	**6.2**	**GAH**	**oui**	**oui**	**Aldéhyde deshydrogénase**
7	**54**	**6.3**	**GAH**	**oui**	**oui**	**Cystathionine β synthase**
8	**45**	**6.1**	**GAH**	**oui**	**oui**	**RNA helicase**
9	**55**	**6.2**	**GAH**	**oui**	**oui**	**phosphoglutamase**
10	**84**	**6.0**	**GAH**	**oui**	**oui**	**α actinine**

Tableau 3.5 : Caractéristiques des protéines supplémentaires présentes sur l'un des deux gels de protéines d'ovaires mais absentes sur l'autre, et analyses de ces protéines réalisées. L'identification des spots correspondant sera détaillée plus loin.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Des analyses par informatique permettant des détections de protéines de très faible intensité ont été réalisées sur des gels colorés au nitrate d'argent. Ces analyses révèlent que 213 protéines sont communes sur les gels de glandes androgènes normales et hypertrophiées, 98 protéines ne se retrouvent que sur les gels de glandes androgènes hypertrophiées et 50 protéines ne se détectent que sur les gels de glandes androgènes normales (figure 3.4). Parmi ces protéines, certaines sont sans doute communes aux deux échantillons mais peuvent avoir migré de façon différente (lors des séparations selon les deux dimensions) du fait d'une solubilisation incomplète ou d'une dégradation lors de la préparation de l'échantillon. Une autre hypothèse serait qu'elles ont subit des modifications post-traductionnelles dans la cellule hôte dues à l'hypertrophie de la glande androgène engendrée par la présence de la bactérie.

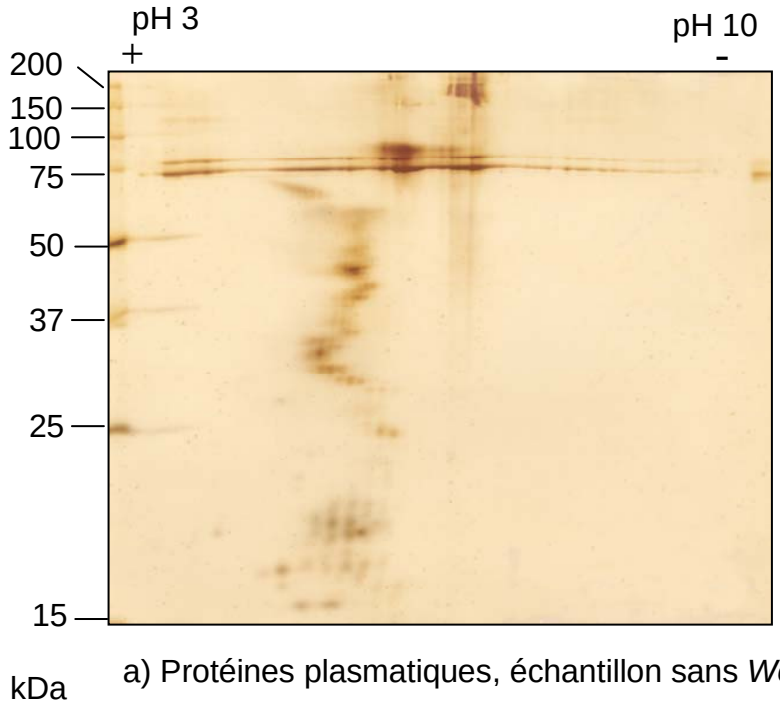


△ : GAN et GAH (213 spots)

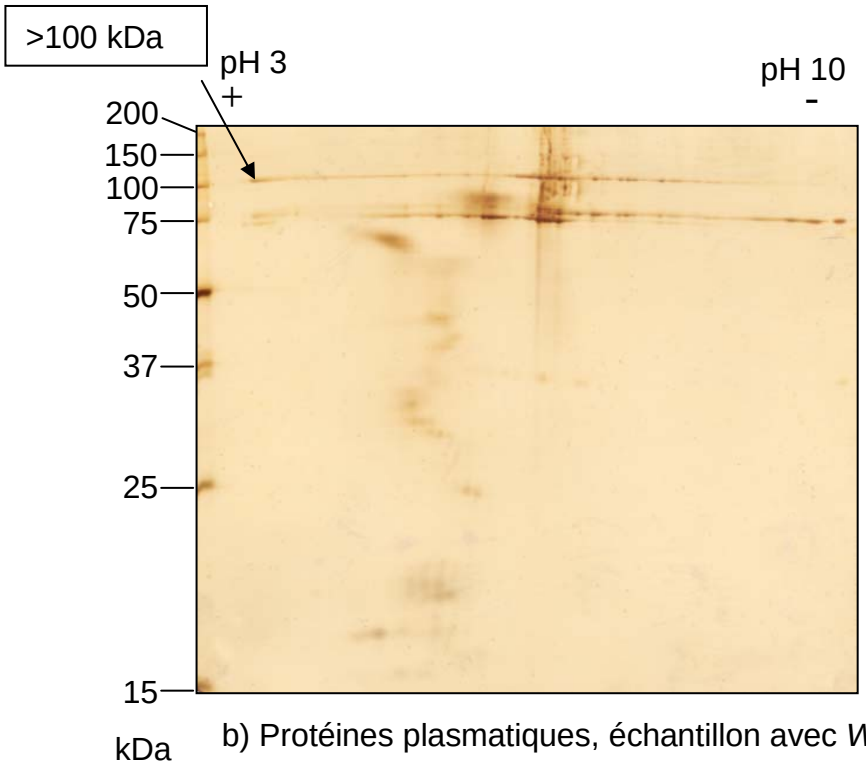
□ : GAH (98 spots)

○ : GAN (50 spots)

<u>Figure 3.4 :</u> Analyse informatique (programme PDQuest et Quantity one analysis, Biorad®) de détection de protéines sur gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales et hypertrophiées.



a) Protéines plasmatiques, échantillon sans *Wolbachia*



b) Protéines plasmatiques, échantillon avec *Wolbachia*

<u>Figure 3.5:</u> Analyse par électrophorèse bidimensionnelle de protéines d'hémolymphe d'animaux sains (a) ou d'animaux infestées par *Wolbachia* (b). Chaque gel est chargé avec 200 µg de protéines et coloré au nitrate d'argent. L'apparition de la ligne de protéines supplémentaires est indiquée par une flèche. Les masses moléculaires sont indiquées sur la gauche et les points isoélectriques sont notés en haut du gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.2.3 Gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines d'hémolymphe

Des gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines extraites à partir d'hémolymphe d'animaux sains ou à partir d'hémolymphe d'animaux infestés par *Wolbachia* ont été réalisés (figure 3.5).

Après comparaison des deux profils, aucune protéine résolue n'a pu être détectée, mais en revanche, une ligne de protéines supplémentaires apparaît sur le gel d'hémolymphe d'animaux infestés à environ 100 KDa. Cette bande supplémentaire a également été observée de façon récurrente en électrophorèse unidimensionnelle. Cette ligne de protéines apparaît à 200 KDa en conditions non réductives. Des analyses de microséquençage ont été réalisées sur ce groupe de protéines, et révèlent qu'il s'agit de vitellogénine (de 24 à 28% de recouvrement avec la vitellogénine d'*A. vulgare*, numéro d'accession Genbank : AB037247).

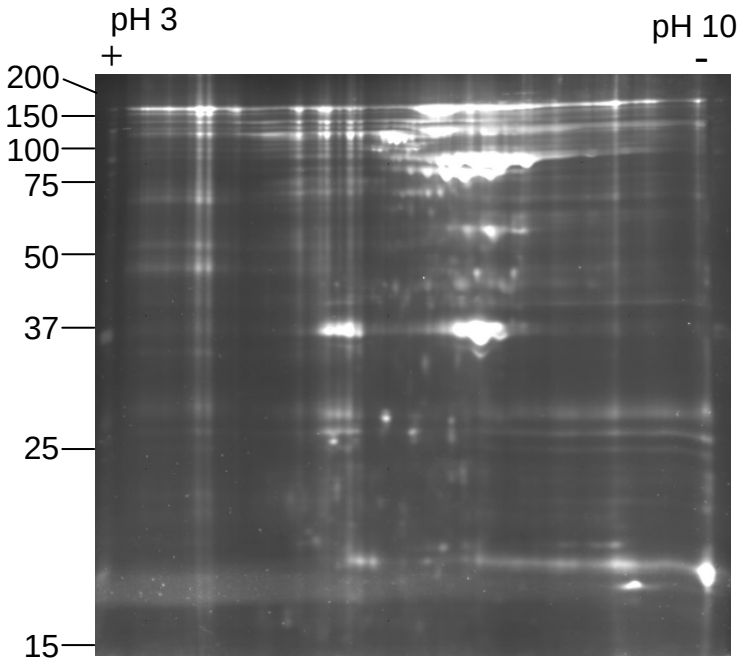
3.3 « Difference gel electrophoresis » ou DIGE

La sensibilité du système d'imagerie est apparue environ trois fois plus sensible qu'une coloration au bleu de Coomassie ou au Nitrate d'argent. Le temps d'exposition nécessaire pour l'acquisition de l'image peut être augmenté de façon à obtenir une meilleure détection des spots, mais ceci augmente également le bruit de fond de l'image. La fluorescence des protéines des gels peut être détectée par imagerie et le gel peut ensuite être coloré au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie. Nous avons réalisé des DIGE pour les trois extraits protéiques (ovaires, glandes androgènes et hémolymphe).

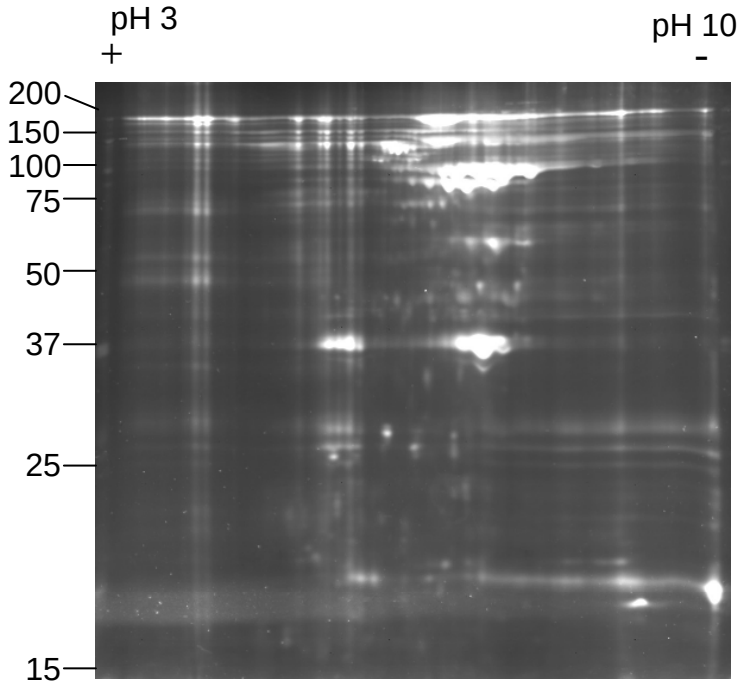
3.3.1 DIGE de protéines cytoplasmiques d'ovaires

Le gel est chargé avec 50 µg de protéines de chacun des deux échantillons (protéines cytoplasmiques d'ovaires sains et protéines cytoplasmiques d'ovaires infectés par *Wolbachia*). La focalisation et la migration en deuxième dimension réalisées, la fluorescence des gels est directement analysée par imagerie (figure 3.6). Le temps d'exposition est de 3 min.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



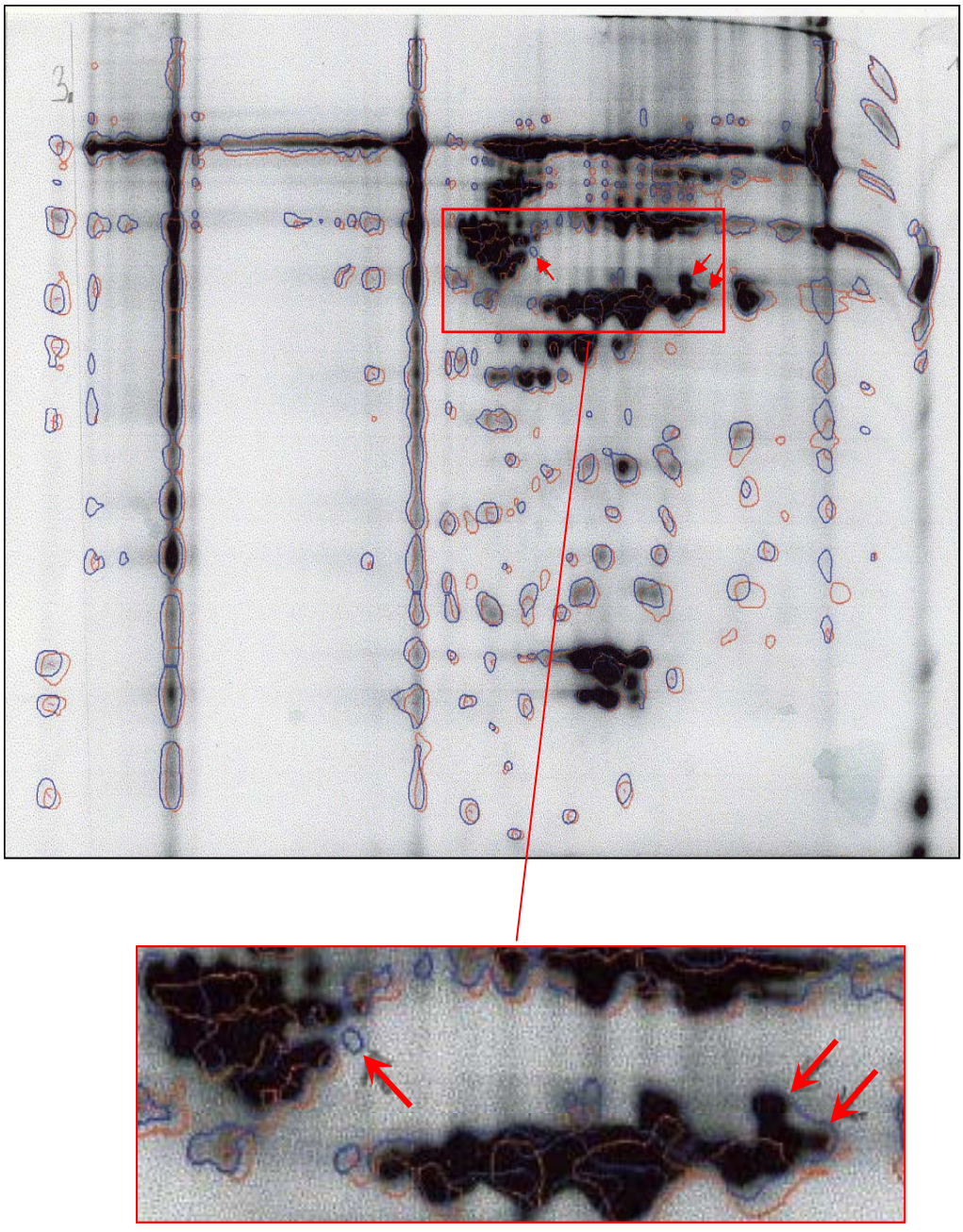
a) protéines cytoplasmiques d'ovaires sains



b) protéines cytoplasmiques d'ovaires infectés par *Wolbachia*

<u>Figure 3.6:</u> DIGE de protéines cytoplasmiques (a) d'ovaires sains et (b) d'ovaires infectés par *Wolbachia*. Chaque gel est chargé avec 50 µg de protéines. Les différences détectées entre les deux échantillons sont indiquées sur la figure 3.7. Les masses moléculaires sont indiquées sur la gauche et les points isoélectriques sont notés en haut du gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 3.7:</u> Superposition des deux fluorescences cye3 et cye5 du gel de protéines cytoplasmiques d'ovaires sains entourées en rouge et d'ovaires infectés par *Wolbachia* entourées en bleu. Les trois protéines détectées supplémentaires sur l'échantillon d'ovaires infectés par *Wolbachia* sont indiquées par des flèches rouges.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les gels sont ensuite analysés grâce au logiciel Phoretix® qui détecte les protéines. Le gel « standard » ou de référence est le gel de protéines cytoplasmiques d'ovaires sains et le gel à comparer est celui de protéines cytoplasmiques d'ovaires infectés par *Wolbachia*. Le logiciel entoure les protéines de référence en rouge (ovaires sains) et les protéines à comparer en bleu (ovaires infectés). La superposition des deux fluorescences peut alors s'effectuer et les protéines entourées d'une seule couleur sont repérées à l'œil (figure 3.7). De cette façon, trois protéines ont été clairement visualisées comme présentes sur le gel de protéines d'ovaires infectés et absentes sur le gel d'ovaires sains (figure 3.7 et tableau 3.6). Ces protéines ont été prélevées à l'aide d'un automate, puis analysées afin d'obtenir des micro-séquences. L'analyse des microséquences obtenues n'a pas aboutit à un résultat concluant.

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Gel	Analyse en Spectrométrie de masse	Information de Micro-séquences	Identification
6	**75**	**6.5**	**♀ F**	**non**	**oui**	**non**
7	**60**	**7.4**	**♀ F**	**non**	**oui**	**non**
8	**58**	**8.0**	**♀ F**	**non**	**oui**	**non**

<u>Tableau 3.6:</u> Caractéristiques des protéines supplémentaires détectées en DIGE présentes dans l'échantillon de protéines cytoplasmiques d'ovaires infectés (♀ F) mais absentes dans celui de protéines cytoplasmiques d'ovaires sains, et analyses réalisées sur ces protéines.

3.3.2 DIGE de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes

Les quantités de tissus (glandes androgènes normales) étant limitées pour l'extraction de protéines, les gels ont été chargés avec 15 µg de protéines de chaque échantillon, c'est-à-dire 15 µg de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales et 15 µg de protéines

cytoplasmiques de glandes androgènes hypertrophiées (figure 3.8). Le temps d'exposition est de 3 min.

De la même façon que précédemment, quatre protéines ont été clairement visualisées comme présentes sur le gel de protéines de glandes androgènes hypertrophiées et absentes sur le gel de glandes androgènes normales (tableau 3.7). Ces protéines ont été prélevées manuellement, après coloration au bleu de Coomassie du gel, mais aucune information de micro-séquence et de spectrométrie de masse n'a pu être obtenue.

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Gel	Analyse en Spectrométrie de masse	Information de micro-séquences	Identification
1	**32**	**4.0**	**GAH**	**non**	**non**	**non**
2	**25**	**4.2**	**GAH**	**non**	**non**	**non**
3	**22**	**5.0**	**GAH**	**non**	**non**	**non**
4	**24**	**4.8**	**GAH**	**non**	**non**	**non**

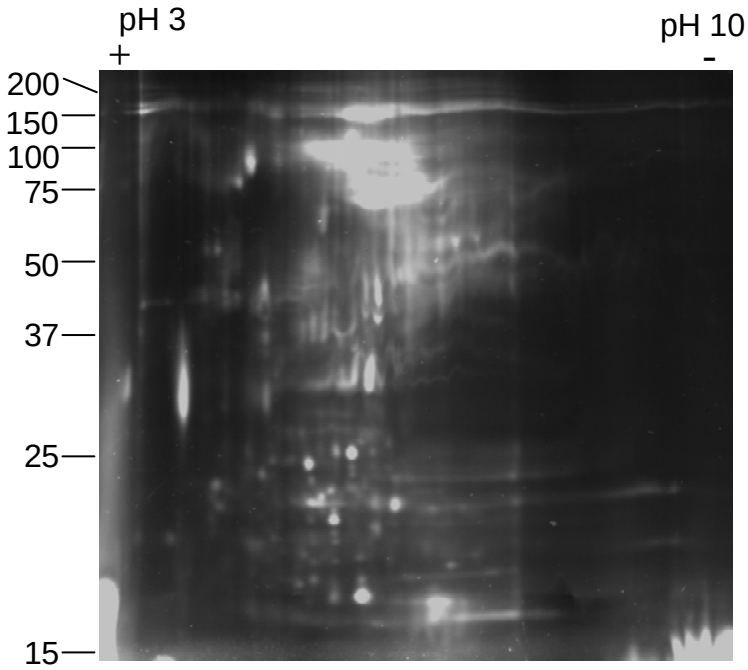
Tableau 3.7 : Caractéristiques des protéines supplémentaires détectées en DIGE présentes dans l'échantillon de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes hypertrophiées (GAH), mais absentes dans celui de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales, et analyses réalisées sur ces protéines.

3.3.3 DIGE de protéines cytoplasmiques d'hémolymphe

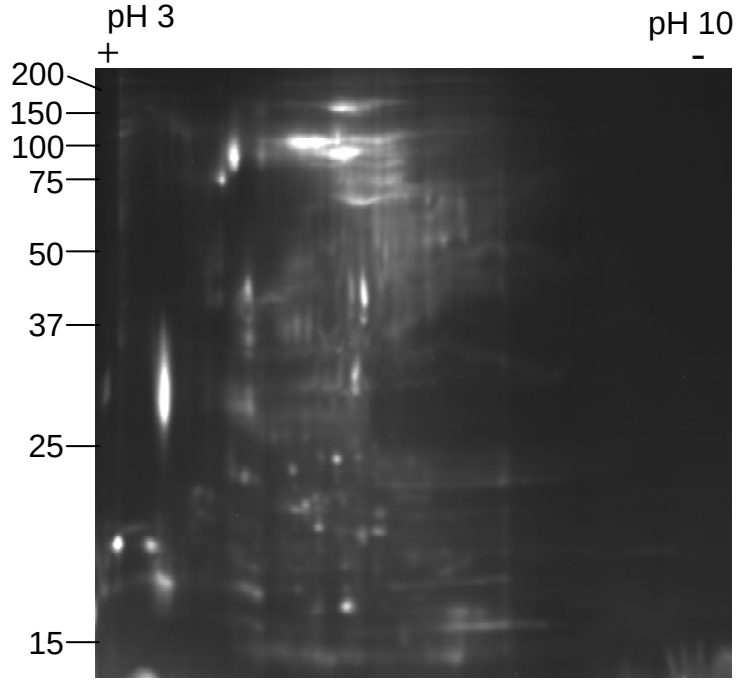
Des expériences de DIGE ont également été réalisées à partir de protéines d'hémolymphe d'animaux sains et d'animaux infestés par *Wolbachia* (non illustré). Aucune différence majeure n'a pu être détectée entre les deux échantillons après analyse informatique des gels.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



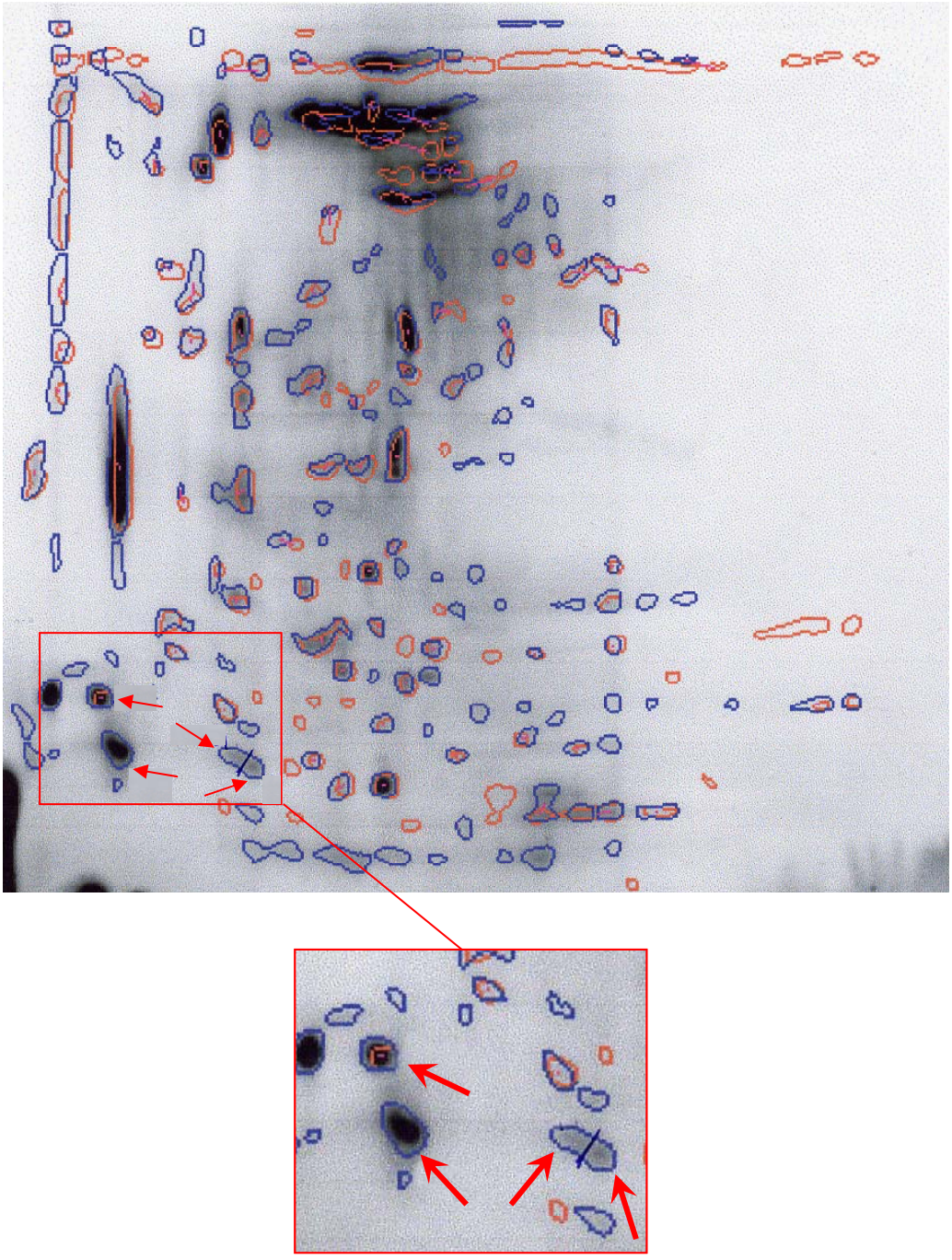
a) protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales



a) protéines cytoplasmiques de glandes androgènes hypertrophiées

<u>Figure 3.8 :</u> DIGE de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales (a) et de glandes androgènes hypertrophiées infectées par *Wolbachia* (b). Les différences détectées entre les deux échantillons sont indiquées sur la figure 3.9. Les masses moléculaires sont indiquées sur la gauche et les points isoélectriques sont notés en haut du gel.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



<u>Figure 3.9 :</u> Superposition des deux fluorescences cye3 et cye5 du gel de protéines cytoplasmiques de glandes androgènes normales entourées en rouge et de glandes androgènes hypertrophiées infectées par *Wolbachia* entourées en bleu. Les quatre protéines détectées supplémentaires sur l'échantillon de glandes androgènes hypertrophiées infectées par *Wolbachia* sont indiquées par des flèches rouges.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.4 Microséquençage

3.4.1 Protéines cytoplasmiques d'ovaires

Les données de microséquençage obtenues consistent en des fragments peptidiques de 3 à 27 acides aminés issus d'un même spot.

Spot	MM[1] (kDa)	pI[2]	Echantillon	Micro séquences	Identités de séquences
2	**20**	**6.7**	**F**	1)ELVDLH 2)FPVNEL 3)FPVNLE 4)LFDSYYQDK 5)FVQLDV 6)(DL)LAFLVNSFQ 7)(DL)LAFLVNSGA 8)(DL)LAFLVNSF---R 9)LNVDLSYQE 10)FPVGGLE	ND
4	**42**	**6.3**	**F**	1)LTGDLPVLYYK 2)(LN)VDLSYQE 3)QPAGYCVDWR 4)QENGELVDL 5)FDGNTLDNDLMLL(R)LSSQ 6)LSAGLFLVD 7)FALET(VL)DLQ 8)LVHAL 9)GDVLLN 10)LTVPD	ND
5	**62**	**7.0**	**A**	1)LTGDLPVFEYK 2)LNVDLSYQ 3)(NV)LQSSQNAQLNVK 4)QPAGYCVSL 5)NLLPSLF 6)LPHFDSNPAGY 7)(TQ)FPTQTADQLNPETLTAR 8)(GL)YNLLPSLFYFMR 9)YNLLPSLFYFMR 10)EDLMPVGGLE 11)ETSVVLDN 12)DDNHVASLTGSLK 13)(NV)LQSSQGGAQLNVK 14)VSYPFTQLVD 15)EPNLLPSLFSSASEAR 16)QNPNQQDMYFNYNNNPEGK	ND
6	**75**	**6.5**	**F**	1)TVLLVK 2)LPSGLVK 3)LVQPYK 4)LKVNYK 5)LKVNYK 6)GPALTVPAR 7)LDSPTDMK 8)LDSPTDMK 9)YFETKLK 10)YFETSGPK 11)LPTESSQYDNFK 12)SEQLPVASK 13)YYETELR 14)HHWYEKNLAFK 15)HVAAETGSLK 16)LTGDLPVNLSPR 17)LLPSLFSSNSAGGK 18)LTGDLPV	ND

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

7	**60**	**7.4**	**F**	1)VLFDQNVNK 2)LTGDLPVLYYK 3)DLQ 4)FTLTLNR 5)VLFPLTQSR 6)VAVSAVEALK 7)QVLNK 8)LDSPESMK 9)LQVNYK 10)QGFDLTYKE 11)SFDDQLR 12)VAVSAV 13GLVSAV 14)ESQL 15)TDQL 16)VFQSSQLFVQGVK 17)VLFPG 18)SEQLQLLK 19)YYETELR 20)FPFTR 21)LVTPH 22)FFALETQQALK 23)FFALET <u>Deuxième série d'analyse :</u> 1)LEHGK 2)FPFTR 3)TVSLPR 4)ALSLAPR 5)LQVNYK 6)LAGVNYK 7)FTLTLGGR 8)MTLTLGGR 9)LDSPCLMK 10)LDSPTDFK 11)YFETQLK 12)YFETAGLK 13)LPTESSAGYDNFK 14)YYETELR* 15)VAVSAVEALK* 16)VAVSAVEALK* 16)HLASVTGTAR 17)HLASVTGSLK 18)LTGDLPVNLLVK 19)LTGDLPVFEYK 20)LLPSLFSSNPFR 21)WWW^{3}W^{3}WNTRWNDDKTLV PLPLLLTLAAFSR	ND
8	**58**	**8.0**	**F**	1)TVSLPR 2)LKVNYK 3)LKVNYK 4)SHR 5)YFETKLK 6)GGCCK 7)VAVSATTPLK 8)ENNK	ND

<u>Tableau 3.8:</u> Microséquences obtenues après digestion à la tryspine sur les spots différentiels prélevés sur des gels de protéines cytoplasmiques d'ovaires, et identités de séquences éventuelles. ND : non déterminé. [1] : Masse moléculaire ; [2] : Point isoélectrique (http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html).

La comparaison des microséquences obtenues avec les séquences de protéines connues et disponibles dans les banques de données ne révèle pas d'identité de séquences. Aucun des spots prélevés n'a pu être identifié.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.4.2 Protéines de glandes androgènes

Spot	MM[1] (kDa)	pI[2]	Echantillon	Micro séquences	Identités de séquences
1	**60**	**8.7**	**GAH**	TVSLPR-LLEFGK-CSDTCK-GPGK-GSASGTGCK-VATVSLPR-MNRCNFLSGTK-VAATAAGGPR-QWGTPCK-NSGEGTHGPSTAPK-ENCVGYAMSTAPK-MGCR-MAYMDSPR-HCSR-CTMPGATVSK-CLTMFPSR-LMDK-FCSNHYPR-SPCGGPEPTVK-SPMGCGELSR-EYCMEDTR-WADMAFQLR-DVDYGMSTCR-TYEPNMHCR-AEAAGCCGFLPR-EAATLPSYAAHK-AGAHMSPLGGSTGK-AVPAYALDGCGAER-GLPAYALCCGGAANK-MNFCNPGELVPVK	ND
2	**32**	**6.1**	**GAH**	ETHLEQVAGK-HYSSGKPTLR-MLHKLSFCR-VLMLLSK-ALYLLSK-NGGLEQVK-MCLPLGTLVSGK-APAGK-TGDVGSLPR-HSSGLFEK-ELSGLFEK-LDTRELSGLFEK-DLVKDLEK-DAEELVCK-AGTNK-LMVK-LVTSYTFR-TLQETFEK-MNEVLGGHK-LEYHPGTATEACR-DVAVSRLEK-SVEGRQGCGK-TLGAETFEPGCYHK-GTDDWALLR-ASDDWALLR-CELDLGTLK-DCGVMYGAPK-VFEEYQDK-LEGYHPNSALTAGAPK-WVTEADEAPPGGGVLR-DQYRSLYGK-AVGTNEKDLTR-CACAENLAHAYYRPLK-LLMSVLSFCR-LLMSVLSFCR-LGWCSLPGGALELLDSSK-LLMSLLSFCR-LTACR-LLMSLLSFCR-LLMSVLGHGGNK-EPMSVLCCMR-VFEEYQDKTWEFEK-MLESLLSFCR-LLMCPLSFCR-LLMPPLLSFP-LLMEGGLSFTSK-WPMSLLSCFGR-DLEQELSGLFEK-ELYYAHALDAGAMK-	ND
3	**33**	**8.0**	**GAH**	VGYGGR-TVSLPR-TPPVAGR-LTPVGAR-GGPK-ALYGDLR-VAGGNPGPR-EEPGVATVSLPR-VATVSLPR-VVLVTAGAR-RATELGPR-ALPSTVAGAR-DAEMRTLK-LVTSPRWK-CGTSR-WMMDLKHGLTFLR-LMAEVMAPPR-GEMMDLQHGLTFLR-LMAELEPALK-WMYDLQHGLTFLR-NEMMDALCVEPCHR-GGGLGSR-LLMSLLSFCR-LLMSVLSFCR-WELSVQSGMAR-LDASTDYSVTAGSR-AVGTDEGALLELLCTR	Lactate deshydrogénase (7.5% de recouvrement avec *Drosophila melanogaster*, AE003563 et 25% avec *Salmo trutta*, AJ277711)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

4	**22**	**6.5**	**GAH**	TVSLPR-VLDVLK-AWGRGGGSAPK-ASLTPPK-GGPK-RLCHSK-SLMLVAK-AVGVALGGK-GNAK-GAWVKPK-AVGVTLNK-VMPVLEK-VAGDPLPR-VATVSLPR-RATVSLPR-LSSPATLNSR-CEGAPGVLLR-ELVAASGPGYR-CGATR-WCCYLAATR-DDPLYPAGTPK-NTVEWLPSKK-CLPTLVDGDLK-LLYFDMGTLYK-WNRFSQENGELVDLHPAAR-FWYVYPVLFNDARVLSEK	Glutathione S-transférase (13.8% de recouvrement avec *Anopheles gambiae*, AF071160)
5	**18**	**6.9**	**GAH**	GGSGGHK-GGGGKPLK-ACPCGNR-TTCASGA-ALGVVADACTDK-AANK-AYGASQSK-LGLNKLR-AAAEPLPR-SFTPYSK-VATVSLPR-MVELALR-RGCDATMK-QYTPYSK-RAVGGKALK-ALGVVADCR-ALGVVADFK-GVVADMAGDK-VEDK-RVADYKDK-LLPDGGADPR-FATPHVANLESLTK-YLDGLTVTR-MNSR-FVTPCGASTK-FVHAPCGAPK-LLMVGLDAAGK-DAVLSFGPGVK-LLFVGLDAAGK-AGLVVPDAPVPK-CTPRHSVTAR-LLNRELDTASSGVYAANTK-LLWCCNLLGTHGCGAAGEAR-VYECECMLSADK-VYECWSMLTGSR-LLSDKEVEDLLLCAQEAR-WLHYLNMCGPKNLTVLVHK	ABC transporteur (9.6% de recouvrement avec *Agrobacterium tumefaciens*, AE008239)
6	**45**	**6.2**	**GAH**	TVSLPR-LLACHK-LYGGQVK-AGPR-SPNLVFK-DFLLKPELLR-YLDPAVAK-VATVSLPR-DVQDLFR-LEACGMLAK-YFAGWADK-TAHR-ANLFAQGLR-YGLAAAVFTK-MNDK-VAFTGSTEVGHLLAGK-GPETK-LLVATNLFGR-MLER-CCSR-YCFGDLDTLK-RPAGEK-LQPLATGPACRMK-WLSKEGMLAPPR-GYFVSPTVFADVK-LATEELFGAPVGKLFK-YPVEEGVYDGCGTGER-FGSGNDEAK	Aldéhyde deshydrogénase (8.1% de recouvrement avec *Caenorhabdits elegans*, AF106575, et 12.5% avec *Xenopus laevis*, AF061833)
7	**54**	**6.3**	**GAH**	TPEVVK-VAGDPLPR-ALGSELVR-SSFALQFLMSR-LNVYPNR-VTVR-GLHR-YWWSSLK-CLLVMVVR-VHVCPTCVLVESNK-GGAGLLK-ELPGALLLDQYK-GYLEYEVVSTFDAGVLVVK-MVEDHVDHSMCSHLHGNACVK-NPGNLPAHYDGTAEELLKKLGSK-ENDPVMAGMLGVAVNAR	Cystathionine β synthase (6.9% de recouvrement avec Xenopus laevis, BC044091)
8	**45**	**6.1**	**GAH**	DEVLGAR-AATVPLPR-DFLLEPNAGLR-VATVSLPR-YLDPAVAK-DVQDLFR-RATVSLPR-NSCPHLVVGTPGR-ELAQYLAK-APGGVVAAGLR-HNPK-VVRLGANSGK-YGLAAAVFTK-LSSPATLNDK-VAFTGWMVGFCLKK-LLVATNLFGR-SFVTK-	RNA hélicase (9.6% de recouvrement avec *Drosophila melanogaster*, AE003610, et 10% avec *Xenopus laevis*, BC045125)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

				NTLKPMVHPAR- FCRNLQTDGPRQAYTR- LGPPSATGNTVLFK- GLGLTFVSEESDAK- LATEELFGPVKGALFK	
9	**55**	**6.2**	**GAH**	MTGYK-VTAEPR-GGFFTR- EVSGGHK-VSGDCGMR-ACPK- VATVSLPR-TLVVGGDGR- LLMSDGSR-GVATTTPPR- AEVLNQLK- EPTVMGGAKPAVYK-FNSR- ETPNSMLLR-LYLESYER- CEPGWFRSK- TPAGCYTSSMSPGTFK- VLRAAMHVGTGPYVEK- LSMAAGEESFGTGARGPAR- LFLEELMDDK- CPDLDSLLAEVK- ELFDFASLEMRSK- CVSWHMTVPCLSVVGTVK- WCWLYCCKLAVRGCNVCMLP TGGHAR	Phosphoglucomutase (7.9% de recouvrement avec *Brucella melitensis,* AE009622, et 7.5% avec *Drosophila melanogaster,* AF290330)
10	**84**	**6.0**	**GAH**	AGGYSVR-HLDLPR- LLMSGSGK-ADLHEGCNWR- LDQLHLEFAK-VAGPDLPR- VGGAYCVR- KMHDLLTGGGSK-HGAVSLPR- ALDFLASK-LFFSRCR-ACSR- LLACLELLLDQKGAAR- LHTNVKESFLFENR- EGLLDPAWEK-EGLLLWCQR- ARNVHTGGAAPAFDLAEK- ACLLSLGYSLGK- LETNFNTLKTK- DPSLGAEELVDGNLK- CMEESVLLSEMMR- MSKDLLAPANPGAANK- MWCYAHVKACSHSNLTGSGLE R- WRKRPEWKLALDYYDSATLNA R- MCRQRLWRNPPYTTLTAAGVL STK	α actinine (12.6% de recouvrement avec *Drosophila melanogaster,* AL031765)

<u>Tableau 3.9 :</u> Microséquences obtenues après digestion à la tryspine sur les spots différentiels prélevés sur des gels de glandes androgènes, et identités de séquences éventuelles avec les séquences protéiques disponibles dans les banques de données. Les numéros d'accession sont indiqués après les pourcentages de recouvrement.
[1] : Masse moléculaire
[2] : Point isoélectrique
(http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html).

Afin de vérifier l'identification déduite de l'analyse par comparaison de séquences, les caractéristiques (masse moléculaire et point isoélectrique observés sur gel) de la protéine hypothétique sont comparées avec celles de protéines correspondantes chez des organismes proches (tableau 3.10).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Protéine	MM et (pI) Gel GAH	MM et (pI) *Drosophila melanogaster*	MM et (pI) Organismes proches	MM et (pI) *w*Mel	Identification la plus probable
Lactate deshydrogénase (LDH)	33 (8.0)	35.5 (6.6)	*Anopheles gambiense* 38 (7.72)	ND	LDH *A. v.*
Gluthatione-S-transferase (GST)	22 (6.5)	27 (4.5)	*Drosophila simulans* 23.7 (6.2)	25 (7.0)	GST *A. v.*
Aldéhyde deshydrogénase (ADH)	45 (6.2)	62 (7.49)	*Xenopus laevis* 55.2 (7.5)	40.2 (6.1)	ADH *A. v.*
Cystathionine β–synthase (CβS)	54 (6.3)	ND	*Xenopus laevis* 62.2 (6.0)	ND	CβS *A. v*
α actinine	84 (6.0)	103,7 (5.45)	*Biomphalaria glabrata* (gastéropode) 89.5 (6.1)	ND	α actinine *A. v*
RNA hélicase	45 (6.1)	51.9 (7.5)	*C. elegans* 48.7 (8.27)	45.9 (9.9)	RNA hélicase *A. v*
Phosphoglucomutase (Pgm)	55 (6.2)	60.7 (6.2)	*C. elegans* 61.7 (6.0)	51.7 (6.3)	Pgm *w*Vul ou *A. v* ?
ABC transporteur	18 (6.9)	90.9 (8.59)	*Bombyx mori* 41.9 (8.91)	16.2 (9.08)	ABC transporteur *w*Vul

Tableau 3.10 : Comparaison des masses moléculaires et points isoélectriques (entre parenthèses) obtenus sur gel bidimensionnel avec ceux connus pour *Drosophila melanogaster* et d'autres organismes proches et conclusion probable sur l'identification. *A. v.* : *Armadillidium vulgare*

Les masses moléculaires et points isoélectriques des spots différentiels prélevés sur gel de protéines de glandes androgènes correspondent à ceux d'organismes proches. Ces résultats nous permettent de valider la proposition d'identification du programme msblast.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

3.4.3 Protéines d'hémolymphe

Spot	MM[1] (kDa)	pI[2]	Echantillon	Micro séquences	Identités de séquences
1	**100**	**?**	**F**	1)TLDDSLGAA 2)NNFGGER 3)YKLKLVPSEGGFPL 4)YSDWKR 5)AEGEVMESTK 6)FMLHPSR 7)NDLVTDFDV 8)KTLDVLKSG 9)NNFNDDNALNMLNVR 10)QLFLVELPR 11)FPLQKLFDSYYKSR 12)LSKLFLVDLPR 13)KLFLVDLPR 14)LSKLFLLG 15)QLFLLELPR	Vitellogénine (24% de recouvrement avec vitellogénine *A. vulgare*, AB037247)
2	**200**	**?**	**F**	1)LTGDLPVLYYK 2)KPNLLPSLFS 3)EDLMPVNLF 4)NVPGMEYEFMYEGKVK 5)VAVSAVEALK 6)WDLPTSTR 7)PLTKPYATPSR 8)STDPELAEKAKVAR 9)MASNLELALR 10)NNFGGVMNALNFLNVR 11)KGFDLTYKEPLPR 12)NVLKSSQNAKLNVK 13)LDFNSNYR 14)VAAVYSLNK 15)VFKSSKDSKVDVK 16)LRCVLEEWK 17)WEELR 18)VFKSSQDSKVDVK 19)YKPLS 20AESVVMESTK 21)LDSPTDMK 22)HLASVTGSLK 23)ESVVMEST 24)NDLVTDFDVSSLR 25)LSKLFLLELPR	Vitellogénine (28% de recouvrement avec vitellogénine *A. vulgare*, AB037247)

<u>Tableau 3.11:</u> Microséquences obtenues après digestion à la tryspine sur les spots différentiels prélevés sur des gels d'hémolymphe, et identités de séquences éventuelles avec les séquences protéiques disponibles dans les banques de données. Les numéros d'accession sont indiqués après les pourcentages de recouvrement.
[1] : Masse moléculaire
[2] : Point isoélectrique

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

4. DISCUSSION

Afin d'expliquer les mécanismes de la féminisation, nous avons émis l'hypothèse que *Wolbachia* sécrète une ou des protéine(s) dans le cytoplasme de la cellule hôte, qui seraient responsable(s) de la différenciation des mâles génétiques en femelles fonctionnelles. L'un des aspects de cette hypothèse est que nous ne connaissons pas le niveau d'expression des protéines bactériennes, et si la quantité de protéines bactériennes sécrétées dans le cytoplasme de l'hôte est suffisante pour pouvoir être détectée en électrophorèse bidimensionnelle. Cependant, la mise au point de l'électrophorèse bidimensionnelle de protéines nous a permis d'établir des cartes protéiques de tissus infectés et de tissus non infectés et de mettre en évidence des différences d'expression protéique pour les différents tissus étudiés (ovaire, glande androgène, plasma). Les comparaisons des données obtenues en spectrométrie de masse et par microséquençage avec des banques de données (NCBI, TIGR) nous ont permis d'identifier quelques protéines. Dans le tissu ovarien, des différences notables ont été détectées mais seule la vitellogénine, protéine de l'hôte, a pu clairement être identifiée (53% de recouvrement avec *A. vulgare*). De la même façon, l'analyse de la ligne de protéine supplémentaire dans les échantillons plasmatiques indique qu'il s'agit de vitellogénine (de 24% à 28% de recouvrement avec *A. vulgare*). L'analyse des spots différentiels des échantillons de glandes androgènes s'est révélée la plus informative avec des probabilités variables d'identification de protéines.

Concernant la phosphoglucomutase, ces analyses ne nous indiquent pas clairement s'il s'agit d'une protéine de l'hôte ou d'une protéine bactérienne. Cependant, l'analyse ne tient pas seulement compte de la comparaison de séquences. Le placement des microséquences sur la protéine connue est également étudié, ainsi que la comparaison des masses moléculaires. Ainsi, plus les microséquences se repartissent de façon significative sur la protéine similaire d'un organisme proche, et plus la masse moléculaire observée sur le gel se rapproche de cette protéine, plus la probabilité d'une bonne identification est forte. Ces analyses complémentaires laissent penser que la Phosphoglucomutase et l'ABC transporteur seraient plutôt des protéines bactériennes et la discussion s'orientera dans ce sens. Il ne faut pas non plus oublier que des comparaisons de ces microséquences ne peuvent se réaliser qu'avec des organismes plus ou moins proches tels que la drosophile ou l'anophèle pour l'hôte et *Brucella* spp. ou *Agrobacterium* spp. pour *w*Vul. Très peu de protéines d'*A. vul*gare et de *w*Vul ont en effet été déposées dans les banques de données. Le dernier paramètre à prendre en compte est

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

la probabilité des microséquences obtenues après analyse en LC/MS. Elle peut en effet varier de 10% à 90%. Ces données expliquent le fait que les pourcentages de recouvrement peuvent paraître faibles, mais pour chacune des protéines probablement identifiées, le programme utilisé (blastp2 du groupe Bork, EMBL) nous indique un succès positif d'identification (Gish, W. (1996-1999), http//blast.wustl.edu et Shevchenko et al., 2001). Cependant, l'identification de ces protéines reste probable mais pas certaine. Des expériences complémentaires devront être effectuées afin de confirmer ou d'infirmer ces analyses.

La disposition des séquences concernant le génome de *w*Vul nous permettra très prochainement de progresser dans l'identification plus précise (voir chapitre I) et significative des protéines de *w*Vul.

Nous avons détecté la présence de la vitellogénine dans les tissus infectés (ovaires et plasma) et absente ou plus faiblement présente dans les tissus sains. Dans les échantillons d'ovaires, cette protéine se présentait sous la forme fragment de la vitellogénine de 42 Kda, et dans le plasma, sous la forme de ligne protéique à 100 kDa et 200 kDa. Les vitellogénines identifiées à ce jour dans les œufs et les ovaires de *A. vulgare* sont au nombre de 6 et ont des poids moléculaires respectivement de 205, 200, 185, 180, 122, 112 KDa. Les 4 plus grandes protéines disparaissent des œufs une semaine après l'oviposition et une protéine de 59 KDa apparaît ensuite (Okuno et al., 2000). Seule une partie de la séquence des protéines de 112 et 122 KDa est connue (numéro d'accession Genbank : AB037247), et les analyses de séquence réalisées par Okuno et al. suggèrent que la protéine de 112 KDa correspondrait à celle de 122 KDa à laquelle il manquerait la partie amino-terminale de 80 à 90 résidus. Les deux isoformes de vitellogénine détectées dans le plasma ont donc des tailles correspondantes à celles de vitellogénines connues. La protéine supplémentaire que nous avons détectée sur le gel de protéines cytoplasmiques d'ovaires de femelles infectées par *Wolbachia* donne une identification d'un fragment de vitellogénine avec 53% de recouvrement chez *A. vulgare*. Le poids moléculaire de 42 KDa de cette protéine ne correspond pas à la taille des vitellogénines connues mais des études montrent que les vitellogénines sont différentes structuralement à cause des points de rupture distincts de l'extrémité carboxy-terminale et/ou à cause de l'hétérogénéité de la fraction des hydrates de carbone (Okuno et al., 2000).

Okuno et al. (2000) ont par ailleurs montré qu'une hybridation sur Southern blot avec une sonde d'ADNc du fragment de vitellogénine actuellement connue engendre un seul signal suggérant qu'il n'existe qu'un seul transcrit de ce gène. La pro-vitellogénine (précurseur) pourrait subir différents clivages protéolytiques, glycosylations ou fixations de résidus lipidiques pouvant ainsi former un large éventail moléculaire de vitellogénine ayant des poids

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

moléculaires différents. Une des hypothèses quant à la présence de la protéine de 42 KDa dans les tissus infectés serait que *Wolbachia* induit une maturation différente du précurseur de la vitellogénine.

La présence de *Wolbachia* chez *A. vulgare* a pour conséquence l'augmentation de la taille des ovocytes et donc des ovaires, et ceci serait dû à une production de vitellogénine plus importante chez les mâles génétiques féminisés que chez les femelles génétiques. Une production importante de vitellogénine se traduit par une dégradation de celle-ci car elle se retrouve en trop grande quantité dans les tissus. On peut donc penser que la protéine de 42 KDa identifiée comme un fragment de la vitellogénine provient d'une dégradation de la vitellogénine initiale. Chez les mâles génétiques, l'injection expérimentale de la bactérie engendre la production de vitellogénine (Martin et al., 1974). Cette production est absente chez les mâles génétiques non infestés. La bactérie inhiberait donc le rétro-contrôle négatif de la production de vitellogénine par la VIH chez les mâles ainsi que chez les femelles. En effet, chez *A. vulgare*, la glande du sinus sécrète la VIH (Vitellogenesis Inhibiting Hormone) chez les femelles (appelé AIH pour Androgenic Inhibiting Hormone chez les mâles) qui est responsable de l'inhibition la vitellogenèse secondaire chez les femelles élevées dans des conditions stimulantes (Grève et al., 1999). Ce neuropeptide stocké dans les glandes du sinus aussi bien chez les femelles que chez les mâles, est impliqué dans la reproduction. Il pourrait également inhiber l'activité de la glande androgène chez les mâles comme cela a été suggéré dans des études basées sur l'implantation hétérospécifique de glandes androgènes (Martin et Juchault, 1999). La vitellogénine serait sécrétée en excès du fait du blocage de la VIH/AIH ou de son récepteur. Cette hypothèse expliquerait le fait que l'on retrouve de la vitellogénine en cours de dégradation car en quantité importante dans les ovaires infectés.

La comparaison des gels de glandes androgènes normales et hypertrophiées nous indique qu'il existe des différences d'expression protéique entre tissu sain et tissu infecté par *Wolbachia*. L'analyse des spots différentiels sur les gels de glandes androgènes hypertrophiées nous révèlent notamment la présence de plusieurs protéines de l'hôte surexprimées : la lactate deshydrogénase (LDH), la glutathione-S-transferase (GST), l'aldéhyde deshydrogénase (ADH), l'α actinine (α-act) et la cystathionine β synthase (CβS). La surexpression de ces protéines indique une désorganisation du métabolisme et du cytosquelette du tissu induite par *w*Vul. Dans une étude récente, la comparaison des protéomes de muqueuses gastriques infectées ou non par *Helicobacter pylori* a montré que l'expression de huit protéines est modifiée par l'infection (Baek et al., 2004). Parmi ces protéines, l'expression de la LDH et l'ADH est augmentée et celle de la GST est diminuée. Il

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

est désormais bien établi que l'augmentation de l'expression de la LDH est liée au phénomène de tumorisation et son dosage est utilisé comme marqueur de prolifération cellulaire (Porcel et al., 2004). Chez l'homme, un taux élevé de LDH est représentatif d'un cancer des testicules (Liu et al., 1982). Il n'est donc pas surprenant de constater qu'il y a surexpression de LDH dans la glande androgène hypertrophiée dont l'aspect rappelle celui d'une tumeur. Cette constatation est en accord avec le fait que ces surexpressions n'ont pas été détectées dans les ovaires infectés par wVul, ces tissus présentant en effet un aspect normal et non prolifératif. Le fait que l'on retrouve les mêmes protéines impliquées dans l'infection par *Helicobacter pylori* et par *w*Vul est assez intriguant et nous amène à nous interroger sur une stratégie commune de pathogénicité. Un même parallèle a été discuté par Kempf et al. (2002) entre *Bartonella henselae* provoquant une prolifération cellulaire des cellules endothéliales chez l'homme et *Agrobacterium tumefaciens* qui provoque une tumeur du collet chez les plantes. *Bartonella henselae* et *Agrobacterium tumefaciens* sont deux bactéries proches et toutes deux possèdent un système de sécrétion de type IV. L'hypothèse émise est que la stratégie de pathogénicité doit être commune à plusieurs espèces bactériennes chez différents hôtes car elles partagent les mêmes facteurs pathogéniques. L'infection par ces bactéries mène à des proliférations cellulaires de la même façon que l'infection par *w*Vul entraîne une prolifération cellulaire de la glande androgène, qui possède, elle aussi, un système de sécrétion de type IV. La transformation tumorale des glandes androgènes suite à une infection par *w*Vul pourrait être le fait d'un facteur de virulence sécrété par son système de sécrétion de type IV. Ce facteur interagirait avec les voies de signalisation de la croissance cellulaire.

Chez la bactérie Gram négative *Agrobacterium tumefaciens*, l'enzyme Phosphoglucomutase convertit le glucose 6-phosphate en glucose 1-phosphate et est nécessaire à la synthèse de β(1-2)glycane, donc de lipopolysaccharides ou LPS (Uttaro et al., 1990). Chez *Agrobacterium tumefaciens*, des expériences de mutation du gène codant pour la Phosphoglucomutase (*pgm*) ont montré que la bactérie perdait sa virulence et que ceci était dû à un défaut de la synthèse des LPS (Uttaro et al., 1990). Chez *Brucella abortus*, la mutation du gène *pgm* montre que les LPS ne sont pas nécessaires à l'invasion et à la multiplication bactérienne, mais sont impliqués dans la survie intracellulaire (Ulgade et al., 2000). Une autre étude chez la bactérie symbiotique *Vibrio fischeri* indique que *pgm* est un gène nécessaire à la colonisation de l'hôte (DeLoney et al., 2002). La présence de LPS a été montrée chez la *Wolbachia* symbiote du nématode *Onchocerca volvulus* (Brattig et al., 2000). La présence de cette enzyme conforte le fait que les LPS peuvent exister chez *Wolbachia*. Leur rôle reste à déterminer. Sont-ils impliqués comme chez *B. abortus* dans la survie de la bactérie dans la

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

cellule hôte, sont-ils nécessaires à la virulence comme chez *A. tumefaciens*, pour coloniser les tissus de l'hôte comme chez *Vibrio fischeri* ? Comment se fait il que nous détections cette protéine bactérienne dans les échantillons protéiques de glandes androgènes hypertrophiées ? Ces questions restent pour le moment sans réponse et d'autres investigations étudiant le rôle des LPS chez *Wolbachia* permettraient de mieux comprendre leur implications dans l'infection bactérienne et éventuellement sa virulence.

Les RNA hélicases se rencontrent chez la plupart des organismes et ont un rôle important dans le métabolisme des ARN. Elles s'associent à différents processus, de la synthèse à la dégradation des ARN. Les RNA hélicases interviennent de façon plus ou moins importante dans les processus suivants : transcription, épissage des pré-ARNm, transport d'ARN, initiation de la transcription, dégradation d'ARN. Chez la drosophile, la surexpresion du gène *pit* codant une RNA hélicase entraîne une prolifération cellulaire (Zaffran et al., 1998). Chez *C. elegans*, CGH-1, une RNA hélicase est nécessaire pour le développement d'ovocytes fonctionnels et la gamétogenèse (Navarro et al., 2001 ; Smith et al., 2002). Ce processus rappelle la nécessité de la présence de *Wolbachia* chez la guêpe parasitoïde pour la réalisation de son ovogenèse. Un autre fait important est que, chez *C. elegans*, cette protéine CGH-1 semble être exprimée spécifiquement dans la lignée germinale et l'embryon précoce, et peut réguler le métabolisme des ARN stockés dans les cellules de cette lignée. Ce phénomène pourrait être relié avec le phénomène de féminisation chez *A. vulgare* qui a lieu lors à des stades très précoces chez le jeune. La bactérie pourrait interagir avec cette RNA hélicase ou avoir un effet sur son expression, ce qui aurait pour conséquence de modifier les ARN impliqués dans la différenciation sexuelle.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au vu des résultats obtenus concernant l'expression du système de sécrétion de type IV, il nous apparaît que *Wolbachia* pourrait sécréter une ou plusieurs molécule(s) dans le cytoplasme de la cellule hôte. Dans ce sens, la stratégie d'électrophorèse bidimensionnelle nous a semblé appropriée car elle comporte plusieurs avantages. Tout d'abord, toutes les protéines détectées par cette méthode sont des candidats évidents pour lesquelles des expériences complémentaires doivent être menées. Elles ouvrent la voie vers de nombreux autres axes de recherche. La séquence en acides aminés de ces protéines pourra être corrélée à une séquence nucléotidique pour finalement être directement localisée sur le génome correspondant s'il s'agit d'une séquence de *Wolbachia*. Un autre des avantages de cette

technique est qu'elle peut nous permettre l'identification de nouvelles protéines, et même si elles ne sont pas directement reliées au processus de féminisation, leur connaissance nous permettra de mieux cerner le fonctionnement de *Wolbachia* ou de son hôte. Cependant, la technique ne permet pas d'identifier des protéines exprimées à des taux très faibles, des protéines hydrophobes ou en dehors des échelles de masses moléculaires ou de point isoélectrique.

Les protéines candidates d'intérêt pourront être testées, une fois purifiées, par injection *in vivo* à des jeunes mâles afin de vérifier leur capacité de féminisation, et cela dans l'hypothèse que les facteurs féminisants bactériens agissent au niveau de récepteurs de l'hôte. Une seconde approche consisterait à transformer *Wolbachia* en inactivant le ou les gène(s) candidat(s) par mutagenèse dirigée. Une construction plasmidique contenant un gène candidat muté pourrait être utilisée pour remplacer l'allèle sauvage par recombinaison homologue. La souche *Wolbachia* transformée serait introduite dans *A. vulgare* non infectée par micro-injection et sa capacité à induire la féminisation pourra être testée.

Chez les jeunes mâles génétiques, *Wolbachia,* pourrait en bloquant le récepteur de l'AIH/VIH, inhiber l'activité de la gonade et le rétrocontrôle négatif de la sécrétion de vitellogénine, et induire, par ce biais, la différentiation sexuelle des mâles génétiques en femelles. Par défaut de développement de la glande androgène, l'ébauche gonadique se développerait en ovaire.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé et financé dans le cadre du contrat européen ***Euwol***. Deux objectifs principaux avaient été retenus afin de mieux comprendre les manipulations de la reproduction opérées par différentes souches de *Wolbachia*.

Avec pour objectif l'étude de la féminisation des mâles de l'Oniscoïde *A. vulgare*, les approches génomique et protéomique mises en œuvre devraient permettre de développer une stratégie qui conduit à terme, à la connaissance des gènes bactériens impliqués dans l'inversion sexuelle physiologique des mâles en néofemelles.

La caractérisation du chromosome bactérien de *Wolbachia* chez *A. vulgare* (*w*Vul) a été une entreprise qui nous a demandé beaucoup d'efforts et de persévérance, d'ailleurs nous pouvons souligner qu'un seul autre laboratoire avant nous était parvenu à ce même résultat chez *D. melanogaster* (Sun et al., 2001). La qualité des banques, réalisées à partir des grands fragments d'ADN que nous avons fournis après isolement de ce chromosome, coupures adéquates par des enzymes de restriction et migration en champ pulsé, ouvre la possibilité d'un séquençage rapide et complet de cet ADN dont nous avons estimé la taille à 1.76 Mb. Il est à remarqué que c'est l'un des plus grands génomes connus au sein des 6 clades de *Wolbachia*.

De plus au cours de nos recherches, nous avons pu montrer que, comme un grand nombre de bactéries Gram négatives, *Wolbachia* possédait un appareillage moléculaire lui permettant d'injecter des molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ce système de transport appelé généralement système de sécrétion de type IV est codé sur *w*Vul par deux opérons séparés et distants : *vir B3-B6* et *vir B8-D4*. Ces deux opérons semblent co-transcrits simultanément ce qui démontre leur nécessaire implication dans le fonctionnement de canal transmembranaire qu'est le système IV. Le transport au sein du système IV est de type actif et deux ATPases (VirB11 et VirD4) pourraient être les pourvoyeurs de l'énergie nécessaire au cheminement des effecteurs au sein du canal transmembranaire.

Le gène codant une Phosphatase situé en amont de l'opéron *virB8-D4* a retenu notre attention. En effet nous formulons l'hypothèse que cette enzyme pourrait être injectée dans le cytoplasme des cellules hôtes pour bloquer des voies de signalisation par déphosphorylation de certains substrats (voie des kinases). L'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre cette Phosphatase faciliterait le repérage de cette enzyme sur les cartes protéiques.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Notre étude protéomique menée en collaboration avec des laboratoires partenaires (H. Braig, Bangor, Pays de Galles et A. Van Dorsselaer, Strasbourg, France) a révélé un certain nombre de modifications essentiellement au niveau de l'expression des gènes de l'hôte et également une surexpression du gène de la vitellogénine que l'on retrouve en abondance dans le plasma de l'hémolymphe.

Notre étude comparative sur les protéines solubles contenues dans des tissus sains et infectés nous ont permis de découvrir des différences d'expression, en particulier dans les glandes androgènes, et nous ouvrent la voie vers de nouveaux axes de recherches. L'identification de protéines bactériennes restent une étape difficile et il ne nous a pas été possible d'identifier une ou des protéines bactériennes pouvant correspondre à des facteurs de virulence et notamment aucune protéine virulente type toxine (de grande taille) n'a été identifiée, accréditant l'idée que soit elle n'existe pas sous forme circulante soit que son niveau d'expression est trop faible ou que sa taille inférieure à 10 kDa ne peuvent être détectées par cette méthode.

Des approches complémentaires devront être poursuivies. Notre travail, dont une partie importante va conduire à l'établissement du génome de la *Wolbachia* responsable de la féminisation chez les isopodes terrestres, a en outre permis de resserrer les hypothèses antérieures relatives aux modes d'actions de *Wolbachia* chez *A. vulgare.* En effet il ne semble pas exister de toxine circulante donc notre hypothèse pour un travail futur repose sur la production de façon tissu spécifique d'un ou plusieurs facteurs de virulence capables de bloquer différentes voies de signalisation (récepteurs HA et neuropeptides type AIH). Cette dernière hypothèse est d'autant plus vraisemblable qu'une publication récente (Orth et al., 1999) démontre que le facteur de virulence Yop J (*Yersina* outer protein) est capable d'inhiber différentes voies de signalisation : NFḰB et celle de MAPK (mitogen-activated protein kinase) dans des cellules eucaryotes. Ce type d'interférences pourra être appréhendé en envisageant les interactions protéines-protéines par les techniques de double hybride et de GST-pulldown.

Enfin il pourrait être envisagé que les résultats obtenus au niveau du système IV soient approfondis afin d'obtenir des effecteurs modifiés capables de bloquer sélectivement le fonctionnement de ce canal transmembranaire. De telles molécules pourraient avoir des intérêts évidents en santé humaine et animale au moment où la résistance aux antibiotiques classiques devient une inquiétude majeure.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg. 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol **28:**37-53.

Anderson, D. M., and O. Schneewind. 1999. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. Curr Opin Microbiol **2:**18-24.

Andersson, S. G., and C. G. Kurland. 1998. Reductive evolution of resident genomes. Trends Microbiol **6:**263-8.

Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature **396:**133-40.

Andersson, J. O., and S. G. Andersson. 1999a. Genome degradation is an ongoing process in *Rickettsia*. Mol Biol Evol **16:**1178-91.

Andersson, J. O., and S. G. Andersson. 1999b. Insights into the evolutionary process of genome degradation. Curr Opin Genet Dev **9:**664-71.

Arakaki, N., T. Miyoshi, and H. Noda. 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). Proc R Soc Lond B Biol Sci **268:**1011-6.

B

Baek, H. Y., J. W. Lim, H. Kim, J. M. Kim, J. S. Kim, H. C. Jung, and K. H. Kim. 2004. Oxidative stress - related proteome changes in *Helicobacter pylori* - infected human gastric mucosa. Biochem J **Pt**.

Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci **265:**2407-13.

Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco, and L. Sacchi. 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int J Parasitol **29:**357-64.

Bandi, C., A. J. Trees, and N. W. Brattig. 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet Parasitol **98:**215-38.

Baril, C., C. Richaud, G. Baranton, and I. S. Saint Girons. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. Res Microbiol **140:**507-16.

Beard, C. B., S. L. O'Neill, R. B. Tesh, F. F. Richards, and S. Aksoy. 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. Parasitol. Today **9:**179-83.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Bensaadi-Merchermek, N., J. C. Salvado, C. Cagnon, S. Karama, and C. Mouches. 1995. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S rRNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. Gene **165:**81-6.

Besse, G., and J. Mocquard. 1968. Etude par électrophorèse des quantités relatives des protéines de l'hémolymphe d'individus normaux et de femelles castrées chez deux crustacés Oniscoides: *Porcellio dilatatus* Brandt et *Ligia oceanica* L. C. R. Acad. Sc. Paris **267:**2017-19.

Besse, G. 1976. Contribution à l'étude expérimentale de la physiologie sexuelle femelle chez les crustacés isopodes terrestres. Thesis, University of Poitiers.

Binnington, K. C., and A. A. Hoffmann. 1989. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. J. Invert. Pathol. **54:**344-52.

Borgo, R., C. Souty-Grosset, D. Bouchon, and L. Gomot. 1996. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA for identification of Snail Meat Species. J. Food Sci. **61:**1-4.

Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevieille, J. P. Lavigne, J. P. Liautard, M. Ramuz, and D. O'Callaghan. 2002. Type IV secretion and *Brucella* virulence. Vet Microbiol **90:**341-8.

Bouchon, D., T. Rigaud, and P. Juchault. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc R Soc Lond B Biol Sci **265:**1081-90.

Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango, and C. Savakis. 1994. A prokaryotic *dnaA* sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. Insect Mol Biol **3:**131-42.

Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. Genetics **144:**1063-73.

Bourtzis, K., and S. O'Neil. 1998. *Wolbachia* infections and their influence on arthropod reproduction. Bioscience **48:**287-93.

Bourtzis, K., S. L. Dobson, H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. Nature **391:**852-3.

Bourtzis, K., and H. R. Braig. 1999. The many faces of *Wolbachia*, p. 199-219. *In* D. Raoult and P. Brouqui (ed.), Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millenium. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Bourtzis, K., H. R. Braig, and T. L. Karr. 2003. Cytoplasmic Incompatibilty, p. 217-46. *In* K. Bourtzis and T. A. Miller (ed.), Insect symbiosis. CRC Press, Florida.

Braig, H. R., W. Zhou, S. L. Dobson, and S. L. O'Neill. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Bacteriol **180:**2373-8.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Brattig, N. W., U. Rathjens, M. Ernst, F. Geisinger, A. Renz, and F. W. Tischendorf. 2000. Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. Microbes Infect **2:**1147-57.

Breeuwer, J. A., and J. H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. Nature **346:**558-60.

Brownstein, J. S., E. Hett, and S. L. O'Neill. 2003. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. J Invertebr Pathol **84:**24-9.

Bull, J. J., I. J. Molineux, and W. R. Rice. 1991. Selection of benevolence in host-parasite system. Evolution **45:**875-82.

Byers, J. R., and A. Wilkes. 1970. A rickettsialike microorganism in *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Hymenoptera, Eulophidae): observations on its occurrence and ultrastructure. Can. J. Zool. **48:**959-64.

C

Cairns, J. 1963. The chromosome of *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **28:**43-46.

Callaini, G., R. Dallai, and M. G. Riparbelli. 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. J Cell Sci **110 (Pt 2):**271-80.

Canard, B., B. Saint-Joanis, and S.T. Cole. 1992. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol. **6:**1421-1429

Capela, D., F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe, F. Ampe, J. Batut, P. Boistard, A. Becker, M. Boutry, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, D. Kahn, E. Kiss, V. Lelaure, D. Masuy, T. Pohl, D. Portetelle, A. Puhler, B. Purnelle, U. Ramsperger, C. Renard, P. Thebault, M. Vandenbol, S. Weidner, and F. Galibert. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**9877-82.

Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1996. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A **93:**14648-53.

Charles, H., and H. Ishikawa. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. J Mol Evol **48:**142-50.

Charniaux-Cotton, H. 1954. Découverte chez un crustacé (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires mâles. C. R. Acad. Sc. Paris **239:**780-2.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Charniaux-Cotton, H. 1960. Sex determination, p. 441-7. *In* T. H. Waterman (ed.), The physiology of Crustacea, vol. 1. Academic Press, New York.

Charniaux-Cotton, H., G. G. Payen, and T. Ginsburger-Vogel. 1992. Arthropoda-Crustacea: Sexual differentiation, p. 281-323. *In* K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi (ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, vol. 5. Wiley, Chichester New York.

Christie, P. J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. J Bacteriol **179:**3085-94.

Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Mol Microbiol **40:**294-305.

Christie, P. J., J. E. Ward, Jr., M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1989. A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. Proc Natl Acad Sci U S A **86:**9677-81.

Christie, P. J., and A. Covacci. 2000. Bacterial type IV secretion system: DNA conjugation machines adapted for export virulence factors., p. 265-73. *In* P. Cossart, P. Boquet, S. Normak, and R. Rappuoli (ed.), Cellular microbiology. ASM Press, Washington DC.

Christie, P. J., and J. P. Vogel. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol **8:**354-60.

Cole, S.T., and I. Saint Girons. 1994. Bacterial genomics. FEMS Microbiol. Rev. **14:**139-160.

Combes, C. 2001. Les associations du vivant, Paris, Ed. Flammarion.

Cossart, P., P. Boquet, S. Normark, and R. Rappuoli. 1996. Cellular microbiology emerging. Science **271:**315-6.

Covacci, A., and R. Rappuoli. 1993. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. Mol Microbiol **8:**429-34.

Covacci, A., S. Falkow, D. E. Berg, and R. Rappuoli. 1997. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? Trends Microbiol **5:**205-8.

Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science **284:**1328-33.

Cullum, J., F. Flett, B. Gravius, D. Hranueli, K. Miyashita, J. Pigac, U. Rauland, and M. Redenbach. 1991. Analysis of amplifications and deletions in *Streptomyces* species. In: S. Baumberg et al. (eds), Genetics and products formation in *Streptomyces*, pp. 265-272. Plenum Press, New York.

D

Davidson, B.E., J. MacDougall, and I. Saint Girons. 1992. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. J. Bacteriol. **174:**3766-3774.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Dedeine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg, and M. Bouletreau. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**6247-52.

DeLoney, C. R., T. M. Bartley, and K. L. Visick. 2002. Role for phosphoglucomutase in *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* symbiosis. J Bacteriol **184:**5121-9.

Ding, Z., K. Atmakuri, and P. J. Christie. 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. Trends Microbiol **11:**527-35.

Dobson, S. L., E. J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, and S. L. O'Neill. 2002. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the *in vitro* establishment of infections. Appl Environ Microbiol **68:**656-60.

Dyson, E. A., M. K. Kamath, and G. D. Hurst. 2002. *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. Heredity **88:**166-71.

E

Ely, B., and C. J. Gerardot. 1988. Use of pulsed-field-gradient gel electrophoresis to construct a physical map of the *Caulobacter crescentus* genome. Gene **68:**323-33.

Ely, B., T. W. Ely, C. J. Gerardot, and A. Dingwall. 1990. Circularity of the *Caulobacter crescentus* chromosome determined by pulsed-field gel electrophoresis. J Bacteriol **172:**1262-6.

Eremeeva, M. E., V. Roux, and D. Raoult. 1993. Determination of genome size and restriction pattern polymorphism of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi* by pulsed field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett **112:**105-12.

F

Fan, J., Y. H. Li, M. M. Wojnar, and C. H. Lang. 1996. Endotoxin-induced alterations in insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and MAP kinase in skeletal muscle. Shock **6:**164-70.

Feinberg, A. P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem **132:**6-13.

Fenollar, F., B. La Scola, H. Inokuma, J. S. Dumler, M. J. Taylor, and D. Raoult. 2003. Culture and phenotypic characterization of a *Wolbachia pipientis* isolate. J Clin Microbiol **41:**5434-41.

Ferdows, M. S., and A. G. Barbour. 1989. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Proc Natl Acad Sci U S A **86:**5969-73.

Fialho, R. F., and L. Stevens. 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. Proc R Soc Lond B Biol Sci **267:**1469-73.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Fonstein, M., and R. Haselkorn. 1993. Chromosomal structure of *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003: cosmid encyclopedia and high-resolution physical and genetic map. Proc Natl Acad Sci U S A **90:**2522-6.

Foulongne, V., G. Bourg, C. Cazevieille, S. Michaux-Charachon, and D. O'Callaghan. 2000. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. Infect Immun **68:**1297-303.

Fu, Y., and J. E. Galan. 1998. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. Mol Microbiol **27:**359-68.

G

Galan, J. E., and D. Zhou. 2000. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**8754-61.

Giordano, R., J. J. Jackson, and H. M. Robertson. 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**11439-44.

Girin, C., and M. Boulétreau. 1995. Microorganism-associated variations in host infestation efficiency in a parasitoid wasp *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Experientia **51:**398-402.

Goodner, B., G. Hinkle, S. Gattung, N. Miller, M. Blanchard, B. Qurollo, B. S. Goldman, Y. Cao, M. Askenazi, C. Halling, L. Mullin, K. Houmiel, J. Gordon, M. Vaudin, O. Iartchouk, A. Epp, F. Liu, C. Wollam, M. Allinger, D. Doughty, C. Scott, C. Lappas, B. Markelz, C. Flanagan, C. Crowell, J. Gurson, C. Lomo, C. Sear, G. Strub, C. Cielo, and S. Slater. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science **294:**2323-8.

Graf, F. 1978. Les sources de calcium pour les crustacés venant de muer. Arch. Zool. Exp. Gén. **119:**143-61.

Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford, and E. Lanka. 2000. Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. J Bacteriol **182:**1564-74.

Grève, P., O. Sorokine, T. Berges, C. Lacombe, A. Van Dorsselaer, and G. Martin. 1999. Isolation and amino acid sequence of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). Gen Comp Endocrinol **115:**406-14.

H

Harris, H. L., and H. R. Braig. 2003. Sperm chromatin remodelling and *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. Biochem Cell Biol **81:**229-40.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Hasegawa, H., E. Hirose, and Y. Katakura. 1993. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. Am. Zool. **33:**403-11.

Heeley, W. 1941. Observations on the life histories of some terrestrial isopods. Proc. Zool. Soc. London B **11:**79-149.

Hertig, M., and S. B. Wolbach. 1924. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. J. Med. Res. **44:**329-74.

Hertig, M. 1936. The rickettsia. *Wolbachia pipientis* (Gen. et Sp.N.) and associated inclusions in the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology **28:**453-86.

Hille, J., J. van Kan, and R. Schilperoort. 1984. trans-Acting virulence functions of the octopine Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol **158:**754-6.

Hiroki, M., Y. Kato, T. Kamito, and K. Miura. 2002. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). Naturwissenschaften **89:**167-70.

Hobbs, M., and J. S. Mattick. 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. Mol Microbiol **10:**233-43.

Hoffmann, A. A., and M. Turelli. 1988. Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. Genetics **119:**435-44.

Holden, P. R., J. F. Brookfield, and P. Jones. 1993. Cloning and characterization of an ftsZ homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet **240:**213-20.

Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev **62:**379-433.

Huigens, M. E., and R. Stouthamer. 2003. Parthenogenesis Associated with *Wolbachia*, p. 247-66. *In* K. Bourtzis and T. A. Miller (ed.), Insect symbiosis. CRC Press, Boca Raton.

Hurst, G. D. D., T. C. Hammarton, C. Bandi, T. M. O. Majerus, D. Bertrand, and M. E. N. Majerus. 1997. The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. Genet. Res. **70:**1-6.

Hurst, G. D. D., and M. Schilthuizen. 1998. Selfish genetic elements and speciation. Heredity **80:**2-8.

Hurst, G. D. D., F. M. Jiggins, J. H. G. von der Schulenburg, D. Bertrand, S. A. West, I. I. Goriacheva, I. A. Zakharov, J. H. Werren, R. Stouthamer, and M. E. N. Majerus. 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. Proc. R. Soc. Lond. B **266:**735-740.

Hurst, G. D., A. P. Johnson, J. H. Schulenburg, and Y. Fuyama. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. Genetics **156:**699-709.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Huynen, M. A., and P. Bork. 1998. Measuring genome evolution. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**5849-56.

I

Isberg, R. R., and P. Barnes. 2001. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. J Cell Sci **114:**21-28.

J

Jassem, W., P. Juchault, and J. Mocquard. 1982. Déterminisme de la reproduction saisonnière des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode, Oniscoide). Rôle du mâle dans le cycle de reproduction des femelles (induction et durée de la période de reproduction). Anni. Sci. Nat. Zool. **4:**195-201.

Jiggins, F. M., G. D. Hurst, and M. E. Majerus. 1998. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. Heredity **81:**87-91.

Jiggins, F. M., G. D. Hurst, and M. E. Majerus. 2000. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. Proc R Soc Lond B Biol Sci **267:**69-73.

Juchault, P., and J. J. Legrand. 1964. Mise en évidence d'un inducteur sexuel mâle distinct de l'hormone adulte et contribution à l'étude de l'autodifférenciation ovarienne chez l'Oniscoide *Helleria brevicornis*. C. R. Acad. Sc. Paris **258:**2416-19.

Juchault, P. 1966. Contribution à l'étude de la différenciation sexuelle mâle chez les Crustacés Isopodes. Thesis, University of Poitiers.

Juchault, P. 1977. Corrélation entre différenciation sexuelle mâle externe et fonction endo-inhibitrice de la région médiane du protocérébron chez le crustacé *Sphaeroma serratum* Fabr. (Isopoda, Flabellifera). C. R. Acad. Sc. Paris **285:**179-82.

Juchault, P., J. J. Legrand, and J. Mocquard. 1980a. Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs controlant le sexe dans les populations du Crustacé Isopode Terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. I- La population de Niort (Deux-Sèvres). Arch. Zool. Exp. Gén. **121:**3-27.

Juchault, P., G. Martin, and J. J. Legrand. 1980b. Induction par la température d'une physiologie mâle chez les néo-femelles et les intersexués du Crustacé Oniscoide *Armadillidium vulgare* Latr. hébergeant un bactéroide à action féminisante. Int. J. Inv. Reprod. **2:**223-35.

Juchault, P., and J. J. Legrand. 1985. Contribution à l'étude du mécanisme de l'état réfractaire à l'hormone androgène chez les *Armadillidium vulgare* Latr, (crustacé, isopode, oniscoide) hébergeant une bactérie féminisante. Gen Comp Endocrinol **60:**463-7.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Juchault, P., and J. Mocquard. 1988. Effet de la température sur la physiologie sexuelle et le sex ratio des descendances des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscoidea) hébergeant une bactérie féminisante. C. R. Acad. Sc. Paris **306:**321-4.

Juchault, P., M. Frelon, D. Bouchon, and T. Rigaud. 1994. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. C. R. Acad. Sc. Paris **317:**225-30.

Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, D. O'Callaghan, and M. Ramuz. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. Mol Microbiol **27:**99-106.

K

Kageyama, D., G. Nishimura, S. Hoshizaki, and Y. Ishikawa. 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). Heredity **88:**444-9.

Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res **7:**331-8.

Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, and S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res **9:**189-97.

Katakura, Y. 1961. Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. Annotationes Zoologicae Japonenses **34:**60-71.

Katakura, Y. 1984. Sex differentiation and androgenic gland hormone in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Symp. Zool. Soc. London **53:**127-42.

Katakura, Y. 1989. Endocrine and genetic control of sex differenciation in the malacostracan Crustacea. Invertebr. Reprod. Dev. **16:**177-82.

Kellen, W. R., D. F. Hoffmann, and R. A. Kwock. 1981. *Wolbachia* sp. (Rickettsiales: Rickettsiaceae) a symbiont of the almond moth *Ephestia cautella*: ultrastructure and influence on host fertility. J. Invert. Pathol. **37:**273-83.

Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth. 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? Trends Microbiol **10:**269-75.

Kondo, N., N. Nikoh, N. Ijichi, M. Shimada, and T. Fukatsu. 2002. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**14280-5.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Kose, H., and T. L. Karr. 1995. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. Mech Dev **51:**275-88.

Krawiec, S., and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. **54:**502-539.

Krueger, C. M., K. L. Marks, and G. M. Ihler. 1995. Physical map of the *Bartonella bacilliformis* genome. J Bacteriol **177:**7271-4.

L

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680-5.

Langworthy, N. G., A. Renz, U. Mackenstedt, K. Henkle-Duhrsen, M. B. de Bronsvoort, V. N. Tanya, M. J. Donnelly, and A. J. Trees. 2000. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. Proc R Soc Lond B Biol Sci **267:**1063-9.

Lara-Tejero, M., and J. E. Galan. 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. Science **290:**354-7.

Lassy, C. W., and T. L. Karr. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. Mech Dev **57:**47-58.

Leblond, P., M. Redenbach, and J. Cullum. 1993. Physical map of the *Steptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. **175**:3422-3429.

Lederberg, J., and E.L. Tatum. 1946. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **11**:113-114.

Legrand, J. J., and P. Juchault. 1969a. Le determinisme de la monogenie chez les Oniscoides. [Determination of monogeny in Oniscoids]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **268:**1774-7.

Legrand, J. J., and P. Juchault. 1969b. Le déterminisme de l'intersexualité chez les crustacés isopodes terrestres: corrélation entre intersexualité et monogénie. C. R. Acad. Sc. Paris **268:**1647-49.

Legrand, J. J., and P. Juchault. 1970. [Experimental modification of sex ratio in terrestrial crustacea isopoda: induction of thelygeny in *Armadillidium vulgare* Latr]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **207:**706-8.

Legrand, J. J., G. Martin, and J. C. Artaud. 1978. Corrélation entre la présence d'un symbiote bactérien dans les ovocytes de *Porcellio dilatatus petiti*, et la stérilité du croisement *P. d. petiti* mâle x *P. d. dilatatus* femelle. Arch. Inst. Pasteur Tunis **55:**507-14.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Legrand, J. J., and P. Juchault. 1984. Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. Génét. Sél. Evol. **16:**57-84.

Legrand, J. J., P. Juchault, and G. Martin. 1985. Inoculation chez la femelle du Crustacé oniscoide *Porcellio dilatatus dilatatus* Brandt d'une Bactérie symbiote caractéristique de la sous-espèce *P. d. petiti*, et ses conséquences sur l'issue du croisement des deux sous-espèces. C. R. Acad. Sc. Paris **300:**147-50.

Legrand, J. J., and P. Juchault. 1986. Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la spéciation chez les crustacés Oniscoides. Bull. Zool. **53**.

Legrand, J. J., E. Legrand-Hamelin, and P. Juchault. 1987. Sex determination in Crustacea. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. **62:**439-70.

Liu, F., H. A. Fritsche, J. M. Trujillo, and M. L. Samuels. 1982. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 in patients with advanced testicular cancer. Am J Clin Pathol **78:**178-83.

Liu, S.L., and K.E. Sanderson. 1995a. I-*Ceu*I reveals conservation of the genome of independant strains of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **177:**3355-3357.

Liu, S.L., and K.E. Sanderson. 1995b. Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92:**1018-1022.

Lo, N., M. Casiraghi, E. Salati, C. Bazzocchi, and C. Bandi. 2002. How many *wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol **19:**341-6.

Louis, C., and L. Nigro. 1989. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. J. Invert. Pathol. **54:**39-44.

M

Marcadé, I. 1998. Dynamique des populations et diversité génétique de l'ADN mitochondrial chez *Porcellionides pruinosus* (Isopode Terrestre). Thesis, Poitiers, University of Tours.

Martin, G., P. Juchault, and J.-J. Legrand. 1973. Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique de l'oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. C. R. Acad. Sc. Paris **276:**2313-16.

Martin, G., R. Maissiat, P. Juchault, and J. J. Legrand. 1974. Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiotique chez les intersexués (mâles à oostégites) du Crustacé *Ligia oceanica* L. (Isopode, Oniscoide). C R Acad Sci Paris **278:**3375-8.

Martin, G., P. Juchault, O. Sorokine, and A. van Dorsselaer. 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). Gen Comp Endocrinol **80:**349-54.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Martin, G., O. Sorokine, M. Moniatte, and A. Vandorsselaer. 1998. The androgenic hormone of the Crustacean isopod *Armadillidium vulgare*. Trends Comp Endocr Neuro **839:**111-7.

Martin, G., and P. Juchault. 1999. Androgenic hormone specificity in terrestrial isopods (Crustacea, Oniscidea): Systematic involvements. J. Crust. Biol. **19:**175-80.

Martin, G., O. Sorokine, M. Moniatte, P. Bulet, C. Hetru, and A. Van Dorsselaer. 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. Eur J Biochem **262:**727-36.

Masui, S., T. Sasaki, and H. Ishikawa. 1997. *groE*-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. Zoolog Sci **14:**701-6.

Masui, S., S. Kamoda, T. Sasaki, and H. Ishikawa. 2000a. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. J Mol Evol **51:**491-7.

Masui, S., T. Sasaki, and H. Ishikawa. 2000b. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. J Bacteriol **182:**6529-31.

Masui, S., H. Kuroiwa, T. Sasaki, M. Inui, T. Kuroiwa, and H. Ishikawa. 2001. Bacteriophage WO and virus-like particles in *Wolbachia*, an endosymbiont of arthropods. Biochem Biophys Res Commun **283:**1099-104.

McClelland, M., R. Jones, Y. Patel, and M. Nelson. 1987. Restriction endonucleases for pulsed-field mapping of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. **15:**5985-6005.

McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. Proc R Soc Lond B Biol Sci **268:**2565-70.

Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J Bacteriol **174:**1-7.

Merçot, H., and D. Poinsot. 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked and discovered on Mount Kilimanjaro. Nature **391:**853.

Michaux, S., J. Paillisson, M. J. Carles-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent, and M. Ramuz. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. J Bacteriol **175:**701-5.

Min, K. T., and S. Benzer. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**10792-6.

Mocquard, J. P. 1968. Nécessité de la présence de ses déjections pour la croissance de *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacé Isopode Terrestre). C. R. Soc. Biol. **262:**1988-90.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Mocquard, J., P. Juchault, and C. Souty-Grosset. 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). Monitore Zool. Ital. N.S. **4:**455-75.

Moret, Y., P. Juchault, and T. Rigaud. 2001. *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. Heredity **86:**325-32.

N

Navarro, R. E., E. Y. Shim, Y. Kohara, A. Singson, and T. K. Blackwell. 2001. *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. Development **128:**3221-32.

Neyt, C., and G. R. Cornelis. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. Mol Microbiol **33:**971-81.

Nicosia, A., M. Perugini, C. Franzini, M. C. Casagli, M. G. Borri, G. Antoni, M. Almoni, P. Neri, G. Ratti, and R. Rappuoli. 1986. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. Proc Natl Acad Sci U S A **83:**4631-5.

Noda, H. 1984. Cytoplasmic incompatibility in a plant ricehopper. J. Hered. **75:**345-48.

Noda, H., T. Miyoshi, and Y. Koizumi. 2002. *In vitro* cultivation of *Wolbachia* in insect and mammalian cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim **38:**423-7.

O

O'Callaghan, D., C. Cazevieille, A. Allardet-Servent, M. L. Boschiroli, G. Bourg, V. Foulongne, P. Frutos, Y. Kulakov, and M. Ramuz. 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol Microbiol **33:**1210-20.

Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science **287:**1497-500.

Oehler, S., and K. Bourtzis. 2000. First International *Wolbachia* Conference: *Wolbachia* 2000. Symbiosis **29:**151-61.

Ogata, H., S. Audic, P. Renesto-Audiffren, P. E. Fournier, V. Barbe, D. Samson, V. Roux, P. Cossart, J. Weissenbach, J. M. Claverie, and D. Raoult. 2001. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. Science **293:**2093-8.

Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin, and Y. Rikihisa. 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. Infect Immun **70:**2128-38.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Ojaimi, C., B.E. Davidson, I. Saint Girons, and I.G. Old. 1994. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi, B. garinii* and *B. afzelii*. Microbiology **140:**2931-2940.

Okuno, A., H. Katayama, and H. Nagasawa. 2000. Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **126:**397-407.

O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. Colbert, T. L. Karr, and H. M. Robertson. 1992. *16S rRNA* phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Acad Sci U S A **89:**2699-702.

O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann, and J. H. Werren. 1997a. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York.

O'Neill, S. L., M. M. Pettigrew, S. P. Sinkins, H. R. Braig, T. G. Andreadis, and R. B. Tesh. 1997b. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. Insect Mol Biol **6:**33-9.

Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon. 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. Science **285:**1920-3.

P

Perkins, J.D., J.D. Heath, B.R. Sharma, and G.M. Weinstock. 1993 *Xba*I and *Bln*I genomic cleavage maps of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655 and comparative analysis of other strains. J. Mol. Biol. **232**:419-445.

Peterson, S. N., C. C. Bailey, J. S. Jensen, M. B. Borre, E. S. King, K. F. Bott, and C. A. Hutchison, 3rd. 1995. Characterization of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. Proc Natl Acad Sci U S A **92:**11829-33.

Picaud, J. L. 1980. Vitellogenin synthesis by the fat body of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda). International Journal of Invertebrate Reproduction **2:**341-349.

Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. Genetics **150:**227-37.

Porcel, J. M., M. Vives, and A. Esquerda. 2004. Tumor necrosis factor-alpha in pleural fluid: a marker of complicated parapneumonic effusions. Chest **125:**160-4.

Porte, F., J. P. Liautard, and S. Kohler. 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. Infect Immun **67:**4041-7.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Presgraves, D. C. 2000. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. Genetics **154:**771-6.

R

Raimond, R., I. Marcade, D. Bouchon, T. Rigaud, J. P. Bossy, and C. Souty-Grosset. 1999. Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. Genetics **151:**203-10.

Rashkova, S., G. Spudich, and P. J. Christie. 1998. Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. J Bacteriol **179:**583-91.

Redenbach, M., F. Flett, W. Piendl, I. Glocker, U. Rauland, O. Wafzig, R. Kliem, P. Leblond, and J. Cullum. 1993. The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. Mol Gen Genet **241:**255-62.

Ricci, S., R. Rappuoli, and V. Scarlato. 1996. The pertussis toxin liberation genes of *Bordetella pertussis* are transcriptionally linked to the pertussis toxin operon. Infect Immun **64:**1458-60.

Richardson, P. M., W. P. Holmes, and G. B. I. Saul. 1987. The effect of tetracycline on reciprocal cross incompatibility in *Mormoniella* [=*Nasonia*] *vitripennis*. J. Invert. Pathol. **50:**176-83.

Rigaud, T., P. Juchault, and J. Mocquard. 1991a. Experimental study of temperature effects on the sex ratio of broods in terrestrial Crustacea *Armadillidium vulgare* Latr. Possible implications in natural populations. J. Evol. Biol. **4:**603-17.

Rigaud, T., C. Souty-Grosset, R. Raimond, J. Mocquard, and P. Juchault. 1991b. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. Endocytobiosis Cell. Res. **7:**259-73.

Rigaud, T., and F. Rousset. 1996. What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropod interactions? Biodivers. Conserv. **5:**999-1013.

Rigaud, T. 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropods host., p. 81-101. *In* S. L. O'Neill, J. H. Werren, and A. A. Hoffmann (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford.

Rigaud, T. 1999. Further endosymbiont diversity: a tree hiding in the forest? Trends in Ecology and Evolution **14:**212-213.

Rigaud, T., J. Moreau, and P. Juchault. 1999. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. Heredity **83:**469-75.

Rivas, S., S. Bolland, E. Cabezon, F. M. Goni, and F. de la Cruz. 1997. TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. J Biol Chem **272:**25583-90.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault, and M. Solignac. 1992a. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **250:**91-8.

Rousset, F., D. Vauhin, and M. Solignac. 1992b. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation to host mitochondrial type. Proc. R. Soc. Lond. B **247:**163-68.

Rydkina, E., V. Roux, and D. Raoult. 1999. Determination of the genome size of *Ehrlichia* spp., using pulsed field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett **176:**73-8.

S

Sagi, A., E. Snir, and I. Halaila. 1997. Sexual differentiation in decapod Crustaceans: Role of the androgenic gland. Invertebr. Reprod. Dev. **31:**55-61.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scarlato, V., B. Arico, M. Domenighini, and R. Rappuoli. 1993. Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. Bioessays **15:**99-104.

Schilthuizen, M., and E. Gittenberger. 1998. Screening mollusks for *Wolbachia* infection. J Invertebr Pathol **71:**268-70.

Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell **37:**67-75.

Schwartz, J.J., A. Gazumyan, and I. Schwartz. 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. **174:**3757-3765.

Segal, G., M. Purcell, and H. A. Shuman. 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. Proc Natl Acad Sci USA **95:**1669-74.

Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999a. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A **96:**14559-64.

Segal, G., J. J. Russo, and H. A. Shuman. 1999b. Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol **34:**799-809.

Shevchenko, A., S. Sunyaev, A. Loboda, P. Bork, W. Ens, and K. G. Standing. 2001. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. Anal Chem **73:**1917-26.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Sinkins, S. P., C. F. Curtis, and S. L. O'Neill. 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control, p. 155-75. *In* S. L. O'Neill, J. H. Werren, and A. A. Hoffmann (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York.

Smith, P., W. M. Leung-Chiu, R. Montgomery, A. Orsborn, K. Kuznicki, E. Gressman-Coberly, L. Mutapcic, and K. Bennett. 2002. The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. Dev Biol **251:**333-47.

Souty, C. 1984. Contribution à l'étude de la synthèse des constituants du vitellus protéique et de son contrôle humoral chez deux crustacés isopodes *Idothea basteri* Audouin (Valvifère) et *Porcellio dilatatus* Brandt (Oniscoide). Thesis, University of Poitiers.

Steel, C. G. H., and S. E. Campbell. 1977. Storage and translocation of calcium during the moulting cycle in the isopod crustacean *Oniscus asellus*. Am. Zool. **17:**935.

Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci. 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**1263-8.

Stouthamer, R., R. F. Luck, and W. D. Hamilton. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. Proc Natl Acad Sci U S A **87:**2424-7.

Stouthamer, R. 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. Entomophaga **38:**3-6.

Stouthamer, R., J. A. Breeuwert, R. F. Luck, and J. H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. Nature **361:**66-8.

Stouthamer, R., and D. J. Kazmer. 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. Heredity **73:**317-27.

Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis, p. 102-24. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford.

Sun, L. V., A. Babaratsas, C. Savakis, S. L. O'Neill, and K. Bourtzis. 1999. Gene organization of the *dnaA* region of *Wolbachia*. J Bacteriol **181:**4708-10.

Sun, L. V., J. M. Foster, G. Tzertzinis, M. Ono, C. Bandi, B. E. Slatko, and S. L. O'Neill. 2001. Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis. J Bacteriol **183:**2219-25.

Sun, L. V., M. Riegler, and S. O'Neil. 2003. Development of a physical and genetic map of the virulent *Wolbachia* strain *w*MelPop. J Bacteriol **185:**7077-84.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Suwanto, A., and S. Kaplan. 1989a. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. genome: genome size, fragment identification and gene localization. J. Bacteriol. **171:**5840-5849.

Suwanto, A., and S. Kaplan. 1989b. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. genome: presence of two unique circular chromosomes. J. Bacteriol. **171**:5850-5859.

Suzuki, S., and K. Yamasaki. 1991. Sex-reversal of male *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Malacostraca, Crustacea) following andrectomy and partial gonadectomy. Gen Comp Endocrinol **83:**375-8.

Suzuki, S., and K. Yamasaki. 1997. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). Gen Comp Endocrinol **107:**136-46.

T

Taylor, M. J., and A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol Today **15:**437-42.

Tatum, E.L., and J. Lederberg. 1947. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **53**:673-684.

Teyssier, C., H. Marchandin, M. Simeon De Buochberg, M. Ramuz, and E. Jumas-Bilak. 2003. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. J Bacteriol **185:**2901-9.

Tram, U., and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Science **296:**1124-6.

Tummuru, M. K., T. L. Cover, and M. J. Blaser. 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun **61:**1799-809.

U

Ugalde, J. E., C. Czibener, M. F. Feldman, and R. A. Ugalde. 2000. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. Infect Immun **68:**5716-23.

Unlu, M. 1999. Difference gel electrophoresis. Biochem Soc Trans **27:**547-9.

Uttaro, A. D., G. A. Cangelosi, R. A. Geremia, E. W. Nester, and R. A. Ugalde. 1990. Biochemical characterization of avirulent exoC mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol **172:**1640-6.

V

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Vandel, A. 1941. Recherches sur la génétique et la sexualité des isopodes terrestres. VI: Les phénomènes de monogénie chez les Oniscoides. Bull. Biol. Fr. Bel. **75:**316-63.

Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis. 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. Genetics **164:**545-52.

Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg. 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. Science **279:**873-6.

W

Wandersman, C. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, p. 955-66. *In* C. Neidhardt (ed.), Secretion across the bacterial outer membrane. ASM Press, Washington.

Weeks, A. R., and J. A. Breeuwer. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. Proc R Soc Lond B Biol Sci **268:**2245-51.

Weeks, A. R., F. Marec, and J. A. Breeuwer. 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. Science **292:**2479-82.

Weiss, A. A., F. D. Johnson, and D. L. Burns. 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A **90:**2970-4.

Wenseleers, T., F. Ito, S. Van Borm, R. Huybrechts, F. Volckaert, and J. Billen. 1998. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. Proc R Soc Lond B Biol Sci **265:**1447-52.

Wernegreen, J. J., H. Ochman, I. B. Jones, and N. A. Moran. 2000. Decoupling of genome size and sequence divergence in a symbiotic bacterium. J Bacteriol **182:**3867-9.

Werren, J. H., D. Windsor, and L. R. Guo. 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B **262:**197-204.

Werren, J. H., W. Zhang, and L. R. Guo. 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proc R Soc Lond B Biol Sci **261:**55-63.

Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. Annu. Rev. Entomol. **42:**587-609.

Winans, S. C., D. L. Burns, and P. J. Christie. 1996. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. Trends Microbiol **4:**64-8.

Wollman, E.L., F. Jacob, and W. Hayes. 1956. Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol**. 21:**141-162.

Wright, J. D. 1979. The etiology and biology of cytoplasmic incompatibility in the *Aedes scutellaris* group. Thesis. California, Los Angeles.

Y

Yen, J. H., and A. R. Barr. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature **232:**657-8.

Z

Zaffran, S., A. Chartier, P. Gallant, M. Astier, N. Arquier, D. Doherty, D. Gratecos, and M. Semeriva. 1998. A *Drosophila* RNA helicase gene, *pitchoune,* is required for cell growth and proliferation and is a potential target of d-Myc. Development **125:**3571-84.

Zambryski, P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. Annu Rev Genet **22:**1-30.

Zchori-Fein, E., R. T. Roush, and D. Rosen. 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymentoptera: Aphelinidae). Curr Microbiol **36:**1-8.

Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc R Soc Lond B Biol Sci **265:**509-15.

Zhu, J., P. M. Oger, B. Schrammeijer, P. J. Hooykaas, S. K. Farrand, and S. C. Winans. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. J Bacteriol **182:**3885-95.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ANNEXES

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for a type IV secretion machinery in feminizing intracellular symbiont *Wolbachia*

CHRISTINE FELIX[1], PIERRE GREVE[1]*, CHRISTINE BRAQUART-VARNIER[1], HENK BRAIG[2], GILBERT MARTIN[1]*

[1]:Université de Poitiers, Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, 40 avenue du recteur Pineau, F-86022 Poitiers Cedex, France

[2]: University of Wales Bangor, School of Biological Sciences, Deiniol Road, LL57 2UW Bangor, UK.

*corresponding authors. Mailing address: Université de Poitiers, Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, 40 avenue du recteur Pineau, F-86022 Poitiers Cedex, France. Phone: +33 5 49 45 39 59. Fax: +33 5 49 45 40 15. E-mail: gilbert.martin@univ-poitiers.fr; pierre.greve@univ-poitiers.fr

Running title: Type IV secretion system in feminizing *Wolbachia*

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ABSTRACT

Wolbachia are maternally inherited α-proteobacteria that induce a variety of reproductive alterations in a wide range of arthropods and some nematodes. In most terrestrial crustacean isopods, including *Armadillidium vulgare*, *Wolbachia* cause feminization. Cytoplasmic incompatibility (CI) has been also described in two species. We identified and characterized two clusters of *vir* genes for a type IV secretion machinery at two separate loci in *Wolbachia* harboured by *A. vulgare* (*w*Vul). The first one was composed of five tandem genes (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4*), located downstream from a Ser/Thr protein *phosphatase* gene and a *ribA* gene, and the second one was composed of three tandem genes (*virB3*, *virB4* and *virB6*). We also successfully amplified DNA fragments corresponding to the two gene clusters in two other feminizing *Wolbachia* harboured by *Oniscus asellus* and *Porcellionides pruinosus*, and in a CI *Wolbachia* harboured by *Porcellio dilatatus petiti*. These observations suggested that genetic loci of the *virB* and *virD* genes were conserved among *Wolbachia* strains. We showed by RT-PCR that *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4* genes were cotranscribed as an operon in *A. vulgare* ovaries, as well as *virB3*, *virB4* and *virB6* genes. The Ser/Thr protein *phosphatase* and *ribA* genes were independently transcribed from the *virB8-virD4* operon, the promoters of which was suspected to be localized within the intergenic space between *ribA* and *virB8* genes. The localization of the *virB* and *virD* genes in two separate loci suggested that two conditions must be fulfilled to trigger the complete T4SS assembly.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

INTRODUCTION

Bacteria belonging to the *Wolbachia* genus have been recognized to infect a wide range of arthropods (O'Neill et al., 1997; Dobson et al., 2002) and some nematodes (Bandi et al., 1998). *Wolbachia* is an intracellular bacterium that is almost exclusively maternally inherited and remains uncultivable until now. This Gram-negative bacterium belongs to the group of α-proteobacteria, and its closest known relative groups are Rickettsia-like bacteria.

Wolbachia are able to invade and maintain itself in numerous arthropod host species by inducing a variety of reproductive alterations including male feminization in isopod crustacean species (Martin et al., 1973; Rigaud et al., 1997), parthenogenetic development in wasps or mites (Stouthamer, 1997; Weeks et al., 2001), male-killing in insect species (Jiggins et al., 1998; Hurst et al., 1999) and cytoplasmic incompatibility (CI) in isopod or insect species (Legrand et al., 1978; Moret et al., 2001; Hoffmann and Turelli, 1997). Nothing is known about bacterial and host genes involved in the induction of these reproductive alterations, and molecular mechanisms have not been yet elucidated. Feminization is a phenomenon whereby infected genetic males are converted into functional females by inhibition of the androgenic gland development (Martin et al., 1990; 1999), which normally differentiates at stage 6 of the development of genetic males (Juchault, 1966; Suzuki and Yamasaki, 1997). Since *Wolbachia* is exclusively localized in host cell cytoplasm, it is believed that the bacterium secretes some macromolecules in order to reverse sexual differentiation. Many Gram-negative bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens* (Christie, 1997; Ward et al., 2002) and *Bordetella pertussis* (Weiss et al., 1993) use type IV secretion system (T4SS) to deliver virulence factors in cytoplasm of host cells. T4SS have been previously found in *Rickettsia prowazekii* (Andersson et al., 1998) and characterized in Rickettsia-like bacteria such as *Anaplasma phagocytophila* and *Ehrlichia chaffeensis*, where eight *virB* and *virD* genes where clustered at two separate loci and polycistronically

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

transcribed (Ohashi et al., 2002). Furthermore, five genes coding for the type IV secretion system (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4*) were identified in *w*Tai and in *w*KueYO, which are *Wolbachia* symbionts of respectively the Taiwan cricket and the Mediterranean flour moth (Masui et al., 2000). These genes were also cotranscribed as an operon. In this study, we first checked the presence of the type IV secretion system in three feminizing *Wolbachia*, *w*Vul, *w*Ase and *w*Pru harboured respectively by *Armadillidium vulgare*, *Oniscus asellus* and *Porcellionides pruinosus*, and in a CI *Wolbachia*, *w*Pet harboured by *Porcellio dilatatus petiti* (Martin et al., 1973; Juchault et al., 1994; Rigaud et al., 1999; Legrand et al., 1978). We then identified and characterized in *w*Vul two clusters of *vir* genes for a type IV secretion machinery at two separate loci (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4; virB3*, *virB4* and *virB6*). We also showed by RT-PCR that *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4* genes were cotranscribed as an operon in *A. vulgare* ovaries, as well as *virB3*, *virB4* and *virB6* genes. The localization of the *virB* and *virD* genes in two separate loci suggested that two conditions must be fulfilled to trigger the complete T4SS assembly.

MATERIALS AND METHODS

***Wolbachia* strains**. Terrestrial isopods *Armadillidium vulgare*, *Oniscus asellus*, *Porcellio dilatatus petiti*, *Porcellionides pruinosus* were reared in the laboratory at 20°C, on moistened soil with dead leaves and carrots as food. *Wolbachia* infection was checked by PCR using *wsp* specific primers (Braig et al., 1998).

***Wolbachia* purification from ovaries**. Ovaries from infected females were dissected in PBS (137 mM NaCl, 7.8 mM Na_2HPO_4, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4, pH 7.4), containing 5 mM of L-glutamine and 0.25 M of sucrose. Ovaries were then homogenized in the same buffer and cells were disrupted at 4°C in a Potter homogenizer (Teflon/glass, tight piston).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Homogenate was centrifuged at 200 x *g* (4 times) for 10 min at 4°C in order to pellet host nuclei. The supernatant containing the bacteria was collected and centrifuged at 4 100 x *g* for 15 min at 4°C. The bacteria-enriched pellet was then treated for DNA or RNA extraction.

Amplification of *vir* genes. The PCR reactions were performed in 25 µl reaction volume containing 500 ng of template, 10 picomoles of each primer, 1X LA PCR™ Buffer II, 2.5 mM of each dNTP and 2.5 U of TaKaRa LA Taq™ (TaKaRa). The thermal program was 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min per kb, and 72°C for 5 min as a final extension after the last cycle. Electrophoresis of 10 µl of the PCR reaction was performed in a 1.5% agarose gel to determine the size of the amplified DNA.

Sequencing of the genes coding for a type IV secretion machinery in *Wolbachia*. We designed primers based on the conserved sequences of *vir* genes between *A. phagocytophila*, *E. chaffeensis*, *w*Tai, *w*KueYO and *w*Mel (*Wolbachia* symbiont of *Drosophila melanogaster*) (table 1). DNA fragments containing *vir* genes were amplified from *w*Vul DNA and sequenced by a dideoxy termination method using the kit "ABI PRISM™" (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instruction, and using the Walking chromosome method for long fragments. The *virB8-D4* operon was sequenced by the ESGS Company and the *virB3-B6* operon was sequenced by the QIAGEN Company.

RNA Isolation and Transcriptional analysis. Total RNA was isolated from the *Wolbachia*-enriched pellet. After a lysozyme treatment (400 µg/ml) in TE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) for 5min at room temperature, RNA extraction was performed with the RNeasy Mini kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen, Valencia, Calif.) using 40 U of

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ribonuclease inhibitor (Sigma). After a 10 min DNAse treatment (RQ1 RNAse-free DNAse, Promega, 2 U), 5 µg of total RNA was reverse transcribed by using a Thermotranscript Kit (Invitrogen-Life Technologies) with random hexamer primers at 25°C for 10 min and at 50°C for 1h. Total RNA from hemocytes of infected animals was extracted by the RNeasy Mini kit and treated as described above before reverse transcription. The PCR conditions were 35 cycles consisting of 1 min of denaturation at 95°C, 1 min of annealing at 55°C, and 5 min of extension at 72°C. All the primers used for RT-PCRs are given in Table 1.

Genomic Southern blot analysis. Genomic DNA extracted from the *Wolbachia*-enriched pellet (20 µg) was digested with restriction endonucleases, electrophoresed, and Southern blotted. The 4.67 kb *virB8-virD4* (virB8-1F/virD4R) and the 4.57 kb *virB3-virB6* (virB3-F/virB6-R) PCR fragments were labelled with [α-^{32}P]dCTP by the random primer method (Feinberg and Vogelstein, 1983) and hybridized to nylon membranes. Hybridized blots were imaged and analyzed using a phosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.).

Sequence analysis. A database search was carried out with the BLAST program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Protein localization site and signal sequence were analyzed with the PSORT program (http://psort.nibb.ac.jp). Multiple alignments were done using the CLUSTALW (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustlw-in.pl). and multalin (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)

Nucleotide sequence accession number. Sequence data for the *virB* and *virD* genes of *Wolbachia* determined in the present study were submitted to GenBank and assigned GenBank accession numbers XXXXXX (*phophatase-virD4*, *w*Vul), XXXXXX (*virB3-virB6*, *w*Vul). XXXXXX (*virD4*, *w*Ase). XXXXXX (*virD4*, *w*Pet). XXXXXX (*virD4*, *w*Pru).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

RESULTS

***VirD4* gene identification.** Based on conserved sequences of *virD4* gene of different *Wolbachia* strains (*w*Tai, *w*KueYO, *w*Mel), we designed two primers, VirD4F and VirD4R, located in the 5' coding region of the *virD4* gene (Table 1). PCR were performed on genomic DNA extracted from *A. vulgare* ovaries of infected and uninfected females and from male testis. A 382 bp fragment was only amplified from DNA of infected ovaries (Fig. 1a). No amplicon was detected neither from DNA of uninfected ovaries nor from DNA of testis, indicating that the *virD4* gene is localized in the *w*Vul genome.

We tested the presence of this *virD4* gene in two other feminizing *Wolbachia*, *w*Ase and *w*Pru, and in a CI *Wolbachia*, *w*Pet, where males and females of these species are infected. As illustrated (Fig. 1a), a 382 bp PCR fragment was observed in lanes with samples from both infected males and females. PCR fragments detected in each strain were sequenced and compared to each other and with the one of *w*Tai, *w*KueYO and *w*Mel (Fig. 2). Sequence alignments showed high conservation between the different *Wolbachia* strains (from 91% to 100% in nucleotidic sequences and from 95% to 100% in amino acid sequences (Fig. 1a).

Gene organisation of *virB* and *virD* regions in *w*Vul genome. Using two sets of primers (RibAF/VirD4R; VirB3/VirB6), we successfully amplified DNA fragments corresponding to two gene clusters. The first one, named *virB8-D4* operon, was composed of five tandem genes (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4*), and the second one, named *virB3-B6* operon, was composed of three tandem genes (*virB3*, *virB4* and *virB6*) (Fig. 3). The gene organisation of the *virB* and *virD* regions in two separate loci was similar to the corresponding region of the type IV secretion system in *A. phagocytophila* and *E. chaffeensis* (Ohashi et al., 2002). The *virB3-B6* cluster is for the first time highlighted in a *Wolbachia* strain. Orthologous genes to *virB1*, *virB2*, *virB5* and *virB7* of *A. tumefaciens* were not found in these two *w*Vul loci. Long

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Range PCR and Southern blot analysis supported that these two loci were not contiguous on the *w*Vul genome (Fig 1 and 4). Moreover, the blot result showed the absence of *vir* paralogs in the *w*Vul genome (Fig. 4). Identical results were found with other *Wolbachia* strains tested, using Long Range PCR (Fig. 1) or Southern blot hybridization (Fig. 4). In *w*Pru, the *virB8-D4* operon should have a NcoI or a BstXI restriction site since two bands of 2.2 and 2.6 kb have been observed instead of a single 4.8 kb band as determined for other strains (Fig. 4). These observations suggested that genetic loci of the *virB* and *virD* genes were conserved among *Wolbachia* strains. The Southern blot also revealed the absence of *vir* paralogs in all these four *Wolbachia* strains (Fig. 4).

Two genes were identified upstream the *virB8-D4* operon, the first one, in the opposite orientation, encoding a Ser/Thr protein phosphatase and the second one, ribA, encoding a bifunctional enzyme with the activities of both 3,4-dihydorxy-2-butanone-4-phosphate synthase and GTP cyclohydrolase II, which catalyzes two essential steps in riboflavin biosynthesis (Fig. 3).

Proteins encoded by *virB* and *virD* genes of *w*Vul. The predicted localization of Vir orthologs in *w*Vul deduced from PSORT analysis was identical to that of T-DNA transfer system proteins and their orthologs shown by Christie and Vogel (2000), except for that of VirB3 and VirB11 (Table 2). VirB3 of *w*Vul was predicted to be localized in the inner membrane, like in *E. chaffeesis* and *A. phagocytophila*, and VirB11 was predicted to be cytoplasmic whereas the location proposed by Christie for these two proteins was respectively outer membrane and peripheral inner membrane (Table 2). The PSORT analysis also identified putative N-terminal signal sequences of four proteins: VirB6 and VirB9 have cleavable signal sequences to translocate into the outer membranes and VirB3 and VirD4 have uncleavable signal sequences, probably to anchor and locate in the inner membranes.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

VirB and VirD orthologous proteins of *w*Vul had highest amino acid identities with those of *w*Tai and *w*KueYO, and to a lesser extend with those of *E. chaffeensis*, *A. phagocytophila* and *R. prowazekii*, all these bacteria being obligatory intracellular α-proteobacteria (Table 2). Between *Wolbachia sp*., Vir proteins of *w*Vul were closest to those of *w*Tai than to those of *w*KueYO, except for VirB10. Of all these Gram-negative intracellular bacteria, the more conserved protein was VirB11 which shared from 28.5% identities with *A. tumefaciens* to 93% identities with *w*Tai whereas the more variable protein was VirB10 with identities ranging from 16.9% with *A. tumefaciens* to 80.7 % with *w*KueYO. The VirB10 proteins of *Wolbachia sp*., *E. chaffeensis*, *A. phagocytophila* and *R. prowazekii* (434 to 503 amino acids) were also significantly larger than those of *A. tumefaciens*, *Brucella suis* and *B. pertussis* (374 to 391 amino acids). VirB10 homolog in *Helicobacter pilori*, CagY, has very different propriety. Anyway, the high identity between VirB and VirD proteins of *Wolbachia* sp. suggested a similar function of the T4SS in the different *Wolbachia* strains studied. Moreover, Vir proteins are much better conserved among the group of obligate intracellular bacteria than with the group of facultative intracellular bacteria suggesting that T4SS played different roles in both groups (Ohashi et al., 2002).

Transcription in host oocytes of the clustered *virB* and *virD* genes of *w*Vul. The short intergenic space between the *w*Vul genes within the *virB* and *virD* regions (Fig. 3) suggested that these clustered genes are polycistronically transcribed, as it has been shown for *w*KueYO (Masui et al., 2000) or *A. phagocytophila* and *E. chaffeensis* (Ohashi et al., 2002). We thus examined the expression of *vir* genes in *A. vulgare* ovaries by RT-PCR using overlapping primers (Fig. 5). The sequences and positions of the primers and amplicon sizes are shown in table 1 and figure 3. Genomic DNA controls are shown for each primer pair to demonstrate the specificity of the primer to amplify the target sequence. The absence of RT-PCR product

when reverse transcriptase was omitted, using any of the primer pairs, indicated that the RNA preparation was not contaminated by genomic DNA. As shown in figure 5, a PCR fragment corresponding to each *vir* gene pair was detected (*virB8-virB9*, *virB9-virB10*, *virB10-virB11*, *virB11-virD4*; *virB3-virB4*, *virB4-virB*). These results showed that *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4* genes were cotranscribed as an operon as well as *virB3*, *virB4* and *virB6* genes. We further examined the transcription of *phosphatase*, *ribA*, and two sets of two adjacent genes (*phophatase-ribA*, *ribA-virB8*), including their intergenic spaces. As shown in figure 6, the transcript of *phosphatase* and *ribA* were detected, but two sets of two adjacent genes (*phophatase-ribA*, *ribA-virB8*), including their intergenic spaces, were RT-PCR negative, showing that the *phosphatase* and *ribA* were independently transcribed from the *virB8-virD4* operon. These results suggested also that the promoters for the *virB8-virD4* operon were located within the intergenic space between *ribA* and *virB8* genes. We also examined the expression of *vir* genes in hemocytes from infected *A. vulgare* by RT-PCR but no signal could be observed in this tissue (data not shown).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that *w*Vul possessed eight clustered *virB and virD* genes for the type IV secretion system that were transcriptionally active in *A. vulgare* ovaries. T4SS were ancestrally related to the bacterial conjugal system and were able to deliver effector macromolecules by parasitic or symbiotic bacteria into eukaryotic host cells. In most of other Gram-negative bacteria, including facultative intracellular bacteria, these genes were clustered in one operon. To date, only five *virB and virD* genes were identified in *Wolbachia* and were shown to be polycistronically transcribed (Masui et al., 2000). In *A. phagocytophila* and *E. chaffeensis*, two other obligate intracellular bacteria, the *virB and virD* genes were clustered in two separated loci and polycistronically transcribed (Ohashi et al., 2002). We observed the same gene organization of the *w*Vul T4SS, characterized by two operons, one composed of five tandem genes (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4*) and the other built up of three tandem genes (*virB3*, *virB4* and *virB6*). Southern blot analyses and long range PCR confirmed the localization and separation in two loci in *w*Vul .This conserved T4SS was also found in other woodlouse species expressing feminization (*w*Ase and *w*Pru) or CI (*w*Pet). Furthermore, the very recent access in GenBank database to the complete genome sequence of *Wolbachia* infecting *D. melanogaster* revealed that these two operons were also present in this strain and localized in two loci distant from 288560 bp (Sun et al., 2003). In addition, The organization in two loci seemed to be conserved among *Wolbachia* genus and suggested an independent transcriptional control of distant loci which implied that two conditions must be fulfilled to trigger the complete T4SS assembly. The search for two-component system response regulators (Mekalanos, 1992; O'Callaghan et al., 1999) in *w*Vul failed.

In these obligate intracellular bacteria, four genes orthologous to *virB1*, *virB2*, *virB5* and *virB7* genes of *A. tumefaciens* were not found. These genes were not detected in *A. phagocytophila* and *E. chaffeensis* either. VirB1 of *A. tumefaciens* has a motif found among

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

lytic transglycosylases, and may be involved in the local lysis of the peptdoglycan during transporter assembly (Llosa et al., 2000). It has been shown that this action may be done by VirB8 of *B. pertussis* (Ward et al., 2002), but in *w*Vul, VirB8 did not have any motif of lytic transglycosylase. The number of *VirB4* paralogs seemed to be very variable since *w*Vul or *E. chaffeensis* had a single *virB4* gene, and *R. prowazekii*, *R. conorii*, *A. phagocytophila*, and *w*Mel had an additional *VirB4* paralog (Ogata et al., 2001; Ohashi et al., 2002).

VirB4, VirB6, VirB11 and VirD4 were supposed to form pore structures in the bacterial envelope (Ward et al., 2002), where VirB6 formed the core of the pore and may therefore interact with the substrates transported (Christie, 1997; Ohashi et al., 2002). According to these authors, VirB8 should be implicated in the initial establishment of a T4SS assembly site. Both VirB4 and VirB11 were cytoplasmically exposed and had ATPase activity, which may provide energy for assembly of the T4SS or for effector translocation. VirB4 was the largest of the Vir proteins and had a Walker A nucleoside triphosphate (NTP) binding domain (GTTGAGKT). No RGD cell adhesion motif was found in the VirD4 sequence. VirB4 offered two Walker A and B boxes. Walker box A was essential to the biological activity of the PulE/VirB11 family of potential ATPases involved in various types of transport processes (Rivas et al., 1997). VirB11 of *w*Vul has four conserved motifs: a typical Walker box A containing the P-loop $GX_4GK(S/T)$ of a NTP-binging motif, and an atypical but possible Walker box B, in which the conserved Asp in the motif DhhhhDE (h for hydrophobic residue) (Rivas et al., 1997) was replaced by Gly (Fig. 7). Besides, there was an Asp box (residues 186-197) between the two Walker motifs that should function as a Mg^{2+} binding site (Possot and Pugsley, 1994). And finally, a fourth conserved motif included two His residues (hence its name, His box) whose specific role in the protein was unknown.

Reported experimental evidence suggests that members of the VirB11 family form oligomers (Krause et al., 2000). Negative mutants of *A. tumefaciens* VirB11 indicated that

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

these proteins were functioning as multimers (hexameric rings) and that they were interacting with other components of the secretion machinery (Rashkova et al., 1998). The hexameric rings had two sides with different properties (Krause et al., 2000). These proteins were assumed to form a channel that faces the hydrophilic cytoplasm on one and hydrophobic membrane on the other side. These oligomeric proteins catalyzed successive repetitive steps leading to substrate translocation across the inner membrane. In addition, VirB11 type ATPases functioned as chaperones to facilitate the movement of unfolded proteins or DNA substrates across the cytoplasmic membrane (Sagulenko et al., 2001).

Wolbachia T4SS seemed also (as *Brucella spp* and *B. pertussis*) to lack a T_4CP (relaxase bound at oriT) and therefore might use the general secretory pathway or an another mechanism for early stages of substrate recognition and translocation (Ding et al., 2003). This type of translocation was a dominant virulence mechanism of several important pathogens as *Helicobacter, Legionella, Brucella or Bartonella.*

A *ribA* gene encoded for a bifunctional enzyme that catalyzes two essential steps in riboflavin biosynthesis was located upstream the *virB8* gene in *w*Vul. A *ribA* gene was also localized upstream the *virB8-D4* operon of *E. chaffeensis* and *w*Mel. The intergenic space between *ribA* and *virB8* (72 bp) in *w*Vul was shorter than that in *E. chaffeensis* (134 bp), where putative sequences of promoter regions for *virB8* were found upstream the transcriptional initiation sites. One of them was likely to be located within the 3' coding sequence of the *ribA* gene, suggesting that the expression of *ribA* may influence the transcription of clustered *virB8-virD4* genes (Ohashi et al., 2002).

In conclusion, *w*Vul possessed the minimum components of typical type IV secretion system, consisting of *virB4*, *virB7* (or *virB8*), *virB9*, *virB10*, *virB11* and *virD4* homologs (Winans et al., 1996; Covacci et al., 1999). These two operons appear co-transcribed in oocytes and surprisingly not into hemocytes. We cannot rule out sensitivity problems in our

RT-PCR performed with RNA from cell harbouring few bacteria compared to ovaries. Further works are needed to conclude about this apparent tissue specific expression of T4SS. Anyway, it is likely that the type IV secretion system may be involved in maintenance of *Wolbachia* infection and *Wolbachia*-induced reproductive alterations such as feminization, cytoplasmic incompatibility, male-killing and parthenogenesis, by secreting virulence factors. New approaches like protein interaction maps that have been applied to the genome of *Rickettsia sibirica* (Malek et al., 2004) may be needed to answer these questions and identify these factors.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Acknowledgments:

We are grateful to C. Debenest, C. Delaunay and M. Frelon-Raimond for valuable aid in ovary collecting.

C.F. is recipient of a European postgraduate fellowship. This work was supported by an EEC grant (Euwol,QLRT-2000-01079) and CNRS.

REFERENCES

Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature **396:**133-40.

Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci **265:**2407-13.

Braig, H. R., W. Zhou, S. L. Dobson, and S. L. O'Neill. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Bacteriol **180:**2373-8.

Christie, P. J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. J Bacteriol **179:**3085-94.

Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Mol Microbiol **40:**294-305.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Christie, P. J., and J. P. Vogel. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol **8:**354-60.

Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science **284:**1328-33.

Ding, Z., K. Atmakuri, and P. J. Christie. 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. Trends Microbiol **11:**527-35.

Dobson, S. L., E. J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, and S. L. O'Neill. 2002. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the in vitro establishment of infections. Appl Environ Microbiol **68:**656-60.

Feinberg, A. P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem **132:**6-13.

Hoffmann, A. A., and M. Turelli. 1997. Cytoplasmic incompatibilty in insects, p. 42-80. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford.

Hurst, G. D., C. Bandi, L. Sacchi, A. G. Cochrane, D. Bertrand, I. Karaca, and M. E. Majerus. 1999. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited flavobacteria that kill males only. Parasitology **118 (Pt 2):**125-34.

Jiggins, F. M., G. D. Hurst, and M. E. Majerus. 1998. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. Heredity **81:**87-91.

Juchault, P. 1966. Contribution à l'étude de la différenciation sexuelle mâle chez les Crustacés Isopodes. Poitiers, Thesis.

Juchault, P., M. Frelon, D. Bouchon, and T. Rigaud. 1994. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. C. R. Acad. Sc. Paris **317:**225-30.

Krause, S., M. Barcena, W. Pansegrau, R. Lurz, J. M. Carazo, and E. Lanka. 2000. Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**3067-72.

Legrand, J. J., G. Martin, and J. C. Artaud. 1978. Corrélation entre la présence d'un symbiote bactérien dans les ovocytes de *Porcellio dilatatus petiti*, et la stérilité du croisement *P. d. petiti* mâle x *P. d. dilatatus* femelle. Arch. Inst. Pasteur Tunis **55:**507-14.

Llosa, M., J. Zupan, C. Baron, and P. Zambryski. 2000. The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. J Bacteriol **182:**3437-45.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Malek, J. A., J. M. Wierzbowski, W. Tao, S. A. Bosak, D. J. Saranga, L. Doucette-Stamm, D. R. Smith, P. J. McEwan, and K. J. McKernan. 2004. Protein interaction mapping on a functional shotgun sequence of Rickettsia sibirica. Nucleic Acids Res **32:**1059-64.

Martin, G., P. Juchault, and J.-J. Legrand. 1973. Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique de l'oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. C.R.Acad.Sc.Paris **276:**2313-2316.

Martin, G., P. Juchault, O. Sorokine, and A. van Dorsselaer. 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). Gen Comp Endocrinol **80:**349-54.

Martin, G., O. Sorokine, M. Moniatte, P. Bulet, C. Hetru, and A. Van Dorsselaer. 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. Eur J Biochem **262:**727-36.

Masui, S., T. Sasaki, and H. Ishikawa. 2000. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. J Bacteriol **182:**6529-31.

Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J Bacteriol **174:**1-7.

Moret, Y., P. Juchault, and T. Rigaud. 2001. *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. Heredity **86:**325-32.

O'Callaghan, D., C. Cazevieille, A. Allardet-Servent, M. L. Boschiroli, G. Bourg, V. Foulongne, P. Frutos, Y. Kulakov, and M. Ramuz. 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol Microbiol **33:**1210-20.

Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin, and Y. Rikihisa. 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. Infect Immun **70:**2128-38.

O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann, and J. H. Werren. 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York.

Possot, O., and A. P. Pugsley. 1994. Molecular characterization of PulE, a protein required for pullulanase secretion. Mol Microbiol **12:**287-99.

Rashkova, S., G. Spudich, and P. J. Christie. 1998. Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. J Bacteriol **179:**583-91.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Rigaud, T. 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropods host., p. 81-101. *In* S. L. O'Neill, J. H. Werren, and A. A. Hoffmann (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Rigaud, T., J. Moreau, and P. Juchault. 1999. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. Heredity **83:**469-75.

Rivas, S., S. Bolland, E. Cabezon, F. M. Goni, and F. de la Cruz. 1997. TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. J Biol Chem **272:**25583-90.

Sagulenko, E., V. Sagulenko, J. Chen, and P. J. Christie. 2001. Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. J Bacteriol **183:**5813-25.

Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis, p. 102-24. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren (ed.), Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford.

Suzuki, S., and K. Yamasaki. 1997. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). Gen Comp Endocrinol **107:**136-46.

Ward, D. V., O. Draper, J. R. Zupan, and P. C. Zambryski. 2002. Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**11493-500.

Weeks, A. R., F. Marec, and J. A. Breeuwer. 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. Science **292:**2479-82.

Weiss, A. A., F. D. Johnson, and D. L. Burns. 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A **90:**2970-4.

Winans, S. C., D. L. Burns, and P. J. Christie. 1996. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. Trends Microbiol **4:**64-8.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

FIGURE LEGENDS

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in PCR, RT-PCR and Southern blotting.

TABLE 2. Predicted localization of *w*Vul Vir proteins, amino acids (aa) identities, and amino acid numbers of Vir orthologs of selected gram-negative bacteria compared with those of *w*Vul.

Figure 1: Specific PCR detection of *virB* and *virD* genes.

Detection of *virD4* gene using VirD4F and VirD4R primers **(a)** and *virB3-B6* and *virB8-D4* operons using RibAF/VirD4R and VirB3F/VirB6R primer pairs **(b)** in different *Wolbachia* strains harboured by *A. vulgare* (*w*Vul), *O. asellus* (*w*Ase), *P. pruinosus* (*w*Pru), *P. dilatatus petiti* (*w*Pet). M: DNA size markers.

Figure 2: Alignment of *virD4* gene partial sequences on seven different *Wolbachia* strains (*w*Mel, *w*KueYo, *w*Tai, *w*Pru, *w*Vul, *w*Ase and *w*Pet) by using the multalin program (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html). The following parameters were used: Red nucleotides, 100% conserved; blue nucleotides, > 50% conserved; black nucleotides, < 50% conserved.

Figure 3: Schematic representation of the gene organisation of the *virB* and *virD* regions in *w*Vul. ORFs are represented as open boxes, with arrowheads indicating their orientation. Lines with (non facing) arrows at both ends indicate the RT-PCR regions in the transcriptional analysis. Bent arrows located upstream of *virB3* or *virB8* represent putative

transcriptional promoter regions. Open boxes indicate the DNA probes used for genomic Southern blot analysis.

Figure 4: Genomic Southern blot analyses of the clustered *virB* and *virD* genes (*virB8-D4* and *virB3-B6* operons) in *w*Vul, *w*Pet, *w*Ase and *w*Pru. Panels (a) and (b) show the hybridization pattern with probe A and B, respectively, shown in Fig. 3. Arrows and arrowheads indicate hybridized fragments.

Figure 5: Transcriptional analysis of the clustered *virB* and *virD* genes in *w*Vul oocytes. RT-PCR was used for transcriptional analysis of the genes in the *virB* and *virD* regions. Primers used and their positions are shown in table 1 and Fig. 3. The DNA template control shows the intensity and specificity of the band detected with each pair of primers. RT+ and RT- indicate the presence and absence of reverse transcriptase in the reaction, respectively.

Figure 6: Transcriptional analysis of the *ribA*, *phosphatase* and *virB8* genes and their intergenic spaces in *w*Vul oocytes. Primers used and their positions are shown in table 1 and Fig. 3. DNA represents template control. RT+ and RT- indicate with or without reverse transcriptase.

Figure 7: Alignment of VirB11 family transport NTPases. Amino Acid sequences were aligned by using the EDTALN program (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/edtaln_in.pl) with the following parameters: red background and white letters, 100% conservation; green background and white letters, at least 75% conservation of identical residue; and yellow background, at least 75% conservation of similar residues. The four common motifs are marked by horizontal lines. Accession numbers: 1,TrbB (plasmid RP4),

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

M93696; 2, TrbB (plasmid R751), U67194 ; 3, TrbB (plasmid pTiA6NC), P54907 ; 4, TrbB (*Rhizobium* sp. Plasmid ; NGR234), AE000068 ; 5, VirB11 (*Bordetella pertussis*), F47301 ; 6, VirB11 (*Brucella suis*), AF141604 ; 7, RP292 (*Rickettsia prowazekii*), AJ235271; 8, VirB11 (*Wolbachia*, wVul strain) ; 9, VirB11 (plasmid pTi15955), X06826 ; 10, VirB11 (plasmid pTiC58), PO7169 ; 11, VirB11 (*Rhizobium etli*), AF176227 ; 12, VirB11 (*Bartonella henselae*), AF182718 ; 13, trwD (plasmid R388), X81123; 14, TraG plasmid pKM101), I79275 ; 15, Kbh (*Chlorobium limicula*), U77780 ; 16, HP0525 (*Helicobacter pylori* cag), AE00148 ; 17, VirB11 (*Bacillus anthracis* plasmide pXO1), AF065404.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Target gene	Amplicon	5' primer		3' primer	
	size (bp)	Nucleotide sequences	code	Nucleotide sequences	code
virB3	440	5'-GACCTMCVATGCTBTTTGGTG-3'	VirB3-F*	5'-CCTCRTCATCKGCAGTTTCAAA-3'	VirB3-R*
virB4	1907	5'-TTTGAAACTGCMGATGAYGAGG-3'	VirB4-F*	5'-GCATCCTCAACACTYTGWGTMGC-3'	VirB4-R*
virB6	2356	5'-GCKACWCARAGTGTTGAGGATGC-3'	VirB6-F*	5'-AAASGCAAAAAGKATWACMGGRTA-3'	VirB6-R*
	268	5'-GAATTGATATAGGGTGCACGGAATTG-3'	VirB6-1F	5'-GATTACCAAAAGTCAAAGGATTGCGA-3'	VirB6-1R
phosphatase	693	5'-AAAATTTCATCGGTCCAGCATCTAAG-3'	P3-F	5'-CTAGTTTTCATTTCGTCCATGCAC-3'	P3-R
ribA	1670	5'-CAATGGGACACATGTCATTGTC-3'	RibA-F	5'CAATGCCTCTTCCATCTTGCATC-3'	RibA-1R
	337	5'-GTTATTGCACTGGACACGTCATTC-3'	RibA-1F		
virB8	446	5'-CGCTACAGCACAGTTATTGCTC-3'	VirB8-1F	5'-CTCACTTGAAGAGCATCATTACC-3'	VirB8-1R
virB9	508	5'-GAAGTCAGTAGTCGCACTAACATG-3'	VirB9-1F	5'-CAACTTCACTACCTTCATAACGC-3'	VirB9-1R
virB10	489	5'-GGTGGTAACGGTTGGCTCTAATC-3'	VirB10-1F	5'-GCCTTGTTCTCTCCACTACTACC-3'	VirB10-1R
virB11	484	5'-GGAGCCATTACAAGGGATATTTC-3'	VirB11-F	5'-CTTACCGGTAGAAGTTCCACCAC-3'	VirB11-1R
	342	5'-GGCAGGCTGATTGCTCAAG-3'	VirB11-1F		
virD4	382	5'-CAGAGAAAGACATACGAAAAGCAGG-3'	VirD4-F	5'-CTTGTTCAGGCATGATTAGGTTAGC-3'	VirD4-R
virB3-virB4	440	5'-GACCTMCVATGCTBTTTGGTG-3'	3'virB3-F*	5'-CCTCRTCATCKGCAGTTTCAAA-3'	5'virB4-R*
virB4-virB6	269	5'-CTGGACGTGCAGAAAGTGTTCT-3'	3'virB4-F	5'-CAATCAGGATTAGAGGCACGAC-3'	5'virB6-R
phosphatase-	431	5'-TTTGTGCATGGACGAAATGAAAAC-3'	3'phosph-F	5'-GGCCACTTCTAATTTCGCTGATAGC-3'	5'ribA-R
ribA-virB8	190	5'-CTAGGCCATGGATTAAGGGTTTTTTAG-3'	3'ribA-F	5'-GAGCAATAACTGTGCTGTAGCG-3'	5'virB8-R
virB8-virB9	219	5'-GCATCGCTTGAAATGAATGATCAG-3'	3'virB8-F	5'-CCGTAAATACCTCATTAGGGCT-3'	5'virB9-R
virB9-virB10	199	5'-GCGTTATGAAGGTAGTGAAGTTG-3'	3'virB9-F	5'-CACTCCACCAGCCAGAAGCAC-3'	5'virB10-R
virB10-virB11	231	5'-GATATAGTATTTCCTCCACAGGC-3'	3'virB10-F	5'-CTTGAGCAATCAGCCTGCC-3'	5'virB11-R
virB11-virD4	224	5'-GAACTTGTAGGGGCAGAAGAATC-3'	3'virB11-F	5'-CACACTATCTGGACCGTCAAC-3'	5'virD4-R

*: Sequences of degenerated primers according to IUB codes [International Union of Biochemistry].

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Vir protein	PSORT[a analyses]	Localization[b]	% amino acids identity								
			Wolbachia sp. strain *w* Vul	*Wolbachia sp.* strain *w* Tai	*Wolbachia sp.* strain *w* KueYo	*Ehrlichia chaffeensis*	*Anaplasma phagocytophila*	*Rickettsia prowazekii*	*Bordetella pertussis*	*Brucella suis*	*Agrobacterium tumefaciens*
VirB3	IM	OM	100 (72, partial)	ND	ND	59,7 (97)	54,2 (97)	43,1 (ND[c],95)	15,7 (104)	16,9 (116)	17,6 (108)
VirB4	Cytoplasmic	Integral IM	100 (801)	ND	ND	76,3 (800)	71,1 (801)	58,4 RP103 (805) 26 RP784 (810)	31,7 (824)	31,4 (832)	30,9 (789)
VirB6	IM	Polytopic IM	100 (649, partial)	ND	ND	39,5 (826)	33,7 (486, partial)	17,9 RP104 (1124) 20,7 RP105 (672) 18,3 RP106 (971) 18,4 RP107 (888) 18,1 RP108 (1155)	17,1 (463)	15,8 (347)	16,9 (295)
VirB8	IM	IM	100 (226)	93,6 (226)	88,5 (226)	50,8 (237)	49,1 (234)	19,7 (247) 33,1 RP289 (202)	27 (233)	29,2 (239)	22,4 (237)
VirB9	OM	OM	100 (263)	91,3 (263)	88 (266)	44,4 (273)	43,1 (281)	24,2 (157) 29 RP286 (250)	25,1 (273)	23,3 (289)	21,2 (293)
VirB10	IM	Bltopic IM	100 (493)	73,6 (503)	80,7 (486)	37,5 (447)	37,5 (434)	27,8 (483)	21,1 (374)	20,2 (391)	22,3 (377)
VirB11	Cytoplasmic	Périphéral IM	100 (330)	93 (330)	91,8 (330)	77,4 (330)	72,5 (332)	66,5 (334)	37,6 (339)	31,7 (397)	28,5 (344)
VirD4	IM	Integral IM	100 (143,partial)	95,1 (666)	91,6 (667)	57,2 (714)	55,9 (740)	50,4 (591)	ND	ND	18,3 (668)

[a] Localization of *w*Vul Vir orthologs predicted by the PSORT program. IM, inner membrane; OM, outer membrane.

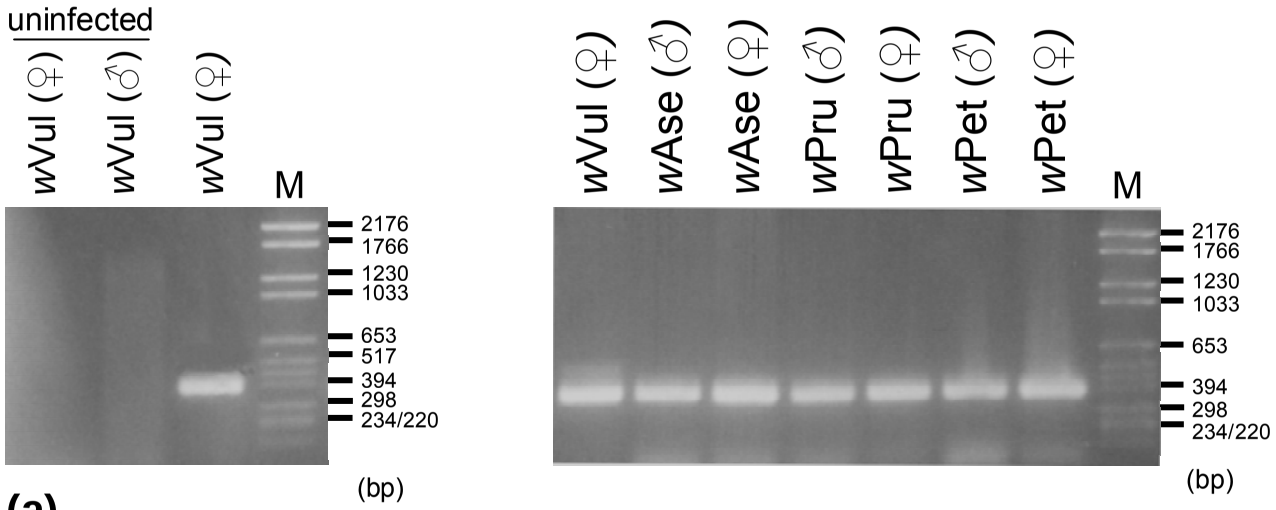
[b] Localization of T-DNA transfer system proteins and their orthologs shown by Christie (2001).

[c] ND, not determined in previous studies.

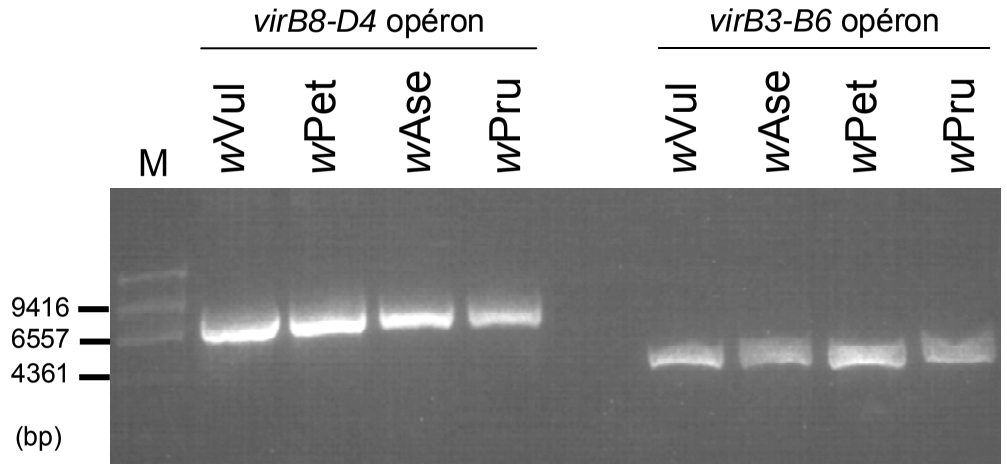
[d] The *VirB3* locus of *R. prowazekii* was found between RP102 and RP103 from the genome sequence (Andersson et al., 1998) by Ohashi et al., 2002.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

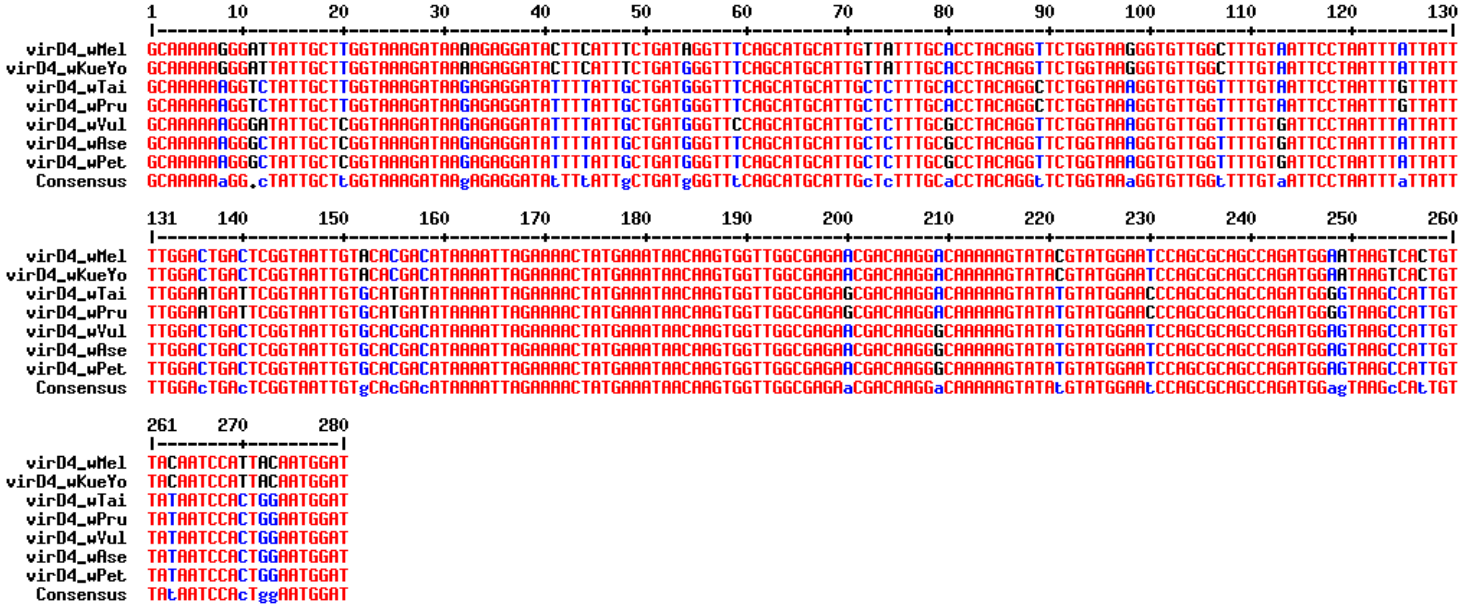


(a)

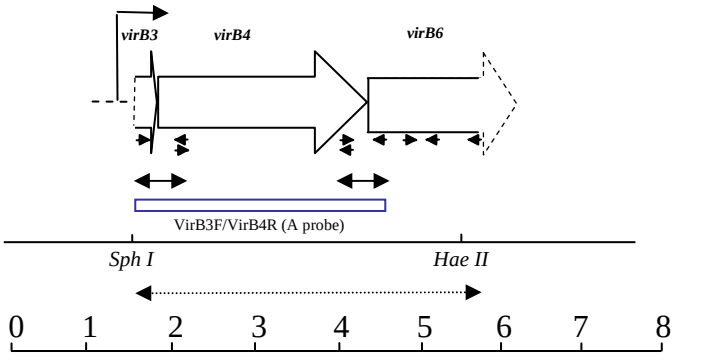


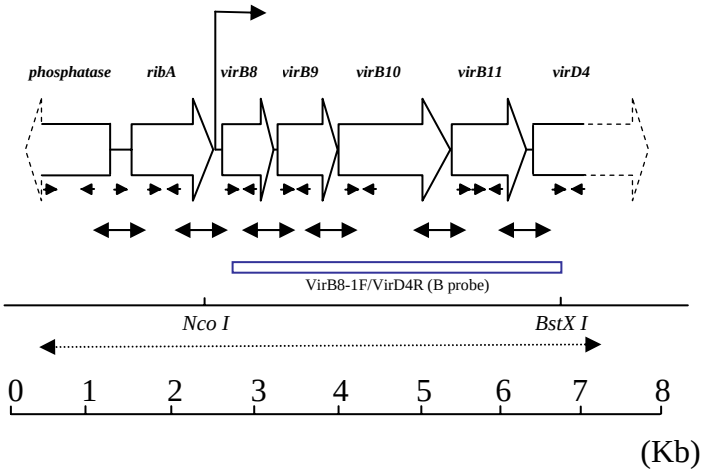
(b)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

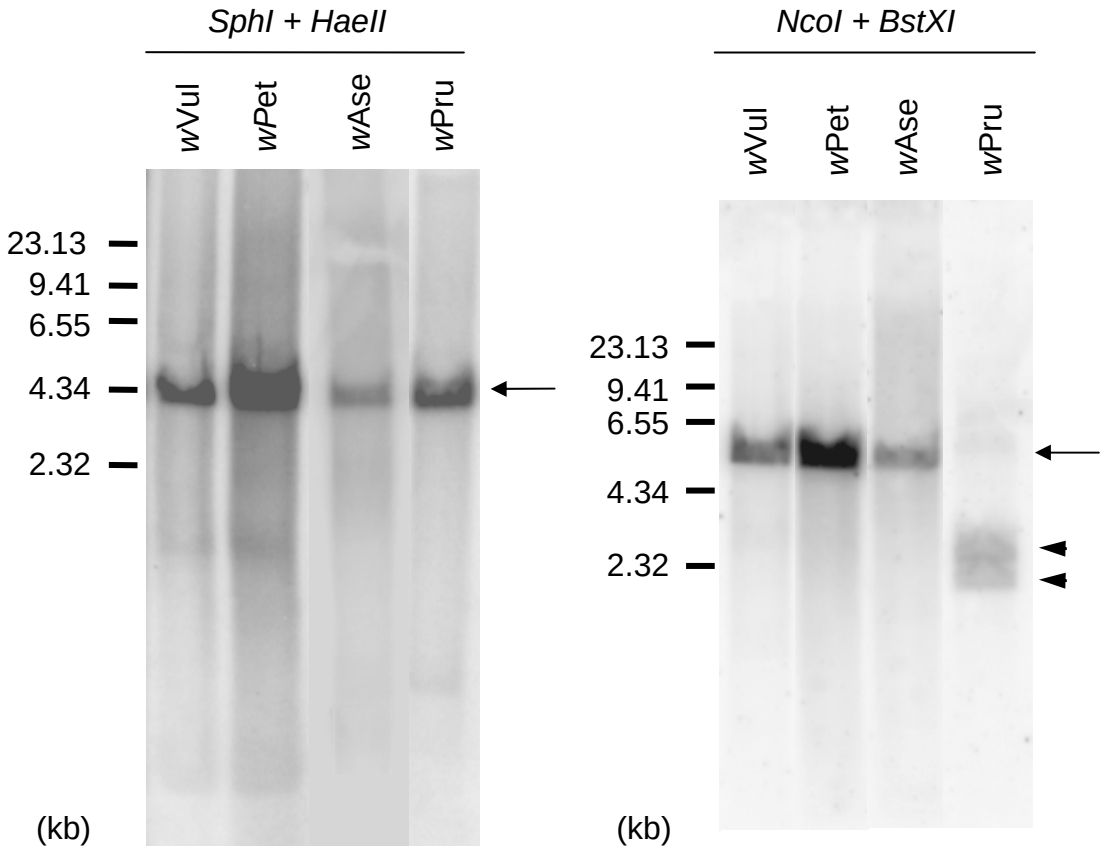




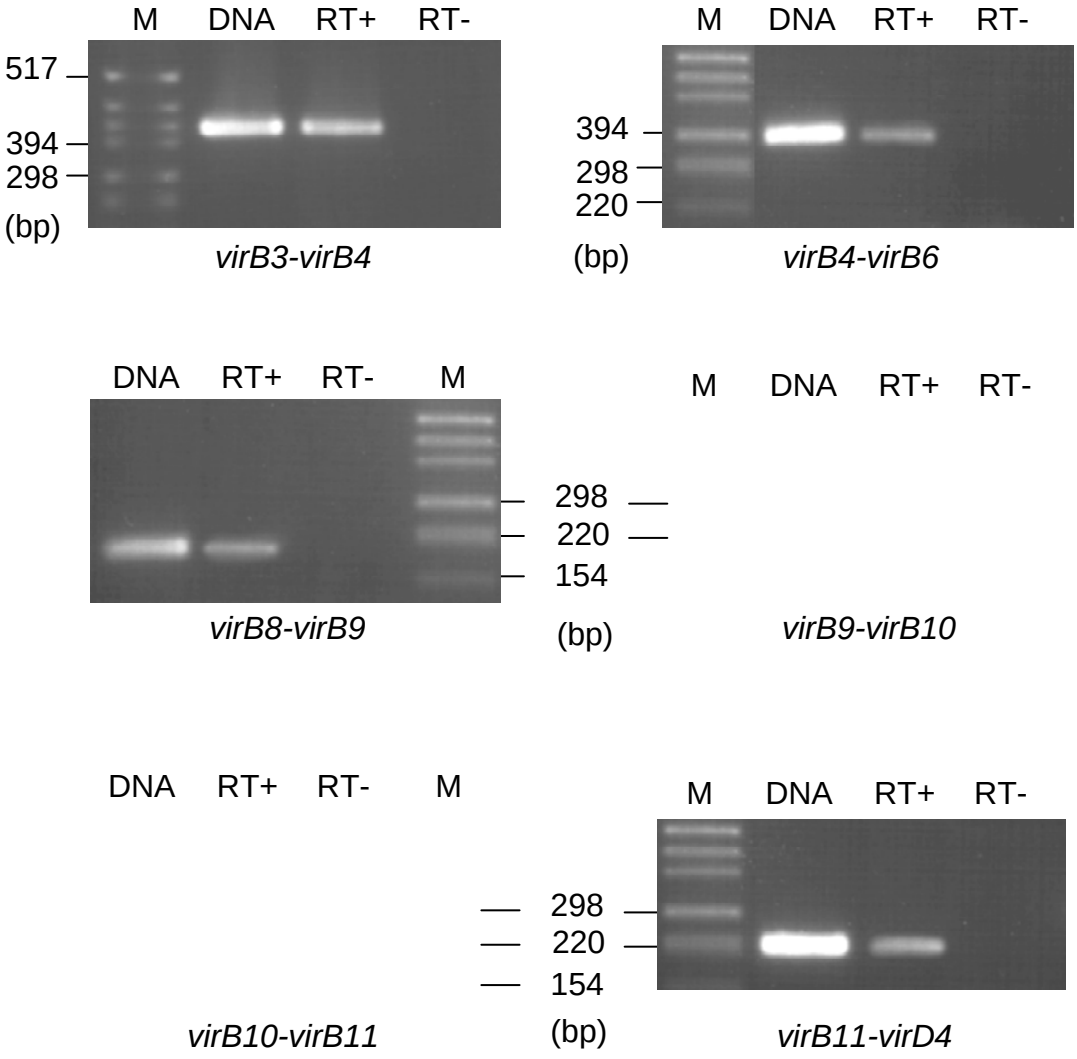

: RT-PCR


: Sequenced regions

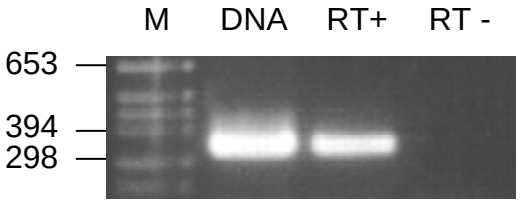
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

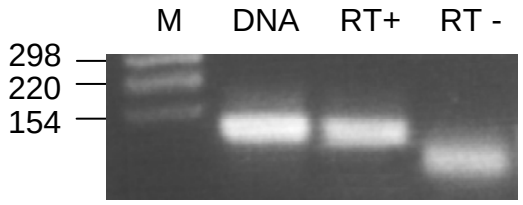


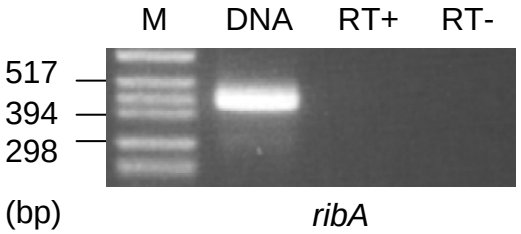
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

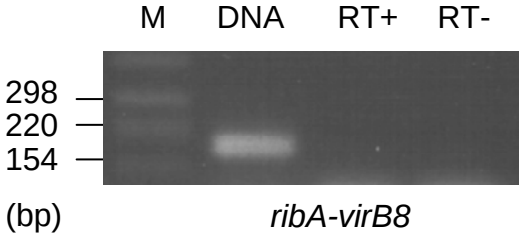


tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

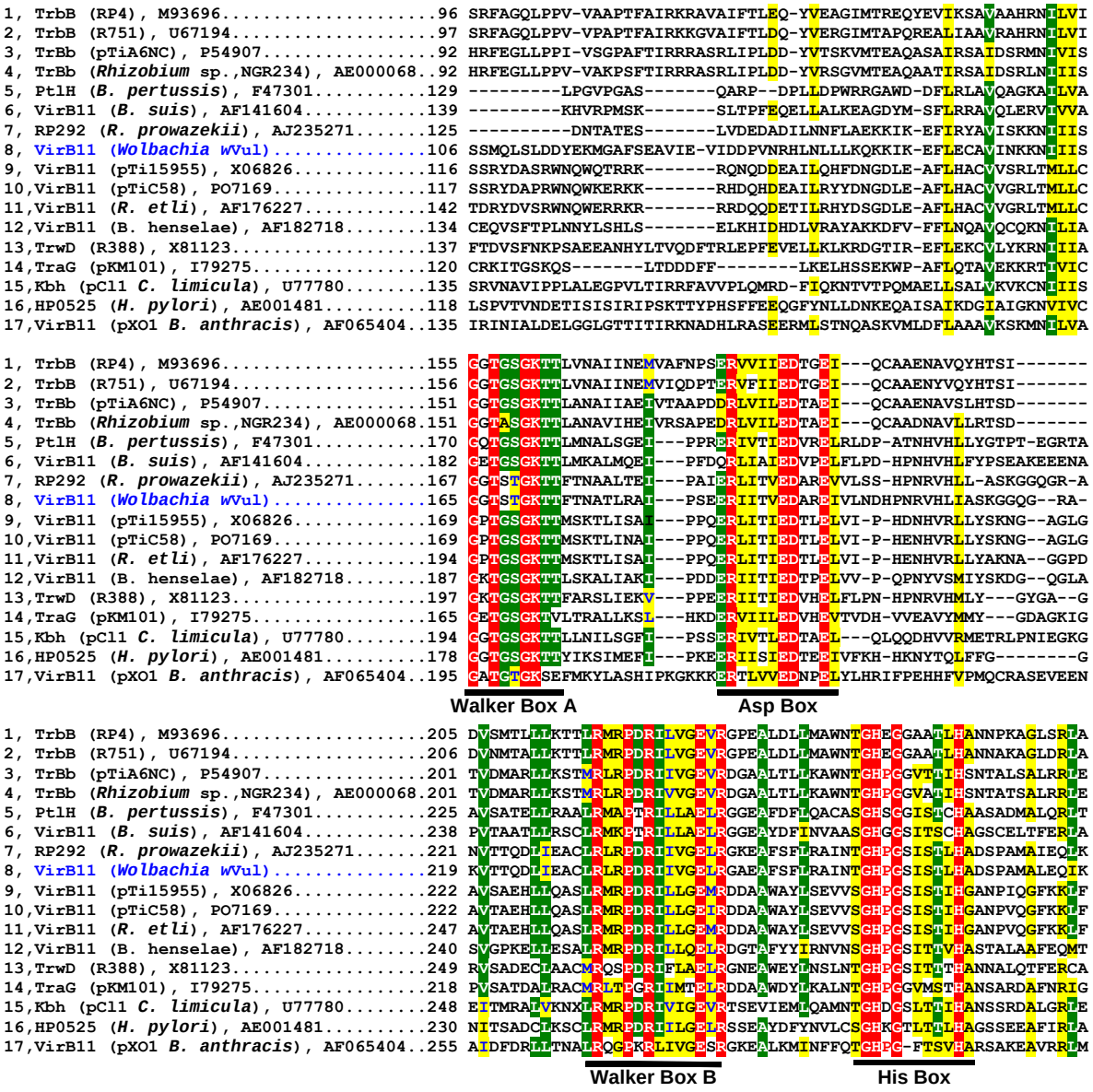








tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006



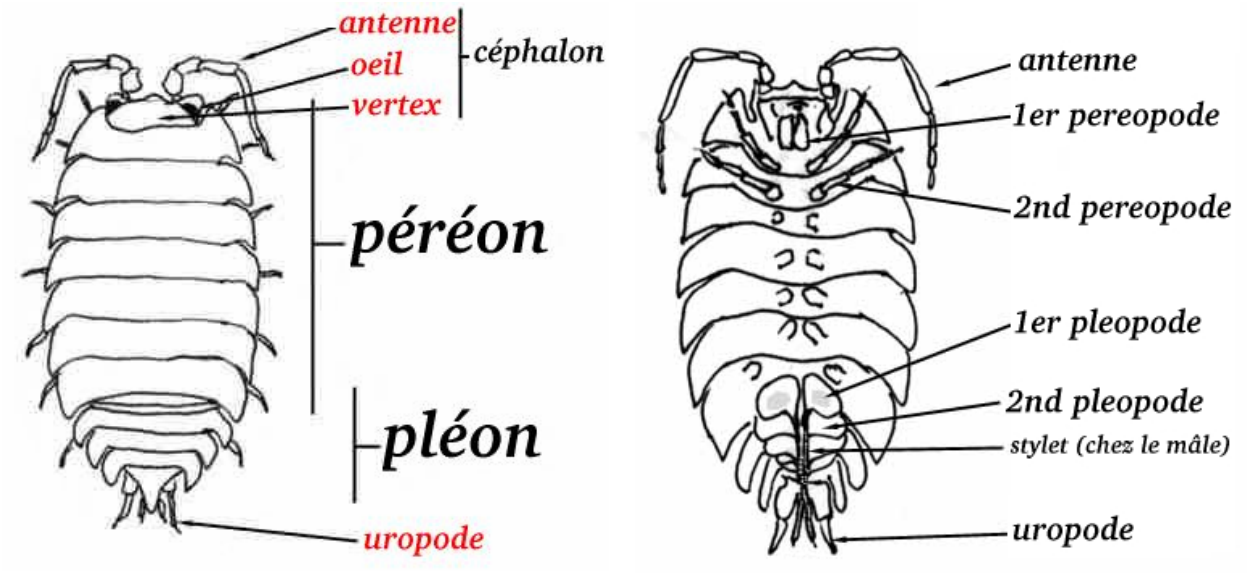
tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

ANNEXE

Les crustacés isopodes terrestres

1. Caractéristiques générales des Crustacés Isopodes Terrestres

Le corps des Crustacés Isopodes Terrestres se divise en trois parties principales : le **céphalon**, le **péréon** (ou thorax) et le **pléon** fusionné avec le **telson** (ou abdomen). Ces trois parties sont elles-mêmes divisées en segments (figure 1-a). La plupart des Crustacés Isopodes Terrestres a des yeux composés de multiples ocelles, ils possèdent également une paire d'antennes et une paire d'antennules très réduite. Une paire de pattes ou **péréopodes** est insérée sur le coté ventral de chacun des 7 segments du péréon (figure 1-b). Sur le pléon sont insérés les **pléopodes**. Les pléopodes comprennent les **exopodes** qui servent de protection que l'on voit de l'extérieur et les **endopodes** qui sont des branchies captant l'oxygène de l'eau arrivant par capillarité. Des pseudo trachées, sont parfois insérées sur les exopodes. C'est le cas chez les espèces évoluées des genres *Porcellio* ou *Armadillidium* qui en possèdent deux paires. Les deux pléopodes formant la paire postérieure sont nommés **uropodes**.

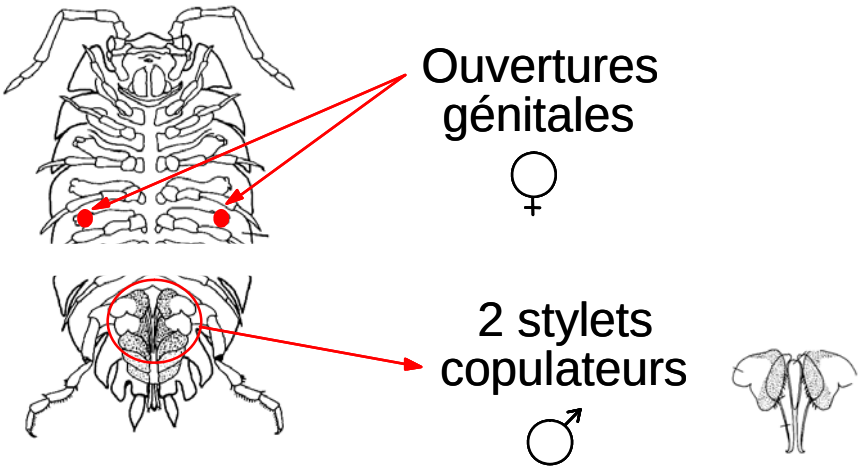


(a) **(b)**

<u>Figure 1 :</u> Représentation schématique de la morphologie d'un Crustacé Isopode Terrestre, en vue dorsale (a), et en vue ventrale (b).

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

On différencie les mâles des femelles par les deux premières paires de pléopodes qui sont modifiés en organes de copulation chez le mâle (figure 2). Les exopodes sont peu modifiés mais les endopodes sont transformés en stylets orientés vers l'arrière. Les femelles n'ont pas d'organes génitaux externes.



<u>Figure 2 :</u> Représentation schématique de la morphologie mâle et femelle d'un Crustacé Isopode Terrestre en vue ventrale.

La durée de vie moyenne d'un Crustacé Isopode Terrestre est de 2 à 3 ans. La reproduction est interne et les oeufs sont pondus et incubés dans une poche ventrale incubatrice (le **marsupium**) remplie d'un liquide qui leur évite de souffrir de la sécheresse de l'air. Après éclosion, les jeunes restent dans le marsupium pendant environ 4 semaines. Vingt quatre heures après la sortie de cette poche, les jeunes munis de six paires de pattes effectueront une première mue qui leur apportera leur septième paire de pattes. La maturité sexuelle est acquise environ un an plus tard, après la quatrième mue du développement post-embryonnaire (Juchault, 1966).

La croissance des Crustacés Isopodes Terrestres est continue, c'est-à-dire que des phénomènes de mues vont périodiquement avoir lieu tout au long de leur vie. L'animal va accroître sa taille et sa masse jusqu'à sa mort. Le cycle d'intermue des Crustacés Isopodes Terrestres se divise en 4 grandes périodes (A, B, C et D).

La période A-B (1 à 2 jours) correspond à l'exuviation caractérisée par le rejet de l'ancien tégument. Elle s'effectue en deux temps : d'abord la partie postérieure, puis la partie antérieure. L'exuviation de la partie antérieure s'effectue 12 à 24 heures après l'exuviation de la partie postérieure. La post-mue (période B) suit immédiatement l'exuviation et correspond à la période ou la cuticule de l'animal est molle. Il ne peut alors ni se mouvoir, ni se nourrir.

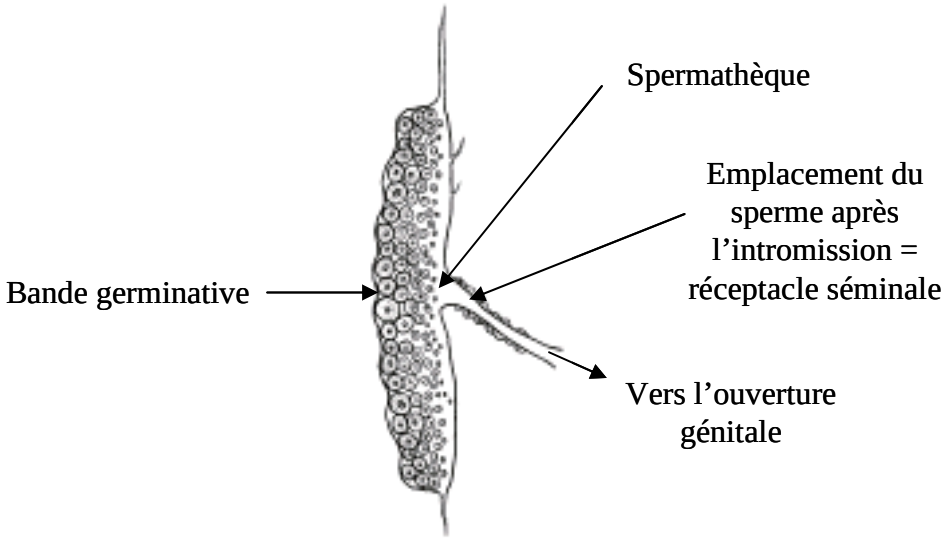
La période C (environ 10 jours) correspond à une phase de repos tégumentaire pendant laquelle l'exosquelette de l'animal est dur. L'activité de l'animal est maximale durant cette période.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

La période D (environ 16 jours) est une phase de pré-mue correspondant à la mise en place du nouveau tégument et à la digestion de l'ancien exosquelette. Cette période est marquée par l'apparition progressive de « plaques blanches » sur les sternites 1 à 4. Ces structures constituent un stock de carbonate de calcium au niveau de l'ancien tégument, permettant de réduire les pertes calciques lors de la mue (Heeley, 1941 ; Steel et Campbell, 1977). Le stockage de calcium dans la partie antérieure de l'animal facilite également l'exuviation postérieure, par décalcification du tégument. Le calcium ainsi stocké servira au durcissement de la nouvelle cuticule (Graf, 1978).

Comme chez la majorité des Crustacés, le cycle de reproduction des cloportes est associé au cycle de mue des femelles. La période de reproduction des Oniscidea est marquée par la formation du marsupium qui se différencie lors d'une mue dite « mue parturielle ». La reproduction est également en étroite relation avec la physiologie des femelles, et en particulier avec leur cycle d'ovogenèse. L'entré en reproduction est sous la dépendance de facteurs climatiques. L'allongement de la photopériode et l'augmentation de la température stimulent l'entré en reproduction et prolongent la période de reproduction. (Mocquard et al., 1989). Il semble que les mâles soient aptes à se reproduire tant que les conditions thermiques sont compatibles avec une activité physiologique (Jassem et al., 1982).

En période de repos, les femelles effectuent des mues de croissance dite « normales » pendant lesquelles les ovocytes se différencient. Cette phase de multiplication goniale (pré-vitellogenèse) a lieu dans la bande germinative (Figure 3) de l'ovaire et correspond à la mise en place de cellules folliculaires.



<u>Figure 3 :</u> Représentation schématique d'un ovaire d'Isopode Terrestre.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

Les ovocytes apparaissent alors translucides ou légèrement blancs et vont croître sans accumuler de réserves vitellines. Après leur sortie de la bande germinative, les ovocytes entrent en phase de vitellogenèse primaire et accumulent des réserves vitellines restreintes. Les ovocytes prennent alors une teinte jaune-orangée et peuvent atteindre un diamètre allant jusqu'à 250 µm. En période de repos sexuel, la croissance s'arrête et les ovocytes restent bloqués à ce stade. Une lyse des plus gros ovaires a lieu au sein de l'ovaire, et un remplacement par des ovocytes plus jeunes s'opère en continu.

Avec l'allongement de la photopériode et l'augmentation de la température, la maturation des ovocytes débute lors d'une mue parturielle. Les ovocytes effectuent alors une vitellogenèse secondaire et augmentent de volume. Cette phase n'intéresse que les ovocytes les plus avancés, alors que les plus jeunes vont dégénérer. Elle correspond à une mise en réserve de vitellus qui va occuper la totalité du cytoplasme (Souty, 1984 ; Besse et Mocquard, 1968). Les ovocytes prennent une teinte brun-orangée et leur diamètre peut atteindre 600 µm. Cette dernière phase sera suivie de la ponte des ovocytes dans le marsupium. Après la ponte, une nouvelle génération d'ovocytes prendra la place des ovocytes pondus.

La fécondation est interne, après intromission du sperme dans les oviductes (figure 3). Pour féconder complètement une femelle, un mâle doit inséminer du sperme dans les deux ouvertures génitales de la femelle (figure 2). Le stylet copulateur gauche servira à introduire du sperme dans l'ouverture génitale femelle droite et inversement. C'est au moment de la ponte des ovocytes dans le marsupium que la fécondation a lieu, lors de leur passage dans l'oviducte. Le surplus de sperme est stocké dans une spermathèque situé à la base de l'oviducte (figure 2).

Les cloportes ont de façon générale un régime végétarien et détritivore (végétaux en décomposition) mais peuvent s'attaquer aux végétaux vivants. Ils interviennent dans les processus de compostages.

2. Systématique

Les animaux utilisés appartiennent aux espèces *Armadillidium vulgare* Latreille (1804), *Oniscus asellus*, *Porcellio dilatatus petiti* et *Porcellionides pruinosus*. *Wolbachia* induit la féminisation (F) chez *Armadillidium vulgare* (Martin et al., 1973), *Oniscus asellus* (Rigaud et al., 1999) et *Porcellionides pruinosus* (Juchault et al., 1994), et l'Incompatibilité

Cytoplasmique (IC) chez *Porcellio dilatatus petiti* (Legrand et al., 1978). Ces Crustacés Terrestres, comme les autres représentants de ce groupe, sont communément désignés sous le nom de cloporte. La systématique de ces espèces est la suivante :

Classe	Crustacea			
Sous-classe	Malacostraca			
Super-ordre	Peracarida			
Ordre	Isopoda			
Sous-ordre	Oniscidea			
Infra-ordre	Ligiamorpha			
Section	Crinocheta			
Super-famille	Oniscoidea			
Famille	Armadillidiidae	Oniscidae	Porcellionidae	
Genre	*Armadillidium*	*Oniscus*	*Porcellio*	*Porcellionides*
Espèce	*vulgare*	*Asellus*	*dilatatus*	*Pruinosus*
Sous-espèce			*petiti*	
Nom de la *Wolbachia* associée*	*w*Vul	*w*Ase	*w*Pet	*w*Pru

* : selon la nomenclature internationale

3. Description générale d'*Armadillidium vulgare*

La taille de l'*Armadillidium* est en moyenne de 15 mm sur 7 mm (figure 4-a). En France, elle est de 19 sur 8 mm mais en Corse ou en Italie la taille peut atteindre 21 sur 11 mm. *A. vulgare* se met en boule quand on le touche mais ne forme pas une sphère parfaite et rentre ses antennes à l'intérieur de sa boule (figure 4-b). Les uropodes sont aussi longs que larges, aplatis et en forme de "bêche". Les mâles ont une couleur gris foncé uniforme tandis que les femelles ont une couleur plus claire et généralement marbrée. Mais la couleur varie avec l'âge ainsi les femelles deviennent plus sombres en vieillissant. La période de reproduction est limitée à deux mois : de mi-mai à mi-juillet et les femelles donnent normalement deux à trois portées par an. Dans chaque marsupium, on estime le nombre d'embryon à environ 100. Cette espèce est probablement originaire de la Méditerranée orientale. Mais aujourd'hui, elle a été

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

dispersée par l'homme dans de nombreux pays sans en faire une espèce cosmopolite, elle est cependant rare dans les régions humides.





(a) **(b)**

<u>Figure 4 :</u> Photo de l'espèce *Armadillidium vulgare* adulte (a) et représentation de sa forme boule (b).
(http://perso.wanadoo.fr/zenza/cloportes/armadi.html)

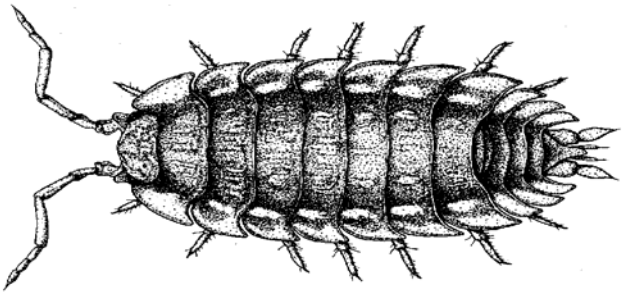
4. Description générale des autres espèces utilisées

4.1. *Oniscus asellus*

Sa taille est généralement de 15 à 18 mm. *Oniscus asellus* est de couleur grisâtre parsemée de taches jaunes (figure 5-a). Les exopodes sont en forme de lance et les flagelles des antennes se composent de trois sections distinctes (figure 5-b). Cette espèce se reproduit uniquement pendant les mois d'été et dans les endroits abrités. Les femelles donnent 2 portées au cours de l'été et le marsupium peut contenir jusqu'à 80 oeufs suivant la taille de la femelle. Cette espèce est très certainement originaire d'Europe occidentale. En France, elle est extrêmement commune sauf dans les régions méridionales où sa présence n'a été que très rarement signalée. Cette espèce étant dépourvue de pseudo trachées, elle ne peut vivre que dans une atmosphère humide. Les besoins d'*Oniscus asellus* en calcaire sont élevés. On retrouve cette espèce dans les forêts de basse et moyenne altitude où elle colonise les éboulis calcaires, les fentes de rochers, les souches mortes ou encore les écorces des arbres abattus.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006





(a) **(b)**

<u>Figure 5 :</u> Photo de l'espèce *Oniscus Asellus* adulte (a) et représentation de sa morphologie générale (b).
(http://perso.wanadoo.fr/zenza/cloportes/oniscus.html)

4.2. *Porcellionides pruinosus*

Les individus ont une taille comprise entre 9 et 12 mm. Leur coloration typique est bleu violacé mais les variations de couleurs sont très fréquentes, et on peut même observer des cas d'albinisme faux (albinisme en mosaïque) ou vrai avec des yeux oranges pâles. Les uropodes sont en forme de lances et les antennes comportent de grandes taches blanches (figure 6). Le pléon et le péréon forment un décalage peu marqué, et le corps est recouvert d'une pruinosité caractéristique lui valant son nom. Cette espèce est de loin celle qui possède les facultés d'adaptation les plus étendues. Elle est capable de vivre et de se reproduire dans les milieux les plus divers, à conditions qu'ils ne soient pas trop humides ou trop froids. Elle est absolument polyphage, ou cannibale à l'occasion. Ce n'est que dans la région méditerranéenne dont elle est originaire, que cette espèce se rencontre en pleine nature, sous les pierres ou parmi les débris végétaux. Mais, elle est devenue un compagnon inséparable de l'homme, et dans tous les pays du monde, on la rencontre dans les jardins, les fumiers, les serres, les caves ou bien encore les cuisines.



<u>Figure 6 :</u> Photo de l'espèce *Oniscus Asellus* adulte.
(http://perso.wanadoo.fr/zenza/cloportes/Ppruinosus.html)

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

4.3. *Porcellio dilatatus petiti*

Chez cette espèce, la surface du corps est couverte de petites bosses, et la largeur du corps est importante par rapport à sa longueur (figure 7-a). Les uropodes sont en forme de lance et sont larges sur le milieu. Le telson est arrondi à son extrémité (figure 7-b). La reproduction s'effectue suivant deux périodes l'une printanières, l'autre estivale. Les femelles de cette espèce ont donc deux portées par an et le marsupium renferme environ 30 embryons.

Les sites naturels de cette espèce sont les prairies calcaires, jardins, serres, habitations, et plus particulièrement les ruines. Dans le midi de la France, on rencontre *P. dilatatus* parfois à l'air libre, dans les détritus ou sous les pierres. C'est une espèce très commune dans le sud et l'ouest de la France, beaucoup plus rare dans le centre, l'est et le Nord. Elle a été répandue par l'homme dans une grande partie de l'Europe, jusqu'en Russie et en Turquie, à l'est, et jusqu'en Islande, au nord. Elle est commune dans les régions méditerranéennes occidentales, mais devient rare au-delà de l'italie. Elle a été importée par l'homme en Amérique du Nord et du Sud.





(a) **(b)**

<u>Figure 7 :</u> Photo de l'espèce *Porcellio dilatatus petiti* adulte (a), et photo du telson et des uropodes de la même espèce (b).
(http://perso.wanadoo.fr/zenza/cloportes/Pdilatatus.html)

5. Provenance

Chaque population d'animaux utilisés (*Armadillidium vulgare, Porcellionides pruinosus, Oniscus asellus, Porcellio dilatatus petiti*) appartient à la même souche, et chaque souche a pour origine un seul site de récolte en France. La souche majoritairement utilisée d'*Armadillidium vulgare* a pour origine le site de Celles-sur-Belle (79). Ces populations sont entretenues au laboratoire depuis de nombreuses années.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

6. Elevage

Les élevages sont localisés au sous-sol du bâtiment, dans différentes pièces climatisées prévues à cet effet. Deux conditions de photopériode ont également été mis en place : photopériode naturelle, et photopériode stimulante correspondant à 18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité (18 : 6 L/D).

Les réserves générales sont maintenues dans des bacs en plastique (40 x 40 x 13 cm) contenant au plus 200 individus. Le fond est garni de terre humide, cette terre ayant été préalablement séchée et tamisée afin d'éliminer la faune du sol et en particulier les cloportes qui pourraient s'y trouver. La nourriture est essentiellement composée de feuilles mortes de tilleuls ayant subi un début de fermentation, ces feuilles fournissant de plus un abri aux animaux. Un complément de nourriture est apporté *ad libitum* par des rondelles de carottes fraîches renouvelées toutes les semaines. Les boîtes d'élevage ne sont que très rarement nettoyées, en effet la litière constituée par les déjections des animaux favorise le maintien de l'équilibre du milieu, et de plus, la coprophagie est nécessaire à une croissance normale (Mocquard, 1968). Ce type d'élevage a pour avantage de mimer au mieux les conditions dans lesquelles évoluent les populations naturelles.

Les animaux sont maintenus dans une salle à 20°C, en photopériode naturelle ou en photopériode stimulante (L/D : 18/6).

7. Obtention et entretien de lignées

A l'origine, chaque lignée est issue d'une femelle et d'un mâle récoltés dans la nature sur un même site. Chaque couple géniteur est installé dans une boîte cylindrique en plastique transparent (Ø : 8 cm, h : 5 cm), contenant, là encore, de la terre, des feuilles mortes et de la nourriture *ad libitum*. Les boîtes sont placées à une température constante de 20°C, dans des conditions de photopériode stimulante (L/D: 18/6)

Ces conditions de photopériode stimulante entraînent l'entrée en vitellogenèse secondaire de la femelle qui devient ainsi réceptive à l'accouplement. Dès que la femelle effectue sa mue parturielle (mue précédant de quelques heures la ponte des œufs dans le marsupium de la femelle), le mâle est retiré de la boîte. Environ un mois plus tard, la naissance des jeunes appelés pullis a lieu. Quelques heures après cette naissance, les pullis sont séparés de leur mère afin d'éviter le phénomène de « cannibalisme » et transférés avec leur milieu (terre et déjections) dans une boîte plus grande (26.5 x 13.5 x 6.5 cm) afin de limiter les phénomènes de compétition. Ces boîtes sont alors soumises à une photopériode naturelle, toujours à une

température de 20°C. La différenciation des sexes est possible environ 3 mois plus tard, après la quatrième mue, le tri des mâles et des femelles est alors effectué afin d'élever les deux sexes séparément.

Le sex ratio de cette descendance et un test par PCR permettant d'amplifier l'ADN du gène bactérien *Wosp* (Braig et al., 1998) nous indique si la lignée obtenue est infestée par la bactérie *Wolbachia.*

L'entretien annuel des lignées consiste à croiser des femelles et des mâles de la même lignée mais de portées différentes.

8. Dissection des animaux

8.1. Prélèvement de l'hémolymphe

A l'aide d'une fine aiguille, un trou est percé dans la membrane articulaire entre le dernier tergite et le telson, le long du vaisseau dorsal. L'hémolymphe s'écoulant de ce trou est prélevée rapidement, à l'aide d'une pipette.

8.2. Prélèvement des tissus ou organes

La première étape consiste à libérer la cavité corporelle de l'animal. Pour cela, l'ablation de la tête entraînant le tube digestif (tête et tube digestif étant physiologiquement reliés) est réalisée, puis de la même façon, l'ablation du telson entraînant les caecums. Cette étape permet d'éliminer les éléments exogènes ingérés ainsi que les bactéries de la flore intestinale. Les différents organes ou tissus (gonades des mâles ou ovaires, chaîne nerveuse, vaisseau ventral (cœur), tissu adipeux…) peuvent alors être prélevés.

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

tel-00011718, version 2 - 6 Mar 2006

RESUME

***

Etude moléculaire de la bactérie intracellulaire féminisante *Wolbachia* chez *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode terrestre)

Les *Wolbachia* sont des bactéries Gram négatives capables d'envahir efficacement des populations de nombreux arthropodes. Ces endosymbiontes, héritées maternellement, peuvent induire différentes altérations de la reproduction comme par exemple la féminisation des mâles, la parthénogenèse, ou l'incompatibilité cytoplasmique. L'identification des gènes de l'hôte et des gènes bactériens impliqués dans ces phénotypes fait l'objet d'un programme européen (***Euwol*****)** dans le cadre duquel nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène de féminisation chez un crustacé terrestre, *Armadillidium vulgare*.

La caractérisation du chromosome de *w*Vul nous a permis d'établir que sa taille (1.75 Mb) était largement supérieure à celle des autres souches de *Wolbachia* connues (de 0.995 à 1.66 Mb). La détermination de profils de restriction concernant cette souche nous indique également que le chromosome bactérien est circulaire et ne partage pas totalement les mêmes sites de restriction avec les autres souches de *Wolbachia*. D'autre part, la purification de l'ADN bactérien mise en œuvre a permis d'amorcer le séquençage complet du génome de *w*Vul (équipe danoise, contrat ***Euwol***), et son annotation nous informera notamment sur la présence de gène de virulence pouvant interagir avec la différenciation sexuelle de son hôte.

En effet, la localisation exclusivement intracellulaire de *Wolbachia* suggère qu'elle puisse sécréter, dans le cytoplasme des cellules hôtes, des facteurs de virulence ou des toxines responsables du phénomène de féminisation. Dans cette étude, nous avons démontré la présence d'un système de sécrétion de type IV, caractérisé par un premier opéron *virB8-D4* (gènes *virB8, virB9*, *virB10*, *virB11* et *vir D4*) localisé en aval des gènes *phosphatase* et *ribA*, et d'un second opéron *virB3-B6* (gènes *virB3, virB4* et *virB6*) localisé indépendamment du premier sur le génome. De plus, il a été montré que les gènes *vir* de chaque opéron sont exprimés et cotranscrits dans le tissu le plus riche en *Wolbachia*, les ovaires, suggérant alors qu'il puisse être fonctionnel.

Enfin, afin de progresser dans la compréhension du mode d'action de *w*Vul, des cartographies bidimensionnelles de profils protéiques de différents tissus (ovaires, glandes androgènes et hémolymphe) d'individus infectés et non infectés ont été réalisées. L'analyse de ces cartes protéiques a permis de mettre en évidence des différences d'expression correspondant soit à des protéines bactériennes, soit à des protéines de l'hôte dont l'expression aurait été modifiée par la présence de la bactérie. L'analyse du génome nous permettra de corréler les séquences de protéines d'intérêt avec les séquences géniques.

L'identification de ces gènes pourra être une avancée importante en recherche appliquée, notamment afin de développer de nouvelles technologies permettant de contrôler la gestion des arthropodes vecteurs d'agents pathogènes humain, végétal ou animal, ou responsables de nuisances dans le domaine de l'agriculture.

MOTS CLES : *Wolbachia w*Vul– féminisation – *Armadillidium vulgare* – système de sécrétion de type IV – chromosome bactérien – Electrophorèse bidimensionnelle – Electrophorèse en champ pulsé