



HAL
open science

Caractérisation de 2 protéines membranaires d'*Ehrlichia ruminantium*, ERGA_CDS_01230 et 05140 et leur rôle dans l'adhésion à la cellule hôte

Valérie Pinarello

► **To cite this version:**

Valérie Pinarello. Caractérisation de 2 protéines membranaires d'*Ehrlichia ruminantium*, ERGA_CDS_01230 et 05140 et leur rôle dans l'adhésion à la cellule hôte. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. 2018. hal-02044265

HAL Id: hal-02044265

<https://ephe.hal.science/hal-02044265v1>

Submitted on 27 Feb 2019

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.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre**

MÉMOIRE

présenté
par

PINARELLO KLEIBER Valérie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**TITRE : Caractérisation de 2 protéines membranaires
d'*Ehrlichia ruminantium*, ERGA_CDS_01230 et 05140
et leur rôle dans l'adhésion à la cellule hôte**

soutenu le 26 juin 2018

devant le jury suivant :

Dr. ROSSEL Mireille – **Président**
Dr. VACHIERY Nathalie – **Tuteur scientifique**
Pr. DUPRESSOIR Thierry – **Tuteur pédagogique**
Pr. HADDAD Nadia – **Rapporteur**
Dr. MARTINEZ Eric – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. VACHIERY Nathalie

Intitulé de la structure d'accueil : CIRAD CRVC, Domaine Duclos, Petit-Bourg

Directeur : Dr. ALBINA Emmanuel

et de

Pr. DUPRESSOIR Thierry

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR1333 DGIMI, Université de Montpellier

Directeur : Dr. VOLKOFF Anne-Nathalie

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : CEDI

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par

PINARELLO KLEIBER Valérie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**TITRE : Caractérisation de 2 protéines membranaires
d'*Ehrlichia ruminantium*, ERGA_CDS_01230 et 05140
et leur rôle dans l'adhésion à la cellule hôte**

soutenu le 26 juin 2018

devant le jury suivant :

Dr. ROSSEL Mireille – **Président**
Dr. VACHIERY Nathalie – **Tuteur scientifique**
Pr. DUPRESSOIR Thierry – **Tuteur pédagogique**
Pr. HADDAD Nadia – **Rapporteur**
Dr. MARTINEZ Eric – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. VACHIERY Nathalie

Intitulé de la structure d'accueil : CIRAD CRVC, Domaine Duclos, Petit-Bourg

Directeur : Dr. ALBINA Emmanuel

et de

Pr. DUPRESSOIR Thierry

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR1333 DGIMI, Université de Montpellier

Directeur : Dr. VOLKOFF Anne-Nathalie

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : CEDII

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Caractérisation de 2 protéines membranaires d'*Ehrlichia ruminantium*, ERGA_CDS_01230 et 05140 et leur rôle dans l'adhésion à la cellule hôte

PINARELLO KLEIBER Valérie

26 juin 2018

RÉSUMÉ

Ehrlichia ruminantium est une bactérie intracellulaire obligatoire, transmise par les tiques du genre *Amblyomma* et responsable de la cowdriose, une maladie des ruminants domestiques et sauvages. Plusieurs vaccins expérimentaux ont déjà été testés mais la grande diversité génétique d'*E. ruminantium* rend difficile l'obtention d'un vaccin efficace contre toutes les souches présentes sur le terrain. Afin de développer à terme des stratégies de maîtrise de la cowdriose par des approches vaccinales et thérapeutiques, il est important dans un premier temps de mieux comprendre l'interaction d'*E. ruminantium* avec la cellule hôte et notamment les mécanismes d'adhésion associés. Dans ce contexte, deux protéines membranaires d'*E. ruminantium* ERGA_CDS_01230, un probable transporteur de fer et ERGA_CDS_05140, une porine, ont été étudiées pour leur rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes. Les deux protéines ont été produites avec succès dans le système *Leishmania tarentolae* avec un marqueur GFP et une étiquette histidine et elles sont pourvues de modifications post-traductionnelles de type glycosylation. Ce système est donc adapté pour produire des protéines recombinantes d'*E. ruminantium*, qui nécessitent des modifications post-traductionnelles et plus largement pour d'autres bactéries. Nous avons mis en évidence par cytométrie en flux que la protéine recombinante 05140 (recProt 05140) adhère aux cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) sans pouvoir le confirmer par microscopie à balayage. Les tests d'adhésion par western blot sur différentes fractions cellulaires se sont révélés négatifs. *In vitro*, le CDS ERGA_CDS_05140 est surexprimé au stade infectieux, corps élémentaires à 120h après infection par rapport au stade précédent à 96 h. Cependant, il n'a pas été possible de statuer sur le rôle de la protéine native ERGA_CDS_05140 dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux cellules hôtes. Nous avons ensuite montré que recProt 01230 est capable d'adhérer aux BAEC par CF et microscopie à balayage. En effet, elle interagit avec des protéines du lysat cellulaire et avec celles de la fraction « membranes et organelles ». RecProt 01230 n'adhère pas à l'héparane sulfate, une glycosaminoglycane présente sur les cellules, excluant un mécanisme d'adhésion héparane sulfate dépendant. Par contre, d'autres GAGs jouent probablement un rôle dans l'adhésion d'*E. ruminantium* à la cellule hôte. En effet, des expériences préliminaires ont montré qu'un traitement enzymatique dégradant deux GAGs, le dermatane sulfate et la chondroïtine sulfate, à la surface des BAEC, est associé à une diminution de moitié du nombre de bactéries dans la cellule hôte après un cycle de développement. De plus, *in vitro*, l'expression du CDS ERGA_CDS_01230 est plus importante au stade libre infectieux, corps élémentaire qu'aux autres stades intracellulaires. Ces résultats montrent l'implication probable d'ERGA_CDS_01230 dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux cellules hôtes. Enfin, les 2 protéines ERGA_CDS_01230 et 05140 induisent une réponse humorale chez les animaux vaccinés, toutefois plus faible pour ERGA_CDS_05140. Si son rôle dans l'adhésion aux cellules, fortement suggéré par nos travaux, se confirmait, ERGA_CDS_01230 serait un bon candidat vaccinal. Ces premiers travaux constituent une première avancée dans la compréhension des mécanismes d'invasion par *E. ruminantium*.

MOTS-CLÉS : *E. ruminantium*, intracellulaire, adhésion, hôte, récepteur, glycosaminoglycanes

Remerciements

Les mots représentent bien peu de chose pour remercier du soutien que j'ai reçu durant ces 3 années d'EPHE, tant sur le plan professionnel que personnel !

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à Nathalie Vachiéry, qui m'a accompagnée depuis mon entrée au CIRAD et tout au long de ce cursus. Tes conseils, ton expérience et ton exigence ont grandement stimulé mes réflexions. Ta confiance, ta disponibilité ainsi que ton amitié ont été de précieux soutiens. Un grand merci pour la correction attentive de ce mémoire.

J'exprime ma gratitude à Thierry Dupressoir qui m'a aidée à cheminer et faire les bons choix tout au long du parcours EPHE. Ta culture scientifique et ton franc-parler ont rendu nos cours passionnants. Tes corrections et questions m'ont poussé à chercher des réponses que je ne pensais pas possible de trouver !

Je souhaite remercier Damien Meyer pour son accompagnement durant ce projet de recherche et sa rigueur dans la structuration du mémoire, ainsi qu'à Emmanuel Albina pour son écoute et le partage de ses connaissances dans de nombreux domaines.

Un grand merci à Isabel Marcelino de m'avoir fait découvrir le monde des protéines et le Portugal ; à Mangesh Bhide et l'équipe slovaque pour leur accueil et le partage de leurs connaissances dans le domaine des protéines recombinantes ainsi qu'à Olivier Gros pour son expertise en microscopie électronique. J'ai eu beaucoup de plaisir à apprendre à vos côtés.

Merci à Christian Sheikboudou et Rosalie Aprelon ainsi qu'aux autres collègues du laboratoire pour votre bienveillance et vos coups de pouce dans les périodes chargées ; merci aussi à Philippe Holzmuller, Carinne Puech et Valérie Rodrigues.

Je remercie le Docteur Mireille Rossel d'avoir accepté la présidence de ce jury de soutenance. Merci au Professeur Nadia Haddad d'avoir accepté d'être le rapporteur et au Docteur Eric Martinez d'être l'examineur de ce mémoire.

J'exprime ma gratitude à la Région Guadeloupe via le projet MALIN pour le financement FEDER 2015-FED-186, Région CR16-555 et au CIRAD de m'avoir soutenue durant ce parcours de formation.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mathieu, Baptiste et Eva ; de votre amour et de votre compréhension dans tous ces moments où j'ai été loin et ceux où vous avez dû attendre patiemment que je sois disponible. Votre soutien indéfectible m'a donné la force d'aller au bout de cette aventure.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mes parents qui m'ont donné le goût de l'effort et du travail bien fait, toujours prêts à traverser l'Atlantique dans les situations qui le nécessitent. Merci à Julien et Capucine, au reste de la famille, et à ma belle-famille pour vos pensées et votre présence même dans l'éloignement.

Un grand merci à Caroline, Jean-François et Frédérique pour tous les moments partagés, et qui ont souvent remis du baume au cœur ! Je n'oublie pas Sandrine, Céline, Damian et tous les autres que je n'aurai pas la place de citer ici. Chaque amitié m'est précieuse.

Je souhaite remercier Christian Van Hove, qui m'a ouvert son havre de paix au cœur de Montpellier à chacun de mes passages, un peu loin de ma famille et de la Guadeloupe.

Merci à tous les relecteurs de ce mémoire qui ont bien voulu se prêter au jeu de la chasse aux fautes !

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	4
Liste des annexes	5
Introduction	6
<i>I. La cowdriose et son agent pathogène, Ehrlichia ruminantium</i>	6
I.A. La maladie.....	6
I.B. Répartition géographique et impact économique de la maladie.....	6
I.C. Vecteurs associés.....	7
I.D. L'agent pathogène : caractéristiques d' <i>E. ruminantium</i>	8
I.E. Vaccins commercial et expérimentaux	10
<i>II. Mécanismes d'adhésion, d'invasion des bactéries intracellulaires et d'E. ruminantium en particulier</i>	11
II.A. Chez les bactéries intracellulaires	11
II.B. Chez <i>E. ruminantium</i>	16
Matériel et méthode	20
<i>I. Production du matériel biologique</i>	20
I.A. Production et contrôle qualité des protéines recombinantes	20
I.A.1. Production des protéines recombinantes, recProt 05140 et recProt 01230	20
I.A.1.a. Production et clonage du plasmide contenant le CDS ERGA_CDS_01230 ou ERGA_CDS_05140 dans <i>E. coli</i>	21
I.A.1.b. Transfection et expression des recProt 01230 et recProt 05140 dans <i>Leishmania tarentolae</i>	22
I.A.2. Contrôle qualité des protéines recombinantes.....	23
I.A.2.a. Taille et concentration	24
I.A.2.b. Contrôle de fluorescence des protéines par agrégation sur résine Probond	24
I.A.2.c. Vérification de la présence des étiquettes GFP et histidine par immuno-blotting....	24
I.A.2.d. Test de la glycosylation des deux protéines recombinantes.....	25
I.A.3. Prédiction de la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes, de leur localisation et du site de fixation potentiel d'un ligand.....	26
I.B. Production des BAEC et des échantillons d' <i>E. ruminantium</i>	26
I.B.1. Culture des BAEC	26
I.B.2. Production des échantillons d' <i>E. ruminantium</i> au cours du temps (<i>Figure 7</i>)	27
<i>II. Caractérisation des protéines recProt 01230 et 05140 d'E. ruminantium</i>	28
II.A. Test d'adhésion des protéines recombinantes aux BAEC.....	28
II.A.1. Visualisation de l'adhésion de protéines recombinantes aux BAEC par microscopie électronique à balayage.	28
II.A.2. Visualisation de l'adhésion de protéines recombinantes aux BAEC par cytométrie en flux	29
II.B. Caractérisation de l'interactant intervenant dans l'adhésion des protéines aux BAE.....	30

II.B.1. « Pull down » pour recherche de l'interactant de la protéine recombinante	30
II.B.1.a. Préparation du lysat cellulaire	30
II.B.1.b. « Pull down »	31
II.B.2. Mise en évidence d'interactions entre recProt 01230 et les fractions et du lysat cellulaire par « Far Western blot »	33
II.B.2.a. Préparation des fractions et du lysat cellulaire	33
II.B.2.b. « Far Western blot »	34
II.B.2.c. Etude du rôle des glycosaminoglycanes dans l'adhésion d' <i>E. ruminantium</i> aux BAEC	34
II.C. Cinétique d'expression des gènes ERGA_CDS_05140 et ERGA_CDS_01230	36
II.C.1. Production du matériel biologique	36
II.C.2. Extraction d'ADN et d'ARN	36
II.C.3. Traitement à la DNase et reverse transcription	36
II.C.4. Quantification du nombre de bactéries à chaque temps et des cDNA correspondants pour les ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140	37
II.C.4.a. Quantification du nombre d' <i>E. ruminantium</i> à chaque temps prélevé	37
II.C.4.b. Quantification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d' <i>E. ruminantium</i> au cours du cycle de croissance	37
II.C.4.c. Calcul des ratios d'expression	38
II.D. Evaluation du potentiel antigénique des protéines recProt 01230 et recProt 05140 d' <i>E. ruminantium</i> par ELISA et « dot blot »	38
Projet	40
Résultats	42
I. <i>Caractérisation du matériel biologique</i>	42
I.A. Qualité des protéines recombinantes produites	42
I.A.1. Taille attendue et pureté élevée de la recProt 01230 et 05140	42
I.A.2. Présence des étiquettes GFP et Histidine sur recProt 01230 et 05140	43
I.A.3. Présence de glycosylation sur recProt 01230 et 05140	44
I.B. Prédiction des structures et localisation des protéines ERGA_CDS_01230 et 05140	45
II. <i>Interaction des protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d'E. ruminantium avec les BAEC</i>	47
II.A. Mise en évidence de l'adhésion des protéines recombinantes avec les BAEC	47
II.B. Identification des ligands cellulaires intervenant dans l'adhésion	50
II.B.1. « Pull down » et « Far Western blot »	50
II.B.2. Rôle des glycosaminoglycanes dans l'adhésion	53
III. <i>Modification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et 05140 au cours de la croissance d'E. ruminantium in vitro</i>	55
III.A. Synchronisation de l'infection et croissance d' <i>E. ruminantium in vitro</i>	55
III.B. Modulation de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et 05140	57
IV. <i>Réponse humorale associée aux protéines natives ERGA_CDS_01230 et 05140 lors d'essais vaccinaux avec le vaccin à bactéries atténuées ou inactivées</i>	58

Discussion.....	61
Le système d'expression <i>Leishmania tarentolae</i> est adapté à la production de protéines recombinantes d' <i>E. ruminantium</i>	61
Caractérisation d'ERGA_CDS_05140.....	62
Caractérisation d'ERGA_CDS_01230.....	63
ERGA_CDS_01230 est un récepteur intervenant dans l'adhésion	64
Les ligands et l'importance des glycosaminoglycanes dans l'adhésion d' <i>E. ruminantium</i>	66
La glycosylation d'ERGA_CDS_01230	68
L'immunogénicité d'ERGA_CDS_01230	70
Conclusions et perspectives	71
Bibliographie.....	74
Annexes	I

Liste des abréviations

AA : acides aminés

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*

A. phagocytophilum : *Anaplasma phagocytophilum*

A. pleuropneumoniae : *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. marginale : *Anaplasma marginale*

A. variegatum : *Amblyomma variegatum*

BAEC : bovine aortic endothelial cells, cellules endothéliales d'aorte bovine

BCA: BiCinchoninic acid Assay, essai basé sur l'acide bichinchonique

BHK21 : milieu de Glasgow/ Mc Pherson

BSA : bovine serum albumin, albumine bovine sérique

CDS : coding DNA sequence, séquence codante ADN

CF : cytométrie en flux

DAB : 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

DNase X : mammalian cell surface glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein, protéine ancrée par le glycosylphosphatidyl inositol à la surface cellulaire de mammifère

E. coli : *Escherichia coli*

eFbpA : *Ehrlichia* ferric binding protein A, protéine A de liaison au fer d'*Ehrlichia*

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

E. ruminantium : *Ehrlichia ruminantium*

EtpE : entry-triggering protein of *Ehrlichia*, protéine déclenchant l'entrée d'*Ehrlichia*

FC : fold change, quantification relative

GAG : glycosaminoglycane

GFP : green fluorescent protein, protéine fluorescente verte

GPI : glycosylphosphatidylinositol

hpi : hours post infection, heures post-infection

HPLC : high pressure liquid chromatography, chromatographie haute pression en phase liquide

HRP : horse radish peroxidase, peroxidase de Raifort

K. pneumonia : *Klebsiella pneumonia*

LB : milieu Luria Bertani

LDS : lithium dodecyl sulfate

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, désorption ionisation laser assistée par matrice

MES : 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate, 4-Morpholineethanesulfonic acid

Min : minute

MPT : modification post-traductionnelle

O/N : over night ; durant la nuit

O-GlcNAc: O-linked N-acetylglucosamine

OMP : outer membrane protein, protéine de membrane externe

ORI : origine de répllication

PBS : phosphate buffer salin, tampon phosphate salin

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PCR : polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaine

PPI : pour préparation injectable

PVDF : fluorure de polyvinylidène

SBF : sérum de fœtus de bovin SDS : sodium dodécyl sulfate

Sec : seconde

SOC: super optimal broth with catabolite repression medium, bouillon super optimal avec milieu de répression catabolique

TA : température ambiante

TMB : tétraméthylbenzidine

TRP : tandem repeat protein effectors, protéines effectrices en tandem répétés

TTBS : tris tween buffer salin, tampon tris tween salin

Liste des figures

Figure 1 : Distribution géographique de la cowdriose.....	6
Figure 2 : Cycle de vie d' <i>E. ruminantium</i> dans son vecteur et son hôte (Marcelino <i>et al</i> , 2012).	8
Figure 3: Cycle de vie intracellulaire des <i>Anaplasmataceae</i> (Pruneau <i>et al</i> , 2014).....	9
Figure 4 : Mécanisme d'entrée « fermeture éclair » d' <i>Ehrlichia chaffeensis</i> dans sa cellule hôte (Rikihisa, 2015).....	13
Figure 5 : Différents protéoglycanes présents à la surface des cellules de mammifères et unités disaccharidiques de GAGs (Lin <i>et al</i> , 2017).	14
Figure 6 : Etapes de production des protéines recombinantes chez <i>Leishmania tarentolae</i>	20
Figure 7 : Production des échantillons biologiques pour la quantification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d' <i>E. ruminantium</i>	27
Figure 8: Détermination de la taille des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF.	42
Figure 9 : Immuno-blotting de recProt 01230 et recProt 05140	44
Figure 10 : « Western blot » des protéines recombinantes révélées avec un anticorps de souris anti-O-GlcNAc couplé à un anticorps anti-souris-HRP.....	44
Figure 11 : Structure 3D prédictive des protéines recombinantes obtenues avec le logiciel « I-Tasser » et prédiction de la position des sites de liaison au ligand (en vert, le ligand).	46
Figure 12 : Prédiction de la topologie des domaines transmembranaires par l'outil en ligne « Phyre2 ».	47
Figure 13 : Photos de microscopie électronique après incubation avec les BAEC, des billes adsorbées avec recProt 01230 ou 05140.	48
Figure 14 Marquage des BAEC par les recProt 01230 et 05140 en cytométrie en flux (A et B-).....	49
Figure 15: « Pull down » en conditions dénaturantes (A) et natives (B).	52
Figure 16 : Fixation de recProt 01230 au lysat cellulaire et à la fraction « membranes et organelles F2» des BAEC, lors du « Far Western blot ».....	53
Figure 17 : Interaction de l'héparane sulfate et recProt 01230.	53
Figure 18 : Effet du traitement chondroïtinase ou héparinase sur l'infection des BAEC par <i>E. ruminantium</i>	54
Figure 19 : Observation des stades d' <i>E. ruminantium</i> au microscope à contraste de phase.	56
Figure 20 : Quantification du nombre de bactéries par qPCR Sol-1 dans l'ADN d' <i>E. ruminantium</i>	56
Figure 21 : Expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 au cours du cycle de développement d' <i>E. ruminantium</i> par rapport à 120 hpi.	58
Figure 22 : Réponse anticorps à la protéine recProt 01230 au cours d'une cinétique de vaccination... ..	59

Liste des tableaux

<i>Tableau 1</i> : Caractéristiques prédictives des protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 de la membrane externe d' <i>E. ruminantium</i>	17
<i>Tableau 2</i> : Culture de <i>Leishmania tarentolae</i> , de la mise en culture à l'expression des protéines recombinantes.....	23
<i>Tableau 3</i> : Détermination du pourcentage de contamination des 2 protéines recombinantes par spectrométrie de masse Orbitrap.	43
<i>Tableau 4</i> : Prédiction par score de fiabilité de la localisation subcellulaire des protéines natives d' <i>E. ruminantium</i> par le logiciel « CELLO 2.5.....	46
<i>Tableau 5</i> : Ligands potentiels de recProt 05140 identifiés par Orbitrap.....	51
<i>Tableau 6</i> : Récepteurs de bactéries intracellulaires intervenant dans l'invasion de l'hôte	64

Liste des annexes

<i>ANNEXE 1</i> : Séquence des CDS étudiés	I
<i>ANNEXE 2</i> : Milieux utilisés lors de la production des protéines recombinantes.....	II
<i>ANNEXE 3</i> : Tampons utilisés pour l'immuno-blotting et le « Far Western blot »	II
<i>ANNEXE 4</i> : Séquence des protéines étudiées	II
<i>ANNEXE 5</i> : Milieu de culture des BAEC	III
<i>ANNEXE 6</i> : Tampon de lyse du culot cellulaire	III
<i>ANNEXE 7</i> : Tampons de l'ELISA.....	III
<i>ANNEXE 8</i> : Carte d'identité et propriétés biologiques des ligands potentiels.....	III

Introduction

I. La cowdriose et son agent pathogène, *Ehrlichia ruminantium*

I.A. La maladie

La cowdriose, maladie mortelle des ruminants domestiques et de certains ruminants sauvages (Peter *et al*, 2002) est transmise par les tiques du genre *Amblyomma* (Allsopp, 2015) et provoquée par *Ehrlichia ruminantium* (*E. ruminantium*), bactérie intracellulaire obligatoire.

Chez l'animal, l'infection par *E. ruminantium* provoque généralement une forte hyperthermie après deux semaines d'incubation en fonction du niveau d'infestation par des tiques infectées. On observe de l'anorexie ainsi que des convulsions liées au syndrome nerveux, un œdème des poumons et un hydropéricarde conduisant généralement à la mort. Les espèces les plus sensibles sont les petits ruminants, caprins et ovins puis les bovins notamment les races améliorées (Vachiéry *et al*, 2017).

I.B. Répartition géographique et impact économique de la maladie

Cette maladie est présente en Afrique sub-saharienne, dans l'Océan indien et dans certaines îles de la Caraïbe. La cowdriose a été décrite pour la 1^{ère} fois en Afrique du Sud au 19^{ème} siècle. Elle a été introduite dans la Caraïbe depuis l'Afrique de l'Ouest dès la fin du 18^{ème} siècle avec le commerce triangulaire d'esclaves et de bétail porteurs de tiques infectées (Maillard, 1998).

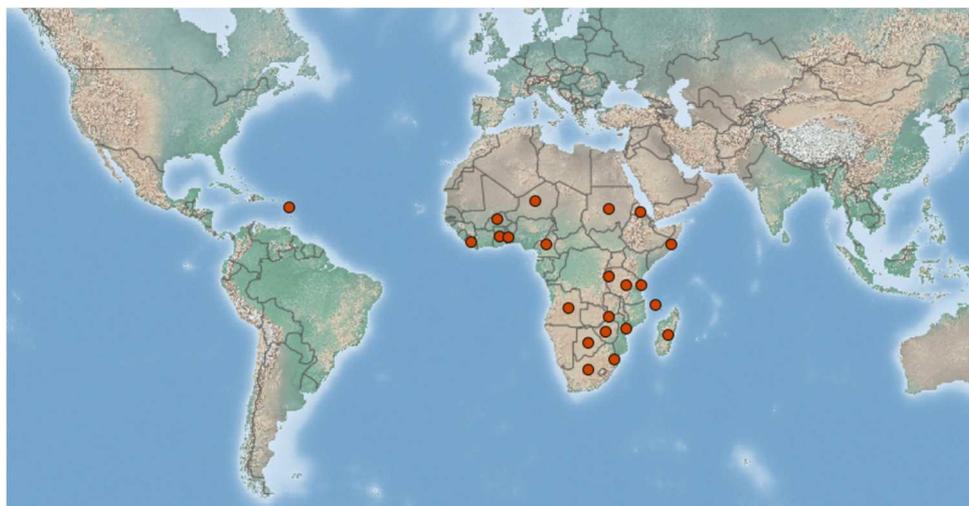


Figure 1 : Distribution géographique de la cowdriose.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/87241>. Les pays du sud de l'Afrique sont majoritairement touchés.

Les pertes économiques, en termes de mortalité, traitements antibiotique et acaricide sont colossales (en moyenne 46 millions \$/ an pour la communauté des pays d’Afrique du Sud, Mozambique, Afrique du Sud et Zimbabwe). La maladie est un frein réel au développement et à la productivité des élevages, surtout en Afrique. De plus, la cowdriose représente une menace pour le continent américain en raison du risque d’introduction par des oiseaux migrateurs porteurs de tiques infectées à partir de l’arc antillais et la présence d’espèces endémiques d’*Amblyomma* capables de transmettre l’agent pathogène (Barre *et al*, 1995). Depuis 2012, elle fait partie de la liste des 12 maladies animales transfrontalières d’importance majeure pour le département américain de sécurité intérieure (Roth *et al*, 2013).

Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes de pathogénèse de la bactérie et le développement de meilleures stratégies de lutte contre la cowdriose sont essentiels.

I.C. Vecteurs associés

Les vecteurs capables de transmettre l’agent de la cowdriose sont des tiques principalement du genre *Amblyomma*. Ainsi on trouve *Amblyomma variegatum* (*A. variegatum*, largement répandue en Afrique et dans la Caraïbe), *A. hebraeum* (très présente en Afrique du Sud), *A. pomposum* (plutôt rencontrée en Afrique centrale), et *A. lepidum* (en Afrique de l’Est) (Bournez *et al*, 2015 ; Walker *et al*, 2003).

Ces tiques ont 3 stades successifs (larvaire, nymphal et adulte). Après chaque repas sanguin sur un animal, la tique se détache pour muer et passer au stade suivant, avant de se gorger sur un nouvel animal pour continuer son cycle de développement (*Figure 2*). L’infection d’une tique par *E. ruminantium* au cours d’un repas sanguin se produit surtout lorsque l’animal est en hyperthermie et que la bactériémie est élevée.

La transmission de l’agent pathogène est trans-stadiale : une tique infectée sur l’animal au stade larvaire ou nymphal sera infectieuse au stade nymphal ou au stade adulte respectivement. L’agent pathogène se développe dans les cellules épithéliales intestinales de la tique, puis envahit les cellules des glandes salivaires et s’y développe. L’hôte est infecté par la salive de la tique au cours d’un repas sanguin (*Figure 2*).

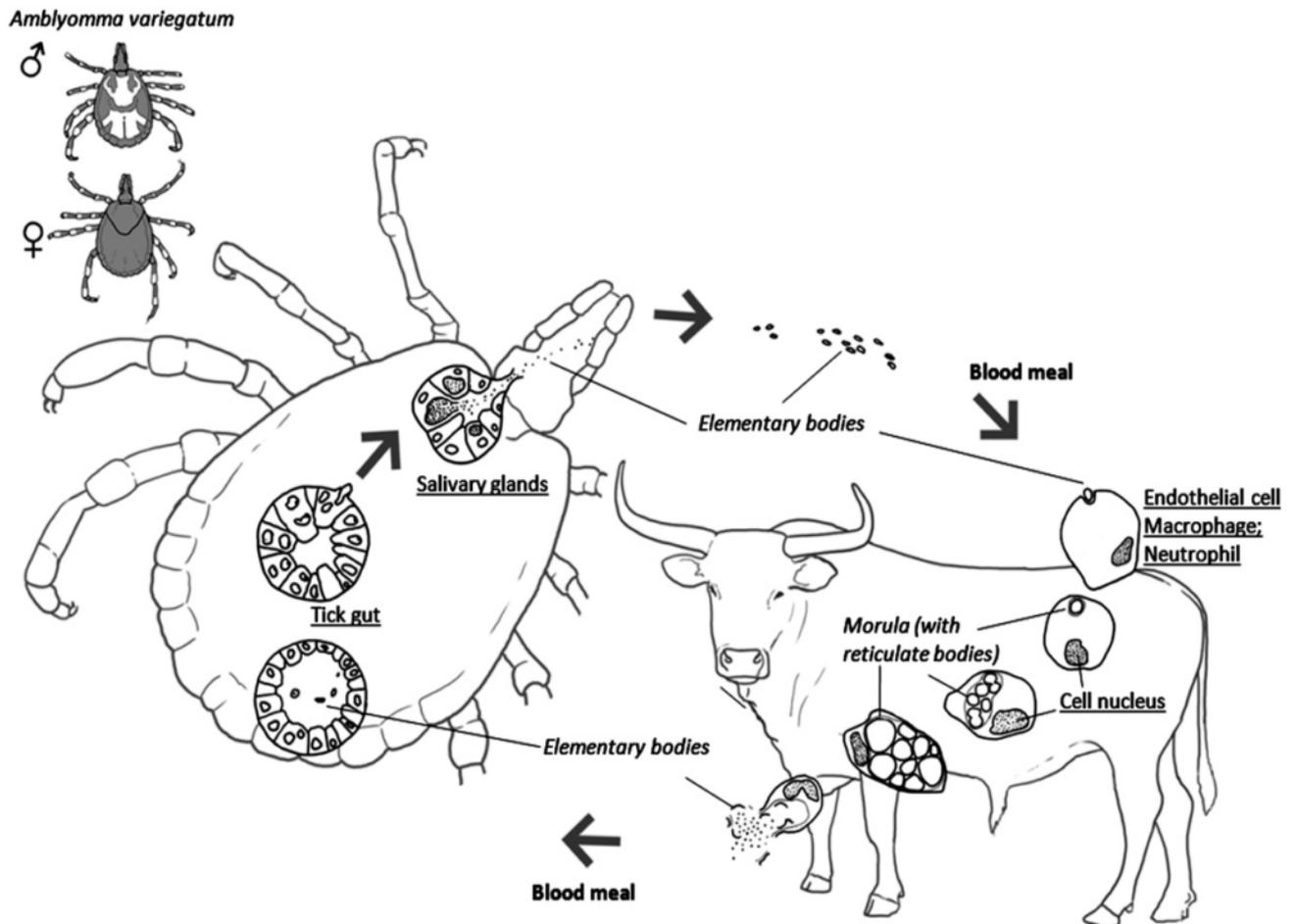


Figure 2 : Cycle de vie d'*E. ruminantium* dans son vecteur et son hôte (Marcelino *et al*, 2012). L'agent pathogène se développe dans les cellules épithéliales intestinales de la tique, puis envahit les cellules des glandes salivaires et s'y développe. L'hôte est infecté à partir de la salive de la tique au cours d'un repas sanguin. *E. ruminantium* a un cycle de développement biphasique. Elle entre dans la cellule hôte sous forme de corps élémentaire et s'y multiplie dans des vacuoles intra-cytoplasmiques sous forme de corps réticulés.

I.D. L'agent pathogène : caractéristiques d'*E. ruminantium*

E. ruminantium appartient à l'ordre des Rickettsiales et à la famille des *Anaplasmataceae* (Dumler *et al*, 2001). Bactérie Gram négative, elle se développe dans une vacuole intracellulaire dérivée de la membrane cellulaire de l'hôte et infecte préférentiellement les cellules endothéliales, monocytes, macrophages et neutrophiles de l'hôte. Elle a un cycle de développement biphasique. Elle entre dans la cellule hôte sous forme de corps élémentaire et s'y multiplie dans des vacuoles intra-cytoplasmiques sous forme de corps réticulés (Figure 2).

Le modèle *in vitro* utilisé dans ce travail pour la culture d'*E. ruminantium* est constitué de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC). Elles se multiplient en monocouche jusqu'à

confluence, impliquant de nombreux facteurs de croissance et des hormones (Castilla *et al*, 1999).

In vitro, le cycle complexe d'*E. ruminantium* biphasique est initié par des corps élémentaires, formes libres infectieuses, libérées lors de la lyse des cellules (Figure 3). Ces corps élémentaires une fois internalisés dans de nouvelles cellules après 24 h post-infection (hpi) changent de stade. Ce sont les corps réticulés non infectieux qui se multiplient dans les vacuoles des cellules pour former des morulas. Une phase de latence de 48 h est observée avant le début de la phase exponentielle de croissance, phase durant laquelle les corps réticulés se multiplient par cycles successifs de fission binaire et se différencient en corps élémentaires, en passant par un stade intermédiaire de corps dense. Les corps élémentaires sont libérés lors de la lyse cellulaire (au bout de 120 hpi pour la souche virulente Gardel) et capables d'initier un nouveau cycle d'infection (Marcelino *et al*, 2005 ; Pruneau *et al*, 2014 ; Moumene *et al*, 2015b).

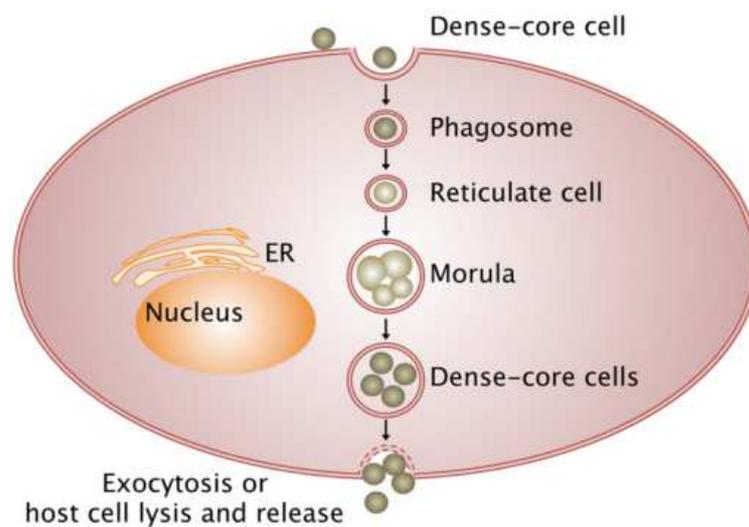


Figure 3: Cycle de vie intracellulaire des Anaplasmatocées (Pruneau *et al*, 2014). Elles entrent dans la cellule hôte par endocytose, s'y différencient en corps réticulés et forment des morulas. Elles passent ensuite par un état intermédiaire avant d'être libérées sous forme de corps élémentaires.

On constate une meilleure adaptation des souches atténuées aux conditions de culture *in vitro*, ce qui aboutit à un cycle de développement plus court, en 4-5j au lieu de 5-6j pour les souches virulentes (Tago *et al*, 2016). *In vivo*, les souches atténuées ne provoquent que très peu de signes cliniques et sont rapidement reconnues et éliminées lors de la réponse de l'hôte à l'infection. La charge bactérienne peut être suivie en évaluant le nombre de génomes équivalents par amplification ciblée des gènes uniques *map1* (Peixoto *et al*, 2005) et de la région *pCS20* très conservée entre les souches (Pruneau, 2012).

Le génome d'*E. ruminantium* souche Gardel a une taille de 1.5kpb et un pourcentage faible en bases G-C (27.51%). Il compte 950 séquences codantes et un grand nombre de pseudogènes. De plus, il est caractérisé par une grande plasticité et donc une grande diversité de génotypes, produite par une succession d'insertions et délétions, de répétitions en tandem. Ces réarrangements génomiques permettent à la bactérie de s'adapter rapidement à un nouvel environnement (Frutos *et al*, 2006). D'autre part, malgré un génome de petite taille, *E. ruminantium* est capable de moduler l'expression de ses protéines grâce aux modifications post-traductionnelles (MPTs), plus de 50% de son protéome étant notamment composé de glycoprotéines (Marcelino *et al*, 2015b). Ceci lui permet probablement de s'adapter aux différents environnements que ce soit chez la tique ou le mammifère.

La capacité d'adaptation conférée par la grande plasticité génomique laisse donc entrevoir les difficultés à obtenir un vaccin efficace contre toutes les souches présentes sur le terrain.

I.E. Vaccins commercial et expérimentaux

A ce jour, un seul vaccin commercial est disponible. Son principe est basé sur l'injection intraveineuse de sang d'un animal infecté par la souche virulente Ball3, suivi d'un traitement antibiotique aux tétracyclines dès l'apparition de l'hyperthermie. L'utilisation d'un sang d'animal infecté induit cependant le risque de transmission d'autres agents pathogènes (Allsopp, 2009). De plus, l'administration de ce vaccin présente de nombreuses contraintes liées aux conditions de terrain comme :

- la nécessité de préserver la chaîne du froid (conservation du sang infectieux en azote liquide)
- la nécessité d'un suivi quotidien de la température de chaque animal vacciné au risque d'entraîner des pertes si les animaux ne sont pas traités à temps

Toutefois cette méthode protège uniquement contre les souches homologues de Ball3.

D'autres vaccins expérimentaux issus de travaux de recherche mais non commercialisés existent (Vachiéry *et al*, 2013 ; Allsopp, 2009):

- un vaccin à bactéries atténuées par passages successifs en culture, pour seulement 3 souches atténuées, Gardel, Sénégal et Welgevonden est disponible

- des vaccins recombinants (ADN et/ ou protéines recombinantes) ciblant la famille des protéines Map, CpG ou encore des ABC transporteurs (Pretorius *et al*, 2007)
- des vaccins à bactéries inactivées (bactérie entière tuée avec adjuvant). Toute souche isolée *in vitro* peut être utilisée pour la vaccination, jusqu'à présent testée avec un maximum de 2 souches inoculées simultanément.

L'approche du vaccin à bactéries inactivées est la plus prometteuse car son efficacité a été prouvée en conditions contrôlées et sur le terrain, et ses conditions de production de type industriel ont été établies avec un coût de production réduit (Marcelino *et al*, 2006 ; Marcelino *et al*, 2015a ; Adakal *et al*, 2010). De plus, il est particulièrement stable même dans des conditions de rupture de chaîne du froid, ce qui est en adéquation avec les conditions de terrain (Marcelino *et al*, 2015a). Cependant, malgré son efficacité vis-à-vis des souches homologues et de quelques souches hétérologues, le vaccin à bactéries inactivées n'est pas suffisamment efficace face à la grande diversité des souches de terrain. Pour obtenir un vaccin régional, il serait nécessaire d'isoler *in vitro* plusieurs souches présentes sur une zone géographique donnée, afin de constituer un cocktail vaccinal qui confèrerait une couverture plus complète.

La problématique de la diversité des souches et du manque de protection de la souche vaccinale est identique pour le vaccin à bactéries atténuées pour lequel uniquement 3 souches sont disponibles, limitant le spectre de protection. De plus, l'immunisation par une souche atténuée doit se faire avec la souche vivante, impliquant des contraintes de conservation. Lors de l'épreuve, aucun signe clinique n'est observé, montrant une bonne efficacité du vaccin.

Le développement d'un vaccin recombinant efficace est donc crucial et pourrait répondre à la problématique de diversité génétique en incluant plusieurs séquences protéiques d'une ou plusieurs protéines vaccinales communes à toutes les souches.

II. Mécanismes d'adhésion, d'invasion des bactéries intracellulaires et d'*E. ruminantium* en particulier

II.A. Chez les bactéries intracellulaires

Les bactéries intracellulaires infectent les cellules hôtes de différentes manières. La phagocytose est spécifique d'un certain type cellulaire (dont les macrophages et neutrophiles) mais permet généralement l'élimination de l'agent pathogène sauf lorsque celui-ci parvient à

détourner les moyens de défense des cellules phagocytaires, comme le font *E. chaffeensis* ou *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 2003).

L'endocytose est un processus plus universel et permet l'internalisation de petites particules soit par endocytose clathrine- et/ ou cavéoline-dépendante ou encore par macropinocytose, assez similaire à la phagocytose (Bonazzi *et al*, 2006). Les bactéries font généralement appel à deux mécanismes principaux pour entrer dans les cellules.

Dans le 1^{er} mécanisme, appelé mécanisme de déclenchement, le contact entre la bactérie et son hôte est transitoire, permettant l'injection dans le cytosol cellulaire des effecteurs du système de sécrétion de type III (T3SS). Ces effecteurs peuvent déclencher le réarrangement du cytosquelette et de la membrane, conduisant ainsi à une macropinocytose. Ce mécanisme est par exemple utilisé par *Shigella* et *Salmonella* (Martinez, 2012).

Le 2^{ème} mécanisme, retrouvé chez *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Yersinia pseudotuberculosis*, est basé sur le principe de la « **fermeture éclair** ». Dans ce cas, une interaction directe entre les adhésines exposées à la surface de la bactérie et des senseurs exposés à la surface de la cellule eucaryote entraîne les modifications nécessaires à l'internalisation de la bactérie (*Figure 4*).

Pour *E. chaffeensis*, par l'intermédiaire de la dynamique des radeaux lipidiques, la protéine CD147 de la cellule hôte s'associe au complexe EtpE-DNaseX. CD147 recrute alors hnRNP-K pour se lier à N-WASP, qui change de conformation et se lie au complexe de nucléation de l'actine Arp2/3. Cela conduit à la polymérisation de l'actine et à la formation de filopodes qui permettent l'internalisation d'*E. chaffeensis* dans des endosomes. Mais l'article précise toutefois qu'il est fort possible que des ligands d'*E. chaffeensis* autres que DNaseX soient présents à la surface des cellules hôtes, ce qui pourrait très bien être le cas chez les hôtes d'*E. ruminantium* aussi (Mohan Kumar *et al*, 2015).

Chez *E. chaffeensis*, TRP120 a d'abord été identifié comme un candidat potentiel intervenant dans l'adhésion à la cellule hôte mais il a finalement été démontré que cette protéine n'est pas une adhésine (Rikihisa, 2015). Cet effecteur semble cependant important dans l'infection car il cible les complexes épigénétiques (modifiant l'expression des gènes) de l'hôte. TRP120 va permettre de favoriser l'infection de l'hôte par *E. chaffeensis* en contrôlant par exemple l'inactivation de la transcription de gènes eucaryotes (Mitra *et al*, 2018). Son homologue n'a pas été retrouvé chez *E. ruminantium*.

Les protéines membranaires bactériennes jouent donc un rôle essentiel dans l'adhésion à- et l'invasion de- la cellule hôte. Leur étude chez *E. ruminantium*, mais aussi celle des protéines membranaires de son hôte, permettront de comprendre les mécanismes moléculaires d'invasion mis en jeu lors de l'infection par ces parasites intracellulaires.

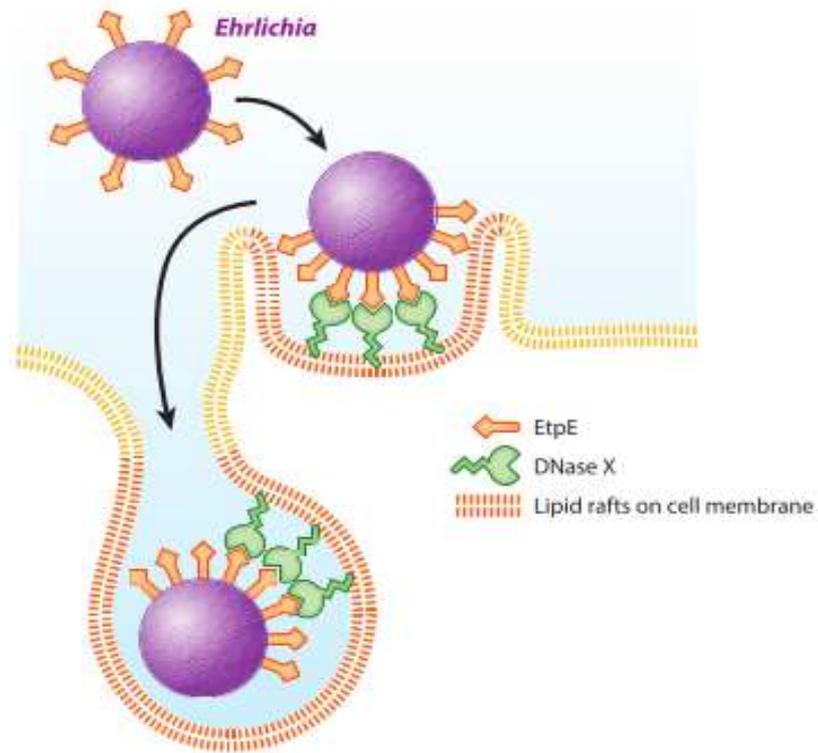


Figure 4 : Mécanisme d'entrée « fermeture éclair » d'*Ehrlichia chaffeensis* dans sa cellule hôte (Rikihisa, 2015).

E. chaffeensis utilise la région C-term d'EtpE afin d'entrer en contact avec la protéine de surface DNaseX, au niveau des radeaux lipidiques de la membrane cellulaire. Cela induit le remodelage du cytosquelette de l'hôte, la formation d'un filopode et l'englobement de la bactérie.

Beaucoup d'agents pathogènes produisent des facteurs de virulence capables d'exploiter et de détourner les composants de l'hôte pour leur pathogénèse, tels que les protéoglycanes. Ils sont exprimés de manière constitutive à la surface de la cellule, dans les compartiments intracellulaires ainsi qu'au niveau de la matrice extracellulaire. Ils sont souvent ciblés par les bactéries et virus pour l'attachement aux cellules, leur invasion ainsi que pour la dissémination de la descendance infectieuse. Ils sont connus pour jouer le rôle de récepteurs des agents pathogènes dans de nombreux cas d'infection (Aquino *et al*, 2018 ; Rajas *et al*, 2017 ; Gagoski *et al*, 2015).

On distingue les décorines, biglycanes, agrécane, syndécane, glypicanes et perlécane (Figure 5). Ce sont des assemblages de chaînes de glycosaminoglycane fixées autour d'un noyau protéique (Bartlett *et al*, 2010).

Les glycosaminoglycane (GAGs) sont des chaînes linéaires de polysaccharides composées d'unités dissaccharidiques répétitives et dont la composition chimique permet de classer les protéoglycane en 6 catégories : les héparane sulfates, l'héparine, les chondroïtine sulfates, les dermatane sulfates, le kératane sulfate et le hyaluronane (Jinno *et al*, 2015).

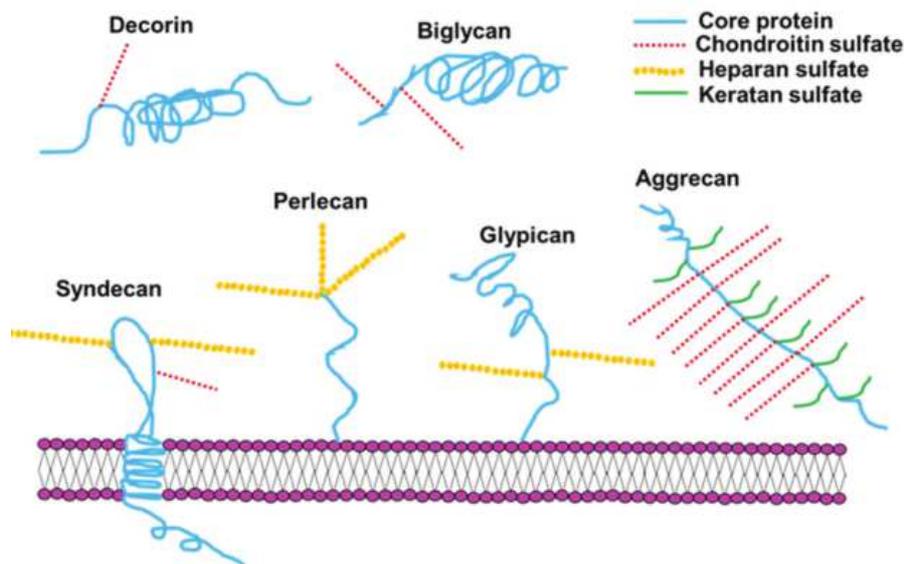


Figure 5 : Différents protéoglycane présents à la surface des cellules de mammifères et unités dissaccharidiques de GAGs (Lin *et al*, 2017). Chaque protéoglycane est composé d'un corps protéique greffé de différents GAGs (chondroïtine, héparane ou kératane sulfate).

Seuls les hyaluronane interagissent de manière non covalente avec les protéoglycane *via* des motifs de liaison spécifiques. La grande diversité structurale des GAGs leur permet d'interagir avec un grand nombre de molécules biologiques.

Beaucoup d'agents pathogènes utilisent les GAGs comme un site d'ancrage initial de faible affinité ; cela facilite l'interaction avec leur récepteur secondaire respectif permettant l'internalisation mais les GAGs sont parfois aussi employés comme des molécules de pontage (Aquino *et al*, 2010). De plus, certains GAGs modulent les processus d'endocytose telles que l'endocytose cavéoline-dépendante ou la formation de filopodes. Certains agents pathogènes sont aussi capables de détourner les GAGs de l'hôte pour inhiber les mécanismes de défense de ce dernier et promouvoir leur pathogénèse.

En effet, Bartlett *et al* (2011) rapportent que des phénomènes de clivage des protéoglycanes héparanes sulfatés (principalement les syndécanes) ont été observés au cours de la pathogénèse bactérienne, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Staphylococcus aureus*. Cela se produit par détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte ou grâce à l'équipement enzymatique de l'agent pathogène lui-même. Mais même si ce phénomène a été observé dans plusieurs cas, son rôle exact et la façon dont le clivage des protéoglycanes héparanes sulfatés se produit ne sont pas encore bien explicités ; il est toutefois supposé que ce mécanisme permet de faciliter l'accès à- et l'infection de- la cellule hôte par l'agent pathogène. Enfin, certains agents pathogènes microbiens synthétisent leurs propres GAGs comme composant de la capsule polysaccharidique, augmentant ainsi leur virulence.

La glycosylation peut aussi être un déterminant de la virulence bactérienne. C'est l'une des MPTs les plus importantes, chez les procaryotes comme les eucaryotes. La glycosylation d'une protéine est la fixation de manière covalente par une oligosaccharyltransférase (OTase), de glycanes sur les chaînes latérales d'acides aminés (AA) d'une protéine acceptrice. On distingue la N- et la O-glycosylation.

La O-glycosylation se produit généralement au niveau des groupements hydroxyles des sérines ou thréonines, plus rarement sur la tyrosine (Lu *et al*, 2015).

Deux voies de glycosylation existent :

- la glycosylation dépendante de l'OTase qui transfère aux protéines un oligosaccharide synthétisé sur un support lipidique
- la glycosylation indépendante de l'OTase au cours de laquelle les glycosyltransférases ajoutent séquentiellement des monosaccharides aux protéines cibles (Iwashkiw *et al*, 2013).

Les mécanismes de reconnaissance des sites de glycosylation des adhésines sont peu connus mais la comparaison de plusieurs adhésines a révélé la présence d'une séquence consensus de glycosylation de 19 AA, prédite pour former un brin accepteur sous forme de boucle β incluant un résidu sérine ou thréonine (Charbonneau *et al*, 2007).

Valguarnera *et al* (2016) rapportent la glycosylation de certaines toxines bactériennes notamment chez *Clostridium difficile*, *Yersinia*, *Legionella* ou encore *E. coli* mais cela ne devrait pas s'appliquer à *E. ruminantium* pour laquelle aucune production de toxine n'a été rapportée.

McBride *et al* (2000) décrivent la O-glycosylation de protéines de membranes homologues immuno-dominantes, respectivement P120 et P140 d'*Ehrlichia chaffeensis* et *canis*.

II.B. Chez *E. ruminantium*

La compréhension des mécanismes d'invasion d'*E. ruminantium* et des interactions avec son hôte, surtout au niveau de l'adhésion à celui-ci, est importante mais peu documentée à ce jour.

Plusieurs protéines d'*E. ruminantium* ont été identifiées pour leur potentielle importance dans l'invasion des cellules hôtes :

- à travers des études transcriptomiques comparant les stades « corps élémentaires infectieux » et « corps réticulés » pour la souche Gardel virulente (Pruneau *et al*, 2012)
- dans des études transcriptomique/ protéomique comparant la souche Gardel virulente à la souche atténuée au stade corps élémentaire (Marcelino *et al*, 2015b ; Pruneau *et al*, 2018)
- à travers des études explorant la membrane externe au stade corps élémentaire de la souche virulente (Moumene *et al*, 2015a)

Ainsi, **ERGA_CDS_09160**, protéine majeure antigénique Map1, ayant un grand nombre d'isoformes, pourrait intervenir dans l'adhésion à la cellule hôte.

ERGA_CDS_04580, protéine putative exportée, sans homologie chez les *Anaplasmataceae* et possible porine, pourrait intervenir dans le métabolisme durant la phase d'infection.

ERGA_CDS_8340 qui est surexprimée chez la souche Sénégal atténuée, est l'homologue du récepteur d'*E. chaffeensis* intervenant dans son internalisation.

ERGA_CDS_02510 est une protéine de la membrane externe surexprimée au stade « corps élémentaire » par rapport au « corps réticulé ».

ERGA_CDS_00390 est une protéine hypothétique de la membrane externe la plus fortement surexprimée au stade « corps élémentaire » par rapport au « corps réticulé ».

Ces protéines de la membrane externe pourraient être impliquées dans la réponse immunitaire. Deux autres protéines pourraient intervenir dans l'invasion de l'hôte : l'énolase

ERGA_CDS_04960 et la protéine ERGA_CDS_00060, homologue de l'hémolysine d'*A.phagocytophilum*.

L'énolase a été démontrée comme ayant un rôle important dans de nombreux processus pathologiques (Diaz-Ramos *et al*, 2012) ; l'hémolysine est une enzyme qui forme des pores de différents diamètres dans la membrane des cellules et pourrait intervenir lors de la lyse cellulaire au stade corps élémentaire.

De plus, *E. ruminantium* module l'expression de ses gènes au cours du temps, en fonction du stade de développement, et des fonctions qui lui sont nécessaires à chaque stade (Emboule *et al*, 2009 ; Pruneau *et al*, 2012). On distingue notamment une surexpression des gènes *hypo*, *ccmB* et *dsKA* au stade corps élémentaire. Ces gènes codent respectivement une protéine de membrane externe, un ABC transporteur et un régulateur de facteurs de virulence ; toutes ces fonctions pouvant être sollicitées lors de l'invasion de l'hôte par *E. ruminantium*.

Deux protéines ont retenu notre intérêt comme susceptibles de jouer un rôle dans l'adhésion et l'invasion d'*E. ruminantium* aux BAEC du fait de leur localisation membranaire : ERGA_CDS_05140, codant une protéine OMP (protéine de la membrane externe), porine hypothétique, et d'autre part, ERGA_CDS_01230, transporteur putatif de fer (*Tableau 1*).

CDS	Position sur le génome	Fonction prédictive	N° d'accèsion de la protéine	Taille attendue en kDa	Intérêt	Bibliographie
ERGA_RS00645 (ERGA_CDS_E RGA_CDS_012 30)	209622.. 210668	Fe(3+) ABC transporteur, protéine de liaison au substrat	WP_006010 454.1 Q5FFA9 (Uniprot)	41,3 68,3 (avec tag-his et tag-GFP)	Présent dans le protéome de la membrane externe de la souche virulente	<i>Moumene et al, 2015</i>
ERGA_RS02670 (ERGA_CDS_E RGA_CDS_051 40)	825717.. 827201	porine	WP_011255 631.1 Q5FH08 (Uniprot)	54,07 81 (avec tag-his et tag-GFP)	Surexprimée chez la souche atténuée	<i>Pruneau et al, 2018 ; Marcelino et al, 2015</i>

Tableau 1: Caractéristiques prédictives des protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 de la membrane externe d'*E. ruminantium*

ERGA_CDS_01230, transporteur putatif de fer a été identifié dans le protéome de la membrane de la souche virulente (Moumene *et al*, 2015a). Son rôle dans le développement de la bactérie et son mode d'interaction avec la cellule hôte sont importants à éclaircir. Elle pourrait jouer un rôle clé dans l'acquisition, aux dépens de l'hôte, du fer essentiel à la survie de l'agent pathogène.

Selon Moumene *et al* (2017), *E. ruminantium* est capable de percevoir les modifications de concentration en fer dans l'environnement cellulaire et d'adapter l'expression des facteurs de virulence en fonction de cela. La carence en fer induit l'expression des gènes *erxR* (régulateur de l'expression) mais aussi de *trI* (facteur de transcription), *virB* (facteur de virulence) et *mapI*, codant une protéine antigénique majeure de surface. De plus, les gènes *map* partagent au moins une voie de régulation avec ceux codant le système de sécrétion de type IV et peuvent donc être d'importants déterminants de pathogénicité impliqués dans l'acquisition du fer ou l'infection des cellules hôtes.

La protéine ERGA_CDS_05140 a été montrée comme largement surexprimée chez la souche d'*E. ruminantium* atténuée *in vitro* par rapport à la souche virulente avec quatre isoformes majoritaires (Pruneau, 2012 ; Marcelino *et al*, 2015b). Ce différentiel d'expression au niveau protéique a aussi été observé au niveau des transcrits (Pruneau *et al*, 2018). Il a été montré qu'il y a une modification de la composition de la membrane d'*E. ruminantium* entre la souche virulente et atténuée, avec notamment chez la souche atténuée une diminution de l'expression des gènes de la famille multigénique Map1 et une augmentation de l'expression des gènes codants des protéines de membranes hypothétiques dont ERGA_CDS_05140, la plus fortement exprimée. Elle pourrait constituer un candidat vaccinal potentiel.

La protéine ERGA_CDS_05140 est montrée comme ayant de nombreuses isoformes (27 pour ERGA_CDS_05140 comparé à 36 pour Map1), associées à des MPTs, quelle que soit la souche virulente ou atténuée étudiée (Marcelino *et al*, 2015b). De plus, parmi les protéines surexprimées chez la souche atténuée, 4 sont des isoformes de la protéine ERGA_CDS_05140. Cette porine pourrait contribuer à l'échange de petits métabolites (comme des sucres, AA) entre la bactérie et la cellule hôte et renforcer son métabolisme, ce qui expliquerait le taux de croissance supérieur de la souche atténuée par rapport à celui observé chez la souche virulente dans des conditions *in vitro* (Marcelino *et al*, 2015b).

Elle pourrait aussi avoir un rôle de récepteur membranaire impliqué dans l'adhésion aux cellules et dans leur invasion. Les protéines de membrane externe, Omp, ont été démontrées comme ayant un rôle important chez *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* ou encore *A. baumannii*, dans l'adhésion à l'hôte et l'interaction avec des récepteurs capables d'initier la phagocytose (Krishnan *et al*, 2012).

Afin d'étudier les protéines d'intérêt, ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140, et leurs rôles dans l'adhésion et l'invasion d'*E. ruminantium*, il est important de pouvoir produire des

protéines recombinantes portant des étiquettes et mimant au mieux les protéines natives, notamment par des MPTs telles que des glycosylations.

Ainsi, ces 2 protéines ont été produites sous forme recombinante grâce au système eucaryote *Leishmania tarentolae* (famille des *Trypanosomatidae*). McBride *et al* (2000) rapportent qu'*E. coli* est incapable de glycosyler la plupart des glycoprotéines.

Probablement en raison de leur mode de vie parasitaire, les structures oligosaccharidiques des glycoprotéines des *Trypanosomatidae* peuvent être similaires à celles des mammifères, c'est pourquoi ils ont émergé en tant qu'hôtes potentiels pour la production de protéines hétérologues (Niimi, 2012).

En effet, les *Trypanosomatidae* sont riches en glycoprotéines, avec un motif de glycosylation très similaire à celui des vertébrés supérieurs, bien plus complexe que chez les procaryotes, ce qui contrairement à *E. coli*, en fait un outil adapté à l'expression de protéines ayant de nombreuses MPTs, proches des protéines natives, probablement assez similaires à celles existant chez *E. ruminantium* (glycosylation) (Postigo *et al*, 2008). Au cours de ce travail, ces protéines recombinantes ont été produites avec des étiquettes GFP et histidine, ce qui a permis de tester leur adhésion et leur interaction avec d'autres molécules, ainsi que l'immunogénicité des protéines natives.

Au cours de ce projet, nous avons montré d'une part que le système eucaryote *L. tarentolae* est adapté pour la production de protéines d'*E. ruminantium* en dépassant l'écueil des MPTs. D'autre part, la caractérisation de la fonction des protéines ERGA_CDS_01230 et 05140 a permis de montrer que la recProt 05140 adhère aux BAEC uniquement lors d'une interaction directe avec la cellule hôte. En revanche, la protéine recProt 01230 est capable d'adhérer aux BAEC sous forme libre aussi bien que liée à un support et interagit avec des protéines du lysat cellulaire. Les 2 recProt sont O-glycosylées comme rapporté chez certaines adhésines pour d'autres agents pathogènes et sont immunogènes, sans toutefois savoir si cette réponse est protectrice. Enfin, l'expression du CDS ERGA_CDS_01230 semble modulée en fonction des stades de développement de la bactérie et est plus importante au stade corps élémentaire qu'aux autres stades, suggérant son implication dans la phase d'adhésion aux cellules hôtes.

Matériel et méthode

I. Production du matériel biologique

I.A. Production et contrôle qualité des protéines recombinantes

Ces protéines sont produites sous forme de protéines de fusion avec une partie GFP et une étiquette histidine.

I.A.1. Production des protéines recombinantes, recProt 05140 et recProt 01230

Les étapes de production des protéines recombinantes sont décrites en *Figure 6*.

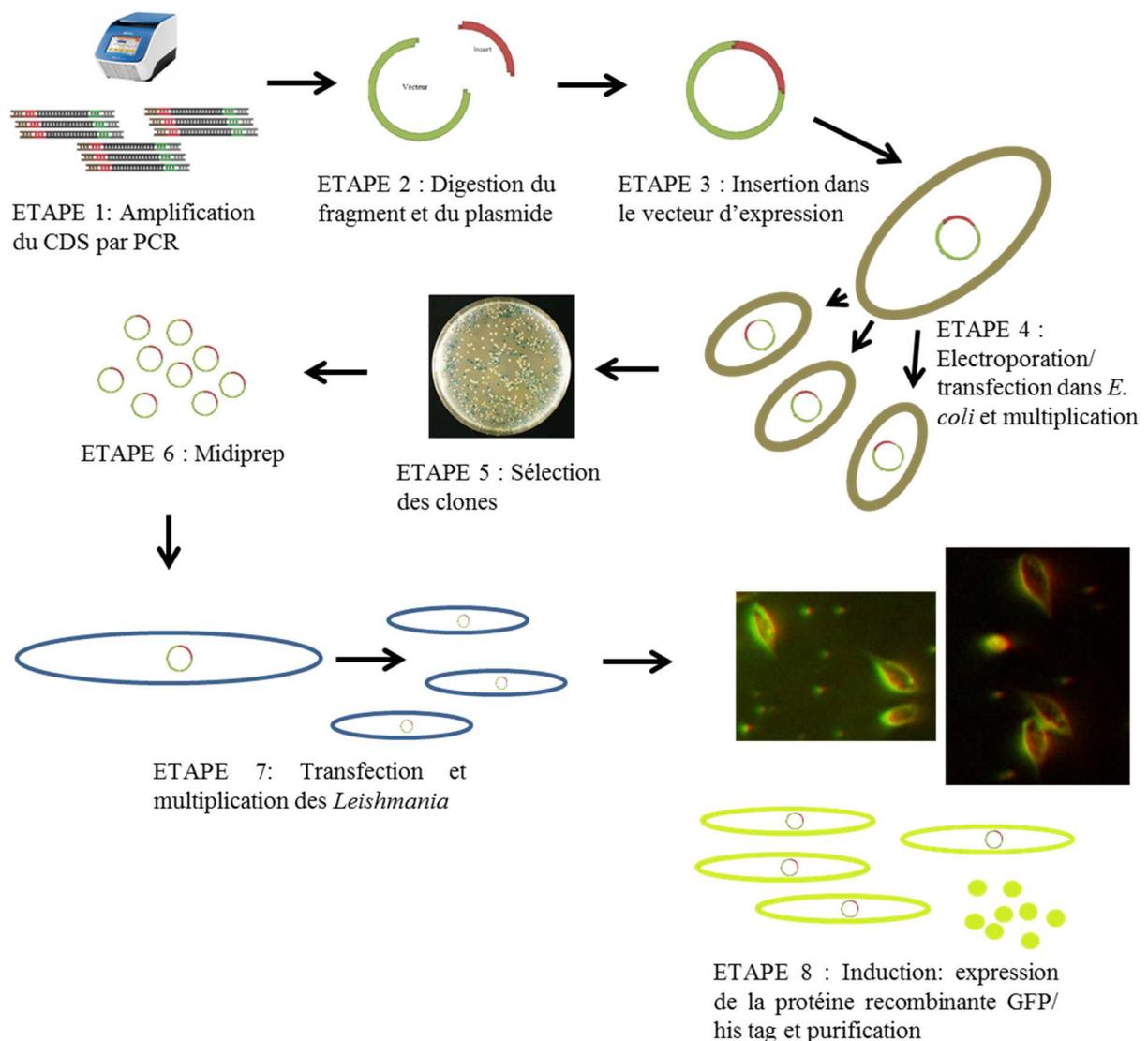


Figure 6 : Etapes de production des protéines recombinantes chez *Leishmania tarentolae*. Insertion du CDS dans le vecteur d'expression, multiplication dans *E. coli*, sélection des clones ayant intégré le plasmide et son insert. Multiplication des clones choisis, transfection dans *Leishmania* pour expression des protéines de fusion GFP avec étiquette histidine.

I.A.1.a. Production et clonage du plasmide contenant le CDS
ERGA_CDS_01230 ou ERGA_CDS_05140 dans *E. coli*.

ETAPE 1 : cette phase est nécessaire afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN à cloner. Les CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 sont préalablement amplifiés par PCR pour être séquencés (ABI 3100, ThermoFisher; séquences en *annexe 1*) afin de confirmer que le produit amplifié est bien le CDS d'intérêt avant de l'intégrer dans le vecteur d'expression.

ETAPE 2 : quatre cent nanogrammes du produit de PCR sont ensuite digérés 10 min à 37°C par les enzymes BamHI et Sali (Fermentas Fast Digest, Thermo Scientific) avant d'être purifiés avec le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey Nagel) et dosés au Nanodrop.

La digestion plasmidique de pLEXY_I-blecherry3, (séquence tenue confidentielle ; modifié par l'équipe slovaque par ajout de la séquence codant l'étiquette GFP, histidine, et le facteur Xa permettant d'ôter l'étiquette GFP) (Bioscience, 2011), pourvu d'une ORI spécifique d'*E. coli* et d'une autre spécifique de *Leishmania tarentolae*, permettant l'expression de protéines dans ces deux systèmes, est réalisée avec les mêmes enzymes. Après vérification de l'obtention d'une bande unique par électrophorèse sur gel, le produit de digestion plasmidique est purifié de la même façon que le produit de PCR après digestion.

ETAPE 3 : la ligation du CDS dans le plasmide pLEXY_I-blecherry3 est effectuée par la T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) pendant 1 h à 22°C après 5 min à 65°C et un passage dans la glace. Le ratio CDS/ plasmide à respecter est défini par la formule suivante :

$$Q_{\text{insert}} \text{ (ng)} = 5x \text{ (taille de l'insert en pb/ taille du vecteur en pb)} \times Q_{\text{vecteur}} \text{ (ng)}.$$

A l'issue de la ligation, la construction plasmide/ CDS est purifiée à l'aide du kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ». Après dosage au Nanodrop, la concentration est amenée à 50 ng/μL en vue de l'électroporation.

ETAPE 4 : la préparation des bactéries compétentes *E. coli* XL10 se fait selon Miller *et al* (1995) et Gannon *et al* (1988). Préalablement à l'électroporation, des boîtes de milieu LB (lysogeny broth ; supplémenté en carbénicilline) et du milieu SOC (super optimal broth with catabolite repression medium) sont préparés (*annexe 2*). Cent nanogrammes de plasmide sont mis en contact avec 20μL de bactéries compétentes. L'électroporation est précédée d'une incubation d'1 min dans la glace et suivie de l'ajout de 1mL de milieu SOC dans les 30 sec suivant celle-ci. Le tout est incubé 1 h à 37°C sous agitation à 300rpm.

ETAPE 5 : 100µL de la culture obtenue sont étalés sur des boîtes de Pétri au râteau. Le plasmide contenant un gène conférant une résistance à la carbénicilline, seules les bactéries ayant intégré le plasmide poussent. Afin de confirmer qu'*E. coli* a bien été transformé avec un plasmide ayant intégré l'insert, une PCR est réalisée sur une colonie diluée dans 20µL d'H₂O, incubée 10 min à 98°C, centrifugée 5 min à 13000rpm puis 5µL de surnageant sont utilisés pour l'amplification avec des amorces spécifiques flanquantes de la région d'insertion. Le plasmide ayant intégré l'insert donnera un produit de PCR correspondant à la taille de l'insert et de sa zone flanquante. Le reste du produit de PCR est utilisé pour séquençage.

ETAPE 6 : une fois des colonies de bactéries modifiées avec le plasmide pLEXSY_I-blecherry3 et son insert (CDS ERGA_CDS_01230 ou ERGA_CDS_05140) sélectionnées, le reste des colonies est utilisé pour inoculer 50mL de milieu LB contenant de la carbénicilline. L'incubation se fait pendant 16 h à 37°C sous agitation à 200rpm jusqu'à atteindre une densité optique (DO) maximale de 3. Le plasmide est ensuite isolé avec le kit « GenElute™ Plasmid Midiprep » (Sigma Aldrich) selon les recommandations du fournisseur.

I.A.1.b. Transfection et expression des recProt 01230 et recProt 05140
dans *Leishmania tarentolae*

La culture de *Leishmania tarentolae* se fait par une succession d'étapes à planifier sur plusieurs jours comme décrit dans le *Tableau 2*.

ETAPE 7 : la transfection a lieu lorsqu'une DO optimale de 1.4 est atteinte, soit $6 \cdot 10^7$ cellules/mL de milieu. L'observation microscopique permet de confirmer que les cellules sont vivantes et ont une forme de gouttelette. Après centrifugation 5 min à 2000g, une partie du surnageant est ôtée, celle restante permettant de re-suspendre le culot afin d'obtenir 10^8 cellules/mL, incubés 10 min sur la glace. L'ajout de 350µL de cellules à 0,1 à 5µg de plasmide linéarisé re-suspendu dans 50µL d'H₂O a lieu dans la cuve d'électroporation. L'électroporation se fait à 450V, 450µF avec une impulsion de 5 à 6 msec. La cuve est mise dans la glace pendant 10 min puis son contenu est transféré dans 10mL de milieu LEXSY BHI (*annexe 2*). La culture de *Leishmania tarentolae* transformée se fait ensuite selon le planning (*Tableau 2*). La croissance dans une boîte de culture couchée permet de favoriser le développement des *Leishmania*.

ETAPE 8 : lorsque l'expression est induite par la tétracycline, la protéine recombinante est directement excrétée dans le milieu. Après centrifugation 6 min à 3450rpm, la purification du surnageant se fait par dialyse avec une membrane 3.5 kDa (Serva, 44310.01) façonnée en

boudin contenant le surnageant et plongée dans une solution de polyéthylène glycol 20000 ; le tout est laissé O/N (over night ; durant la nuit) à 4°C. Le lendemain, les protéines sont concentrées puis purifiées par HPLC ou colonne Sephadex (séparation par chromatographie liquide).

Semaine	J 1	J4	J5	J6
1	<u>Matin</u> : pré-culture de <i>L. tarentolae</i> ; au 20e dans 10mL de milieu LEXSY BHI. Incubation de la TC25 à 26°C DEBOUT	<u>Matin</u> : dilution de la pré-culture au 10e dans 10mL de milieu LEXSY BHI. Incubation O/N 26°C COUCHE	<u>Fin de journée</u> : vérification de la DO (1 à 1,8) et électroporer. Incubation à 26°C O/N pour atteindre DO de 0,3-0,4	<u>12h</u> : ajout de 10µL de bléomycine (sélection). Incubation debout à 26°C
2	<u>Matin</u> : pencher la boîte de culture sur un coin. Poursuivre l'incubation	<u>Matin</u> : 5 mL de surnageant de culture, centrifugation 3min à 3450 rpm. Resuspension du culot dans 10mL de milieu LEXSY BHI (avec bléomycine). Incubation DEBOUT O/N à 26°C		
3	<u>Matin</u> : en fonction de la croissance, inoculation de 10mL de milieu LEXSY BHI au 10 ^e ou 20 ^e avec la culture du lundi	5mL de culture + 45mL LEXSY BHI + bléomycine + tétracycline pour induire l'expression. 26°C, agitation 100rpm pendant 72-96h		

Tableau 2 : Culture de *Leishmania tarentolae*, de la mise en culture à l'expression des protéines recombinantes.

De J1 à J5, culture des *Leishmania* jusqu'à l'obtention d'une DO de 1- 1,8 puis électroporation. A partir de J6, sélection et multiplication des *Leishmania* ayant intégré le vecteur par ajout de bléomycine. Semaine 3, J4, initiation de l'expression par ajout de tétracycline.

I.A.2. Contrôle qualité des protéines recombinantes

Avant emploi dans les différents tests, il est important de connaître la concentration des protéines et de confirmer leur taille, leur pureté et la présence des étiquettes histidine et GFP.

I.A.2.a. Taille et concentration

La taille des protéines recombinantes a été vérifiée *via* le MALDI TOF (Microflex, Bruker).

Les protéines ont été reçues en solution en imidazole. Elles ont été préalablement filtrées sur AMICON ultra-4 (Merck Milipore) par centrifugation 20 min à 3500g et re-suspendues dans du PBS 1x. Le dosage de protéines a été réalisé avec le kit « Quantipro BCA » (Sigma Aldrich).

I.A.2.b. Contrôle de fluorescence des protéines par agrégation sur résine Probond

Vingt μL de résine (Probond purification system, Novex) sont rincés avec 1mL d' H_2O , qui est ôté après 3 min de centrifugation à 800g. Cette opération est répétée avec 1mL de tampon dénaturant de fixation, pH 7,8. La fixation des protéines recombinantes à la résine se fait par ajout à la résine, de 70 μL de tampon dénaturant de fixation, pH 7,8 et de 1,5 μL de protéine recombinante ; l'incubation se fait sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante (TA). Après centrifugation, quelques gouttes du culot sont déposées entre lame et lamelle pour observation au microscope à fluorescence (filtre GFP, Leica DM2000).

I.A.2.c. Vérification de la présence des étiquettes GFP et histidine par immuno-blotting

Une membrane PVDF (Amersham, Hybond-P) est découpée en fonction du nombre d'échantillons à tester. Elle est trempée 30sec dans du méthanol (Normapur) et rincée dans de l' H_2O puis du PBS 1x. Une feuille de papier filtre de même dimension que la membrane est superposée avec une autre feuille humidifiée avec du PBS 1x, avant d'y déposer la membrane. Différents dépôts de $\sim 1,5\mu\text{L}$ de protéines et de l'anticorps sont effectués (ce qui permet de vérifier l'intégrité de l'enzyme si aucun autre dépôt ne se colore). Une fois les dépôts secs, le blocage de la membrane se fait sous agitation, à TA, pendant 1 h dans du TTBS 1x BSA 2% (*annexe 3*). Trois rinçages de 5 min sont effectués avec du TTBS 1x. L'anticorps anti-GFP (Thermofisher) est ajouté au 5000^e dans du TTBS 1x BSA 1% et incubé 1 h à TA sous agitation douce. Trois rinçages de 5 min sont effectués avec du TTBS 1x puis la révélation se réalise avec 4,5mL de substrat de peroxyde (Pierce Thermofisher) + 0,5mL chromogène DAB (Thermofisher). L'HRP, si l'anticorps s'est fixé à la protéine, va oxyder le substrat en un composé insoluble brun.

Pour confirmer la présence de l'étiquette histidine, le même processus que pour l'étiquette GFP est mis en œuvre mais l'anticorps anti-GFP est remplacé par la sonde anti-histidine au 5000^e (Thermofisher).

I.A.2.d. Test de la glycosylation des deux protéines recombinantes

Les protéines recombinantes recProt 01230 et 05140 sont migrées sur un gel d'acrylamide « SDS page » (NuPAGE bis-tris, Novex) en fonction de leur poids moléculaire pendant 2 h 30 à 100V et 400mA dans du tampon MOPS (Novex) et selon les instructions du fournisseur (NuPAGE Technical Guide). Environ 10µg de chaque protéine sont dénaturés à 70°C pendant 10 min avec du tampon LDS et un agent réducteur (Novex) puis migrés en parallèle du marqueur de poids moléculaire de 3 à 198 kDa (SeeBlue plus 2, Invitrogen).

Vingt minutes avant la fin de la migration, il faut préparer la membrane PVDF (Amersham, Hybond-P) ainsi que les papiers filtre (Whatman). Une membrane de la taille du gel ainsi que 2 papiers filtre de la même dimension sont découpés ; la membrane est trempée pendant 30 sec dans le méthanol (Normapur) puis incubée dans le tampon de transfert (20x, NuPAGE) pendant au moins 15 min avec les papiers filtre et 4 éponges.

A la fin de la migration, le support de gel est ouvert à l'aide d'une spatule. Un papier filtre est placé sur le gel, qui est détaché doucement de son support, étape délicate. La partie haute du gel correspondant aux puits est coupée, ainsi que les autres parties non utilisées du gel et le montage se poursuit selon le guide technique NuPAGE. Toutes les bulles présentes entre les différentes couches doivent être chassées. Une fois le module de transfert fermé, il est mis sous tension à 30V pendant 1 h 15 à 170mA.

A l'issue du transfert, la membrane peut être plongée dans une solution de rouge Ponceau (AMRESCO) ~1 min, l'opération étant suivie d'un rinçage à l'eau. La photo est ensuite prise dans le lecteur de gel ; le gel peut être quant à lui coloré au bleu de Coomassie (Simply blue, Thermofisher), qui se lie aux protéines par des interactions ioniques entre les groupes d'acides sulfoniques et les groupements amines chargés positivement ainsi que par les forces de Van der Waals. Le gel est d'abord rincé pendant 10 min dans de l'H₂O, puis mis en agitation douce dans le colorant. Le rinçage a lieu dans de l'eau sous agitation douce O/N à TA. La lecture se fait à l'aide du lecteur de gel (Amersham), par colorimétrie. Cela permet de vérifier l'efficacité du transfert.

La membrane est ensuite bloquée 3 h à TA sous agitation dans du PBS (pH7.4), 0,05% de tween 20 avec 5% de lait. L'incubation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc (sc-59623, Santa Cruz) au 200^e se fait O/N dans du PBS tween lait. 3 lavages de 10 min sont réalisés avec du PBS tween. La membrane est ensuite incubée 1 h avec un anticorps anti-souris (IgM-HRP, Molecular probes) au 1000^e dans du PBS tween. 3 lavages de 10 min sont réalisés avec du PBS tween avant ajout du substrat TMB (Pierce) et le développement de la couleur est attendu pour effectuer la lecture au lecteur de gel.

I.A.3. Prédiction de la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes, de leur localisation et du site de fixation potentiel d'un ligand

La structure 3D ainsi que les domaines de fixation des ligands sont déterminés par les logiciels « COACH » et « COFACTOR » via « I-TASSER » (Yang *et al*, 2015) à partir des séquences protéiques (*annexe 4*). L'homologie de structure des protéines est déterminée grâce à « Swiss model, Expasy » (Biasini *et al*, 2014). La localisation subcellulaire des protéines est prédite par le logiciel « CELLO 2.5 : subCELLular LOcalization predictor » (Yu *et al*, 2006), à partir de la saisie de la séquence en AA de la protéine. La prédiction de la topologie des hélices transmembranaires est générée grâce au logiciel « Phyre2 : Protein Homology/analogy Recognition Engine » (Kelley *et al*, 2015).

I.B. Production des BAEC et des échantillons d'*E. ruminantium*

Les BAEC sont cultivées en routine pour la multiplication d'*E. ruminantium*, pour la préparation de lysats cellulaires, l'extraction des différentes fractions cellulaires, les tests *in vitro* de marquage des cellules en cytométrie en flux (Michelon *et al*, 2006) avec les protéines recombinantes ou encore des tests d'adhésion.

I.B.1. Culture des BAEC

Les BAEC (passage 24 à 29) sont cultivées en milieu Mc Pherson, BHK21 (Eurobio, *annexe 5*) à 37°C et 5% de CO₂ après sensibilisation des boîtes ou plaques de culture (Falcon) avec de la gélatine 0,2% pour favoriser la fixation des BAEC comme décrit précédemment par (Marcelino *et al*, 2005). La trypsination (trypsine- Versène, Eurobio) des cellules dans de nouveaux flacons de culture cellulaire est réalisée 2x par semaine avec une dilution au 1/2 des cellules à confluence. La boîte à multiplier est d'abord rincée avec 2mL de PBS 1x (Eurobio),

volume adapté pour une TC 25 cm². Un millilitre de trypsine est ensuite mis en contact du tapis puis immédiatement ôté. 1mL de trypsine est ensuite incubé sur le tapis cellulaire pendant ~2 min à 37°C et permet aux cellules de se décrocher du fond de la boîte. Puis, un volume de milieu BHK21 au moins équivalent au volume de trypsine est ajouté. Le volume obtenu est réparti dans 2 nouvelles boîtes après une homogénéisation permettant de dissocier les amas de cellules (Marcelino *et al*, 2005).

Il est recommandé de ne pas utiliser de BAEC au-delà du passage 30 afin d'éviter le risque de dégénérescence.

I.B.2. Production des échantillons d'*E. ruminantium* au cours du temps (Figure 7)

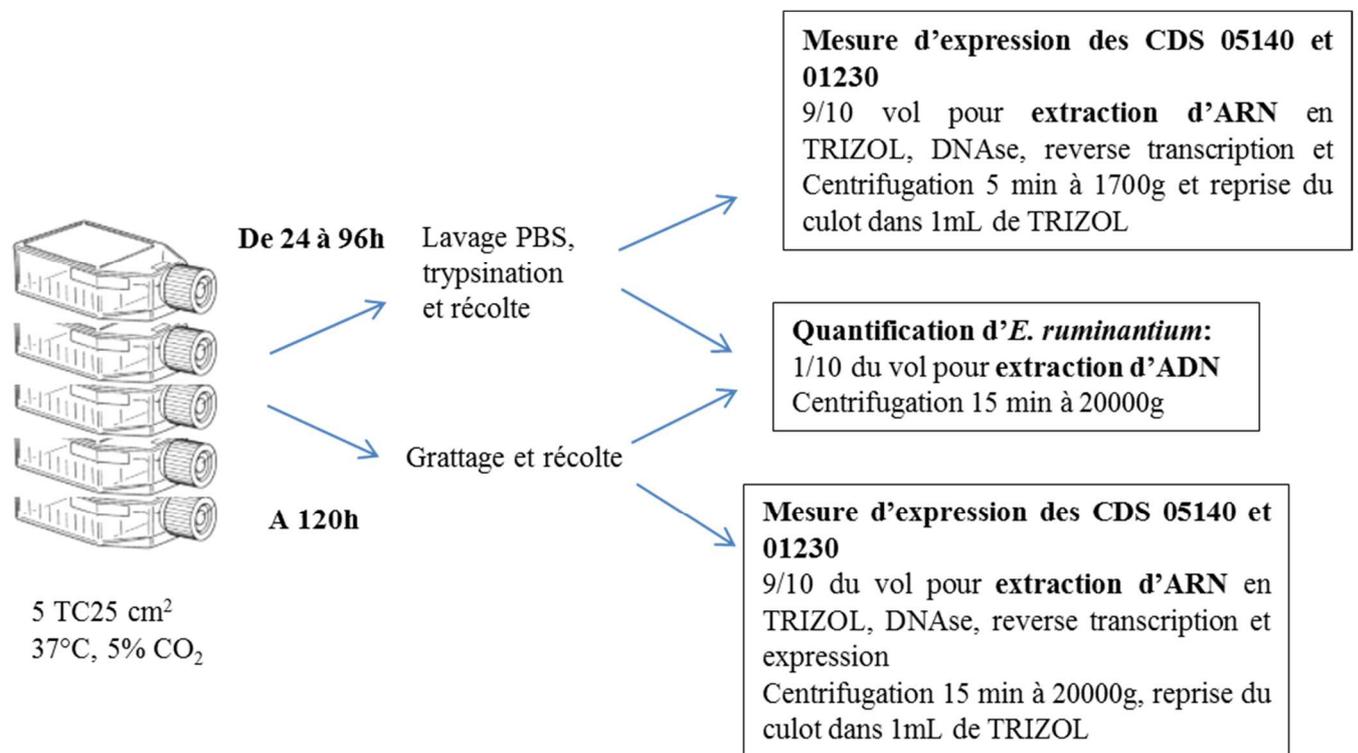


Figure 7 : Production des échantillons biologiques pour la quantification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d'*E. ruminantium*.

Toutes les 24 h, 9/10^e d'une TC 25 cm² utilisés pour l'extraction d'ARN en TRIZOL et quantification des transcrits ERGA_CDS_01230 et 05140 ; 1/10^e utilisé pour l'extraction d'ADN et la mesure de la charge bactérienne. Le traitement des 9/10^e destinés à l'extraction d'ARN diffère à 120 h, le surnageant est centrifugé à haute vitesse pour récupérer les corps élémentaires libres.

En fonction des expériences, *E. ruminantium* est cultivée en TC25, 75 ou 175 cm², en plaque 24 (2cm²) ou 96 puits (0.32cm²) (Nunc). Cette bactérie intracellulaire est très labile et sa croissance est fortement impactée par l'état physiologique de son hôte. De même, la croissance

des BAEC est influencée par les conditions environnementales dans lesquelles elles se développent.

Pour être inoculées avec *E. ruminantium*, les BAEC doivent être fraîchement confluentes, ne pas avoir de forme allongée ; le milieu doit avoir été renouvelé le jour précédent. L'infection par *E. ruminantium* se fait à partir d'un cryotube conservé en azote et issu de la congélation d'une boîte de culture de même capacité au stade de lyse cellulaire. Le milieu est renouvelé 24h après inoculation, puis toutes les 48 h. L'obtention de cinétiques synchrones, c'est-à-dire qui lysent à 120 hpi (heures post infection) est cruciale pour les mesures d'expression par exemple et garantit que les bactéries présentes à un temps donné sont bien au même stade. Dans de bonnes conditions, cette synchronisation est généralement obtenue 2-3 passages après décongélation. Lors de la lyse, le fond de la boîte est totalement gratté et le tout est récupéré. Les dernières cellules sont explosées à l'aide d'une seringue et de 2 aiguilles ; l'une de 18G qui permet une 1^{ère} homogénéisation et l'autre de 26G. La réinfection d'une nouvelle boîte se fait par inoculation au 20^e du volume de la boîte (300µL pour une TC 25 cm² contenant 6mL de milieu).

II. Caractérisation des protéines recProt 01230 et 05140 d'*E. ruminantium*

II.A. Test d'adhésion des protéines recombinantes aux BAEC

II.A.1. Visualisation de l'adhésion de protéines recombinantes aux BAEC par microscopie électronique à balayage.

La visualisation des protéines recombinantes à la surface des cellules a été réalisée grâce à la microscopie électronique à balayage (Mohan Kumar *et al*, 2013) en utilisant des billes en latex. Des billes de latex à groupement sulfate, de 0,5µm à fluorescence orange ou de 0,1µm à fluorescence rose (Sigma Aldrich) sont d'abord adsorbées avec les protéines recombinantes recProt 01230 et recProt 05140 par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques *via* les charges négatives de surface des billes. A partir de ce qui a été décrit par Martinez *et al* (2014), 10¹⁰ billes (pour les billes de 0,1µm) et 7x10⁹ billes (pour les billes de 0,5µm) sont adsorbées avec 100 µg/mL de protéines recombinantes dans 1mL de MES 25mM, pH 6,1 (Sigma Aldrich) pendant 4 h à TA sous rotation lente. 3 lavages sont ensuite effectués avec du MES 25mM, pH 6,1 et précédent la re-suspension dans 1mL de MES BSA 1%.

Des plaques 24 puits dans lesquelles sont déposées des lamelles de 13 mm de diamètre (VWR), sont ensemencées avec des BAEC, sans gélatine. Un dépôt de $1,82 \times 10^8$ et $4,57 \times 10^9$ billes de $0,1 \mu\text{m}$ ou $1,82 \times 10^8$ billes de $0,5 \mu\text{m}$ est réalisé par puits en solution dans du milieu BHK21. Le témoin négatif est constitué de billes sans protéine recombinante incubées avec les BAEC. La plaque est centrifugée 5 min à 200g à TA. L'incubation se fait entre 30 et 120 min à 37°C et 5% de CO_2 . Trois lavages avec du PBS 1x permettent d'ôter l'excès de billes non fixé puis le tout est fixé O/N avec du paraformaldéhyde 2%, qui fige l'activité biologique de la cellule. Le lendemain, les lamelles sont retirées de chaque puits et sont déshydratées par passage dans 4 bains successifs d'acétone à 30, 50, 70, 95% et 3 bains à 100% de 6min chacun.

Les échantillons sont ensuite desséchés en remplaçant d'abord l'acétone par du CO_2 liquide, lui-même remplacé par du CO_2 gazeux une fois le point critique atteint. Trois bains successifs de 20 min dans du CO_2 liquide ont lieu à froid dans la chambre de séchage (LEICA EM CPD030), entrecoupés de 3 lavages avec du CO_2 liquide ; l'échantillon ne doit jamais être à sec. La température et la pression sont ensuite amenées respectivement à 31°C et 74bar, caractéristiques du point critique du CO_2 . Une fois celui-ci atteint, le dégazage se fait très lentement jusqu'à une diminution totale de la pression. La chambre de séchage est alors vide et les échantillons secs et fixés sur la lamelle, prêts pour la métallisation (Cressington sputter coater). Les lamelles sont d'abord collées sur un support circulaire. Une fine couche d'or de 3-4 nanomètres est déposée sous gaz neutre argon après avoir retiré l'ensemble des atomes de l'enceinte à l'aide de 40 mbar de pression, sur le support qui tourne lentement pour obtenir une répartition homogène de la couche d'or.

Le support est ensuite installé dans le microscope électronique environnemental (FEI Quanta 250) pour la lecture.

II.A.2. Visualisation de l'adhésion de protéines recombinantes aux BAEC par cytométrie en flux

Le cytomètre en flux permet de visualiser la fixation de molécules fluorescentes à la surface des cellules (Lundberg *et al*, 2003). Des plaques 6 puits ($9,6 \text{ cm}^2$ / puits) avec des BAEC à confluence sont incubées pendant 2 h à 37°C , 5% de CO_2 avec des concentrations en protéines allant de 7,7 à $123,9 \mu\text{g/mL}$ pour recProt 05140 et de 6,4 à $102,4 \mu\text{g/mL}$ pour recProt 01230. Le témoin négatif est constitué de cellules non incubées avec les protéines recombinantes. Après incubation, chaque puits est rincé avec 1mL de PBS 1x, ensuite aspiré. 1,5mL de PBS 1x servent ensuite à gratter le puits pour récupérer les cellules remises en suspension dans de

l'Isoflow après centrifugation à 200g pendant 10 min à 4°C et avant lecture au cytomètre (FC500, Beckman Coulter).

Cette expérience permet de vérifier s'il y a une adhésion des protéines recombinantes aux BAEC par la mesure des cellules marquées fluorescentes. Le cytomètre permet de vérifier si les cellules sont marquées et de mesurer les propriétés des cellules (taille, granulométrie, fluorescence).

II.B. Caractérisation de l'interactant intervenant dans l'adhésion des protéines aux BAE

II.B.1. « Pull down » pour recherche de l'interactant de la protéine recombinante

Le principe est d'utiliser la protéine recombinante fixée sur un support (résine) comme appât afin de mettre en évidence un ligand potentiel (Bencurova *et al*, 2015).

II.B.1.a. Préparation du lysat cellulaire

Une boîte de culture de 175 cm² contient entre 1 et 1,5 mg de protéines totales de cellules. Le milieu BHK21 est ôté, la boîte est lavée avec 5mL de PBS 1x contenant de l'anti-protéases (Roche) ensuite retirés. On ajoute ~10mL de PBS 1x froid et un grattoir détache doucement le tapis cellulaire. Le but étant aussi d'investiguer les interactions de surface, l'utilisation de la trypsine n'est pas recommandée car elle coupe les liaisons des cellules avec le support et des cellules entre elles. Une centrifugation à 200g pendant 10 min à 4°C précède le retrait du surnageant. Le culot peut être congelé à -80°C.

En fonction des conditions choisies (dénaturantes ou natives), les tampons diffèrent mais le mode opératoire reste le même.

Dans des conditions dénaturantes, on ajoute de 2mL de tampon guanidinium (pH 7,8 ; Probond purification system, Novex) avant de vortexer 5 min, voire plus si nécessaire jusqu'à dissolution complète du culot cellulaire. Après centrifugation pendant 15 min à 15000g, 4°C, les protéines se trouvent dans le surnageant.

Dans les conditions natives, la lyse du culot s'effectue par l'ajout de 2mL de tampon de lyse (*annexe 6*), pH 7,4 puis on procède à 4 cycles de « congélation/ décongélation » en plongeant

le lysat 2 min dans un bain d'éthanol et de glace, puis 2 min dans un bain marie à 37°. Le lysat est vortexé entre chaque bain. L'ADN est cassé en passant le lysat plusieurs fois par une aiguille 18G à l'aide d'une seringue. Les débris cellulaires sont culotés à 10000g pendant 30 min puis le surnageant est transféré dans un nouveau tube.

Chaque lysat est nettoyé à l'aide d'1mL de résine Probond, capable de lier 1 à 5 mg de protéines. Cette résine constituée de billes de 45 à 165 microns est chargée d'ions Ni²⁺ très affins pour les protéines de fusion possédant une étiquette histidine.

Deux fois 1mL de résine sont centrifugés à 800g puis on ôte le surnageant. Un lavage est effectué avec 2mL d'H₂O ; une homogénéisation de 2-3 min sous rotation lente précède la centrifugation à 800g pendant 3 min avant d'ôter le surnageant. Selon les conditions choisies, on ajoute 2mL de tampon de fixation dénaturant (pH 7,8) ou natif (pH 8). Une homogénéisation de 2-3 min sous rotation lente précède la centrifugation à 800g pendant 3 min avant d'ôter le surnageant. Cette dernière opération est répétée ; l'incubation avant la centrifugation peut être plus longue (jusqu'à 30 min). Pour 1mL de résine, 1mL de lysat cellulaire est ajouté puis l'incubation se fait 48 h à 4°C. La résine est changée afin d'éliminer un maximum de protéines capables de se fixer à la résine, en la conditionnant comme mentionné ci-dessus et l'incubation est encore poursuivie pendant 48 h. Le lysat est ensuite prêt pour le « pull down ».

II.B.1.b. « Pull down »

Pour chaque condition (dénaturante ou native), 2 témoins sont utilisés : le témoin négatif constitué de « résine + lysat » et le témoin « protéine » constitué de « résine + protéine recombinante ». Cela permet de réaliser une discrimination des bandes par rapport à celles qui pourraient apparaître suite à la capture éventuelle d'un ligand par la protéine recombinante. La condition dénaturante est basée sur des variations de pH des différents tampons, pH décroissant au fur et à mesure du protocole. Le protocole natif est quant à lui basé sur l'ajout d'imidazole en concentration croissante, du tampon de lavage au tampon d'élution (l'imidazole induit une compétition en diminuant la fixation de protéines contaminantes).

Pour chaque témoin et essai, 500µL de résine sont conditionnés comme décrit lors du nettoyage du lysat ; les quantités de tampon peuvent être divisées par 2 par rapport à ce qui a été décrit précédemment. La résine est reprise dans 1mL de tampon de fixation dans lequel sont ajoutés 250 mg/mL de protéine recProt ; l'incubation se fait à TA pendant 1 h sous rotation lente. Cette étape permet la fixation de la protéine recombinante à la résine *via* son étiquette histidine. Le

surnageant est récupéré après centrifugation 3 min à 800g et suivi de 2 lavages avec 2mL de tampon de lavage dénaturant (pH 6) ou natif (pH 8 + 20 mM d'imidazole). Après homogénéisation de 3-4 min sous rotation lente et centrifugation à 800g, le surnageant est ôté et l'étape répétée. La résine est reconditionnée par 2mL de tampon de liaison incubés quelques minutes puis le surnageant après centrifugation est remplacé par 1mL de lysat cellulaire nettoyé ou non. L'incubation se fait O/N à 4°C sous rotation lente. L'interactant de la cellule hôte s'il est présent à la surface ou dans la cellule endothéliale pourra se fixer à la protéine recombinante, elle-même liée à la résine. Après incubation, la résine est centrifugée 3 min à 800g et le surnageant est stocké.

Trois lavages avec le tampon de lavage dénaturant ou natif éliminent tous les éléments non fixés ; une homogénéisation de quelques minutes sous rotation lente est suivie d'une centrifugation à 800g pendant 3 min avant d'ôter le surnageant ; cette opération est encore répétée 2 fois.

L'élution se fait par ajout de 2mL de tampon d'élution dénaturant (pH 4) ou natif (pH 8 + 250mM d'imidazole). Une incubation de 5 min se fait sous rotation lente, suivie d'une centrifugation à 800g. Le surnageant doit impérativement être conservé. En effet, le tampon d'élution coupe la liaison entre la protéine et la résine d'une part, mais aussi celle entre la protéine recombinante et son ligand éventuel. Cette opération est répétée 1x. L'éluat est ensuite concentré à 3500g pendant 30 min dans des AMICON Ultra-4 (Merck Milipore) dont le seuil d'exclusion est 10000 Daltons.

Un gel d'acrylamide « SDS page » (NuPAGE bis-tris, Novex) est ensuite réalisé dans les mêmes conditions que pour les tests de glycosylation, à partir de ~18µL de chaque éluat dénaturés à 70°C pendant 10 min avec du tampon LDS et un agent réducteur (Novex). Le lysat cellulaire brut ainsi que la protéine recombinante n'ayant pas subi de « pull down » peuvent être migrés en parallèle.

Les bandes obtenues pour l'éluat « résine + protéine recombinante + lysat » sont comparées à celles obtenues avec la protéine ou le lysat quand ils sont fixés seuls sur la résine. Les bandes obtenues pour la condition « résine + protéine recombinante + lysat » et qui n'apparaissent pas dans l'éluat de la protéine et du lysat seuls, pourraient constituer des bandes d'intérêt. Il est donc intéressant d'analyser ces probables ligands de la protéine recombinante par spectrométrie de masse (Orbitrap, Q-Exacte Plus, Thermo Fisher Scientific. Spectromètre de masse LC MS

de type quadripôle trappe orbitale à transformée de Fourier, de haute résolution, haute précision et haute sensibilité).

Les données obtenues et analysées par le logiciel « MaxQuant » (Cox *et al*, 2008) ont préalablement été débarrassées de tous les contaminants présents dans la protéine recombinante, mais aussi de la kératine, et de certains résidus bovins qui ne peuvent être considérés comme des ligands potentiels. Le tri des données restantes s'est ensuite basé, pour chaque protéine, sur le nombre de peptides identifiés, le nombre de protéines dans lesquelles ils ont été identifiés et le nombre de peptides spécifiques à cette protéine. Le nombre de peptides identifiés doit préférentiellement être de 1 ; plus le nombre de peptides spécifiques sera élevé, plus l'identification de la protéine sera spécifique.

II.B.2. Mise en évidence d'interactions entre recProt 01230 et les fractions et du lysat cellulaire par « Far Western blot »

Comme décrit par Hall (2015), les interactions protéines-protéines peuvent être mises en évidence par migration d'un lysat cellulaire, transfert sur membrane et incubation avec une protéine recombinante d'intérêt.

II.B.2.a. Préparation des fractions et du lysat cellulaire

Le lysat de BAEC est préparé dans les conditions natives, de façon similaire à ce qui a été pratiqué pour le « pull down », voir paragraphe B) 1) a). Un culot de BAEC d'une TC175 est lysé dans 3mL de tampon de lyse natif.

Les fractions cellulaires sont extraites en utilisant le kit d'extraction "ProteoExtract Subcellular Proteome extraction kit" (Calbiochem/ MERCK). L'extraction est faite sur une boîte de culture TC175 cm² selon les instructions du fournisseur. Ce kit permet l'extraction de 4 fractions différentes : la fraction 1, F1, contient les composants du cytosol ; la fraction 2, F2, contient les composants des membranes et organelles ; la fraction 3, F3, contient les composants du noyau, la fraction 4, F4, le cytosquelette. Les différentes fractions sont obtenues dans des conditions natives puis mises en acétone (au moins 5x le volume de fraction extrait) avant précipitation durant une nuit à -20°C. Cette précipitation permet d'ôter tous les détergents utilisés pour l'extraction capables d'interférer dans la suite du protocole. Le lendemain, les culots sont re-suspendus dans 500µL de tampon de lyse natif utilisé dans le « pull down » après centrifugation pendant 20 min à 15000g, à 4°C.

II.B.2.b. « Far Western blot »

Dix-huit μL de chaque fraction cellulaire et $35\mu\text{L}$ de lysat sont migrés sur gel d'acrylamide, avec ajout de LDS mais sans ajout d'agent réducteur ni chauffage, dans les mêmes conditions que pour les tests de glycosylation, de même que pour le transfert sur membrane PVDF.

La membrane est conservée dans du TTBS 1x (*annexe 3*) puis bloquée 1 h à TA sous agitation douce dans du TTBS 1x BSA 2% et enfin rincée 3x pendant 5 min avec du TTBS 1x. La membrane est scellée dans des pochettes transparentes où est ajouté 1mL de protéine recombinante à 0,5 mg/mL dans du TTBS 1x BSA 1%. L'incubation se fait O/N à 4°C sous rotation lente. Le témoin négatif (sans protéine recombinante) est incubé avec du TTBS 1x BSA 1%. Le lendemain, la membrane est lavée 3x pendant 5 min avec du TTBS 1x, puis incubée avec l'anti-HRP au 1000^e 1 h à TA sous agitation dans du TTBS 1x BSA 1%. La membrane est encore lavée 3x pendant 5 min avec du TTBS 1x.

La fixation de l'anti-HRP est révélée par l'ajout de 4,5 mL de substrat de peroxide (Pierce Thermofisher) + 0,5mL chromogène DAB (Thermofisher) et l'incubation est de 10 min à TA. La lecture de la membrane se fait par colorimétrie.

Une autre façon de révéler la fixation des protéines recombinantes aux fractions ou au lysat cellulaire est d'utiliser l'anticorps anti-GFP. Les étapes sont les mêmes que pour l'anti-HRP. L'anticorps anti-GFP est dilué au 2500^e.

II.B.2.c. Etude du rôle des glycosaminoglycanes dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux BAEC

Mise en évidence d'une interaction avec l'héparane sulfate par ELISA

Différentes concentrations d'héparane sulfate (Kobayashi *et al*, 2010 ; Jonquieres *et al*, 2001) et de protéines recombinantes sont adsorbées dans des puits de plaques Nunc Maxisorp : 10, 5, 1 et 0,3 $\mu\text{g/mL}$ pour l'héparane ; 18, 9 et 4,5 $\mu\text{g/mL}$ pour recProt 01230 ; 43, 22 et 11 $\mu\text{g/mL}$ pour recProt 05140 ainsi que du lysat cellulaire au 10^e. L'adsorption se fait dans 50 μL de tampon carbonate/ bicarbonate pH 9.6 1 h à 37°C sous agitation douce puis O/N à 4°C.

Le lendemain, on procède à 3 lavages avec 200 μL de PBS tween 20 0,05% par puit. Le blocage se fait 1 h à 37°C sous agitation avec 100 μL de tampon de blocage PBS tween 20 0,05% lait 3%, suivi de 3 lavages avec 200 μL de PBS tween 20 0,05% par puits. On ajoute 50 μL de protéine recombinante recProt 01230 à 14,3 $\mu\text{g/mL}$ ou 50 μL de protéine recombinante recProt

05140 à 17,3 µg/mL selon les puits dans du PBS tween 20 0,05% lait 3% ; l'incubation a lieu 1 h à 37°C sous agitation. Trois lavages de 200µL de PBS tween 20 0,05% par puits sont effectués. Ensuite 50µL d'anticorps anti-GFP au 4000^e sont déposés par puits dans du PBS tween 20 0,05% lait 3% pour 1 h à 37°C sous agitation. Les lavages sont répétés comme ci-dessus. La révélation est faite avec 200µL de substrat TMB pendant 30 min à 37°C puis la réaction est stoppée en ajoutant 100µL de H₂SO₄ 2N. La lecture se fait à 450 nm (Multiskan, Thermofisher). La composition du PBS et tampon d'adsorption sont détaillés en *annexe 7*.

Rôle des GAGs dans l'infection par E. ruminantium

L'héparinase dégrade l'héparine ainsi que les domaines S de l'héparane sulfate tandis que la chondroïtinase dégrade la chondroïtine sulfate et le dermatan sulfate.

Des puits de 2cm² sont inoculés avec ~1,1x10⁴ BAEC dans 500µL de milieu BHK21. Lorsque la confluence est atteinte, plusieurs conditions sont testées (Rajas *et al*, 2017 ; Sava *et al*, 2009) :

- de l'héparinase I et III à 0,2U, 1U et 2U/ mL est incubée avec les BAEC 10 min avant infection au 20^e. 1 h après celle-ci, un nouvel ajout d'enzyme est effectué à la même concentration. Le milieu est renouvelé 2 h après infection.

- de la chondroïtinase à 0,2U, 0,4 et 0,9U/ mL 2 h avant infection sont incubées avec les BAEC respectivement dans du PBS 1x et du milieu BHK21 sans sérum de fœtus de bovin (SBF). Le milieu est renouvelé par du BKH21 normal juste avant infection au 20^e puis 2 h après infection

Une observation microscopique est effectuée tous les jours pour comparer l'infection entre les puits n'ayant subi aucun traitement, ceux traités par les enzymes, ceux ayant uniquement été infectés et ceux ayant subi le traitement enzymatique et l'infection. Lors de la lyse, la totalité des puits est grattée, centrifugée 15 min à 20000g et les culots sont conservés pour des quantifications ultérieures du nombre de bactéries présentes par puit. Le culot est extrait à l'aide du « QiaAmp DNA minikit » (Qiagen), puis la quantification est réalisée par qPCRTM Sol1, ciblant la région *pCS20* (Cangi *et al*, 2017). L'hybridation se fait à 55°C et l'amplification donne un produit de PCR de 110pb. L'exploitation des résultats se fait par la méthode des $\Delta\Delta Ct$, représentés en $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

II.C. Cinétique d'expression des gènes ERGA_CDS_05140 et ERGA_CDS_01230

II.C.1. Production du matériel biologique

Pour chaque cinétique, 5 boîtes de culture TC25 cm² sont infectées avec *E. ruminantium*, souche Gardel virulente passage 38, 55 et 56. Une boîte est récoltée toutes les 24 h et traitée conformément à la *Figure 7* jusqu'à la lyse à 120 hpi.

II.C.2. Extraction d'ADN et d'ARN

L'ADN est extrait avec le « QiaAmp DNA minikit » (QIAGEN) après reprise du culot dans 200µL de PBS 1x.

Pour l'extraction d'ARN, les échantillons sont dégelés à TA. Deux cents µL de chloroforme (Normapur) sont ajoutés à l'échantillon ; les tubes sont refermés très rapidement et agités vigoureusement, devenant bien rose. La centrifugation à 12000g pendant 10 min à 4°C intervient après avoir laissé reposer le tube pendant 2-3 min à TA. La phase aqueuse est rapidement prélevée sans toucher au film blanchâtre contenant l'ADN et transférée dans un nouveau tube. Le tube est conservé O/N à -20°C après ajout de 500µL d'isopropanol et homogénéisation. Le lendemain, le culot d'ARN, après centrifugation 10 min à 12000g 4°C, est lavé avec 1mL d'éthanol (Normapur) à 75%. Le culot est séché 5-10 min après centrifugation à 7500g pendant 5 min à 4°C, jusqu'à ce qu'il devienne translucide, et est repris dans 100µL d'H₂O RNase/ DNase free (Thermofisher) avant dosage au Nanodrop.

II.C.3. Traitement à la DNase et reverse transcription

Le traitement DNase se fait à l'aide du kit « Turbo DNA Free » (Ambion), selon les instructions du fournisseur. L'ARN traité à la DNase est précipité en ajoutant à chaque échantillon 261µL d'une solution contenant 2.5 fois le volume d'ARN en éthanol absolu (Normapur) froid, 1/10 du volume d'ARN en acétate de sodium 3M et 1µL de glycogène à 10 mg/mL (Thermofisher). Conservation O/N à -20°C.

Le lendemain, le surnageant est lavé avec 1mL d'éthanol à 75% après centrifugation 10 min à 13000 t/min, 4°C. Une nouvelle centrifugation 7 min à 10000 t/min, 4°C précède le séchage du culot à l'air pendant 10 min maximum. Il est ensuite repris dans 20µL d'H₂O et dosé au Nanodrop. La perte liée à l'étape DNase est estimée à 30%.

La reverse transcription est réalisée avec « SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit » (Invitrogen), selon les spécifications du fournisseur, à partir de 2µg d'ARN.

II.C.4. Quantification du nombre de bactéries à chaque temps et des cDNA correspondants pour les ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140

II.C.4.a. Quantification du nombre d'*E. ruminantium* à chaque temps prélevé

La quantification est réalisée par qPCR™ Sol1, ciblant la région *pCS20*, très conservée et présente en un seul exemplaire sur le génome (Cangi *et al*, 2017). Le standard est une dilution sérielle de raison 10 d'un ADN dont le nombre de copies du gène cible est connu. L'hybridation se fait à 55°C et l'amplification donne un produit de PCR de 110pb.

II.C.4.b. Quantification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d'*E. ruminantium* au cours du cycle de croissance

La quantification est effectuée par qPCR Sybergreen, utilisant des amorces dérivées à l'aide de « Primer 3 » sur les séquences de la souche Gardel virulente (NC_006831.1). La probabilité d'obtention de dimères d'amorces et de boucles d'appariement est vérifiée par « Netprimer ». Les amorces sont blastées sur le génome complet d'*E. ruminantium* ainsi que sur d'autres bactéries proches (comme *Ehrlichia chaffeensis*) sur NCBI afin d'être sûr qu'il n'y a pas de risque d'amplification aspécifique.

Leur séquence est la suivante :

ERGA_CDS_01230F AATGGAGAATGAGGGGGAAG

ERGA_CDS_01230 R ACCCAAACAAAATCCATCA

ERGA_CDS_05140 F TGAAATGGAGGGGTTAGCTG

ERGA_CDS_05140 R TGGTACAAGAGGTCCCGAAT

La qPCR ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 SG est réalisée en utilisant le Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermofisher), avec une pré-amplification de 15 cycles, utilisant les mêmes conditions de mélange réactionnel et de cycle que ce qui suit. Chaque mélange réactionnel de 25µL contient 250 nM de l'amorce sens et anti-sens, 12,5µL de master

mix constitué, entre autres de SYBR Green, de ROX™, d'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, de dNTPs avec dUTP/dTTP, 12,5µL d'H₂O RNase/ DNase free et 20µL d'ADN pré-amplifié. Les conditions de cyclage (Quant studio5) sont de 2 min à 50°C pour l'activation de l'Uracil-N-Glycosylase, 10 min à 95°C pour l'inactivation de l'Uracil-N-Glycosylase et l'activation de la polymérase ; 40 cycles de 15 sec à 95°C pour la dénaturation et 60 sec à 59°C (ERGA_CDS_01230) ou 60°C (ERGA_CDS_05140) pour l'hybridation et l'élongation. La spécificité du produit de PCR est confirmée pour l'analyse des courbes de dissociation.

II.C.4.c. Calcul des ratios d'expression

Afin de normaliser l'expression des gènes et n'ayant pas de gène normalisateur stable pour *E. ruminantium*, la méthode de normalisation décrite par Pruneau *et al* (2012) est appliquée. Le ratio d'expression (R) est calculé en tenant compte du nombre absolu de transcrits ERGA_CDS_01230 ou 05140 et de la quantité de bactéries suivant la formule :

$R_{\text{Temps}} = \text{nombre de copies de cDNA}_{(01230 \text{ ou } 05140)} / \text{nombre de copies d'ADN d}'E. \text{ ruminantium}$
à un temps donné (*pCS20*)

Le différentiel d'expression (FC= fold change) de gène est toujours comparé à l'expression à 120 hpi correspondant au stade corps élémentaire et considéré comme le niveau de base.

$FC \text{ (fold change)} = R_{\text{Temps}} / R_{120 \text{ hpi}}$.

Les résultats sont représentés en log₂ en accord avec Pruneau *et al* (2012). Le FC est significatif lorsqu'il est ≥ 1 ou ≤ -1 . Un FC de 1 signifie que l'expression est 2xFC plus élevée à un stade qu'à un autre. Lorsque le ratio est ≥ 1 , il y a une surexpression au temps considéré par rapport à 120 hpi. Un FC ≤ -1 signifie une sous-expression par rapport à 120 hpi.

II.D. Evaluation du potentiel antigénique des protéines recProt 01230 et recProt 05140 d'*E. ruminantium* par ELISA et « dot blot »

Le principe est d'adsorber de la protéine recombinante ERGA_CDS_01230 au fond des puits, d'y incuber des sérums recueillis sur des chèvres vaccinées et infectées en conditions expérimentales, puis de révéler la fixation des anticorps par un anticorps anti-caprin couplé à une HRP (Perez *et al*, 1998). Le test des sérums a été réalisé au CIRAD de Montpellier (C. Puech, V Rodrigues).

L'adsorption est réalisée dans 100µL de tampon carbonate bicarbonate pH 9.6 avec 4 µg/mL de protéine recProt 01230 dans une plaque Nunc (Maxisorp). L'incubation se fait 1 h à 37°C sous agitation à 150rpm puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec 300µL/ cupule de tampon de lavage (PBS 1x pH 7,2, tween 20 0,1%). Le blocage est réalisé pendant 1 h à 37°C sous agitation dans 300µL de tampon de blocage (PBS1x, tween 20 0,1%, caséine 2%). Les lavages sont répétés conformément à l'étape précédente. Cent µL de chaque sérum dilué au 100^e dans du tampon de blocage sont incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation. 5 lavages avec le tampon de lavage précèdent le dépôt de 100µL d'anticorps anti-chèvre (Rockland) dilué au 20000^e dans du tampon de blocage ; 1 h à 37°C sous agitation. 5 lavages sont réalisés. La révélation a lieu lors de l'ajout de 100µL de TMB (Neogen) et la réaction est stoppée par l'ajout de 50µL d'H₂SO₄ 0.5M après 5 min de développement. La lecture se fait au spectrophotomètre à 450nm. La densité optique (DO) des puits doit être < 0,1 et les « J0 » < 0,2.

Pour recProt 05140, seuls les « dots blots » ont été réalisés. La protéine recombinante est déposée sur membrane de nitrocellulose et séchée O/N. La membrane est ensuite bloquée 45 min avec du tampon de blocage PBS tween 0,05%, sérum de cheval 15%, puis incubée avec du sérum caprin dilué au 500^e dans du tampon de blocage pendant 30 min. Une incubation de 30 min est ensuite réalisée avec l'anticorps secondaire dilué au 2000^e dans du tampon de blocage. Entre chaque étape sont intercalés des lavages en PBS Tween 0,05%.

Projet

Ehrlichia ruminantium, bactérie intracellulaire, a été étudiée de manière extensive pour de nombreux isolats d'origine géographique proche ou très éloignée et présente une grande diversité de souches de génotype différent sur le terrain au sein d'une même région, ce qui est un obstacle majeur à la conception et à l'efficacité des vaccins (Frutos *et al*, 2006 ; Vachiéry *et al*, 2013). On distingue un isolat qui correspond à un échantillon positif d'*E. ruminantium* d'une souche qui est caractérisée génétiquement et qui correspond à un génotype donné. De plus, pour cet agent pathogène, les mécanismes d'adhésion et d'invasion de la cellule hôte sont peu connus.

L'objectif de ce projet a été de caractériser deux protéines *in vitro* pour définir leur rôle éventuel dans la réponse immunitaire mais aussi dans l'adhésion voire la pénétration d'*E. ruminantium* dans la cellule hôte. Deux protéines ont été choisies sur la base d'études de transcriptomique et de protéomique (Pruneau *et al*, 2012 ; Marcelino *et al*, 2015b ; Moumene *et al*, 2015a)

Ainsi, la protéine ERGA_CDS_05140, porine putative, est la plus surexprimée dans le protéome et le transcriptome de la souche atténuée, et pourrait jouer un rôle dans la réponse immunitaire protectrice associée à l'atténuation. En étant surexprimée, elle peut être plus facilement reconnue par le système immunitaire que d'autres protéines membranaires qui sont normalement surexprimées chez la souche virulente. La protéine ERGA_CDS_01230, probable transporteur de fer a été identifiée dans le protéome de la membrane de la souche virulente et pourrait avoir un rôle dans le transport du fer, essentiel au métabolisme de l'agent pathogène.

Mon travail de diplôme EPHE a d'abord porté sur la qualité des protéines recombinantes produites chez *Leishmania tarentolae* (Niimi, 2012). Ainsi j'ai analysé des données de spectrométrie de masse pour qualifier leur pureté, déterminer leur taille et vérifier la présence des étiquettes par « immunoblot ». J'ai ensuite déterminé la présence de O-glycosylations (Lu *et al*, 2015).

Dans un 2^e temps, j'ai étudié l'interaction de ces protéines recombinantes avec la cellule hôte par CF, « Far western blot » et microscopie électronique. Puis, j'ai utilisé le « pull down » pour identifier d'éventuels ligands présents dans et sur la cellule hôte. Je me suis ensuite intéressée à l'affinité des recProt pour les GAGs et j'ai analysé l'efficacité de l'infection par *E. ruminantium* après leur dégradation à la surface des cellules hôtes (Aquino *et al*, 2010). Afin de compléter les essais d'interaction, j'ai tenté de produire des anticorps anti-recProt 05140

chez le lapin mais les tentatives restées infructueuses et la quantité de recProt à injecter (déjà en quantité limitante) ont réorienté mes essais.

Enfin, j'ai quantifié l'expression des transcrits des 2 protéines d'intérêt par PCR quantitative en temps réel (qPCR) au cours du cycle de développement d'*E. ruminantium* et me suis intéressée à la réponse immunitaire que peuvent induire les protéines natives lors d'essais vaccinaux sur animaux avec un vaccin à bactéries inactivées ou atténuées.

Bien que les deux recProt se soient avérées immunogènes, nous n'avons pas encore procédé à des essais vaccinaux avec ces protéines recombinantes émulsifiées en adjuvant huileux pour évaluer leur effet protecteur. Cela pourra faire l'objet de futures recherches.

Résultats

I. Caractérisation du matériel biologique

I.A. Qualité des protéines recombinantes produites

Avant de caractériser les protéines ERGA_CDS_01230 et 05140, la qualité des protéines recombinantes doit être vérifiée.

I.A.1. Taille attendue et pureté élevée de la recProt 01230 et 05140

Le spectre de masse obtenu pour la protéine recombinante recProt 01230, présente un seul pic m/z de 66087 Daltons, d'abondance relative proche de 1000 (unité arbitraire). Le petit épaulement à la base du pic est caractéristique de plusieurs formes ionisées et peut révéler une contamination (*Figure 8A*). Bien que le pic soit assez mince, cela n'exclut toutefois pas la présence possible d'isoformes ou de produits de dégradation. La taille attendue pour la protéine est de 68,3 kDa (étiquettes comprises), ce qui est conforme à la taille de la protéine ionisée.

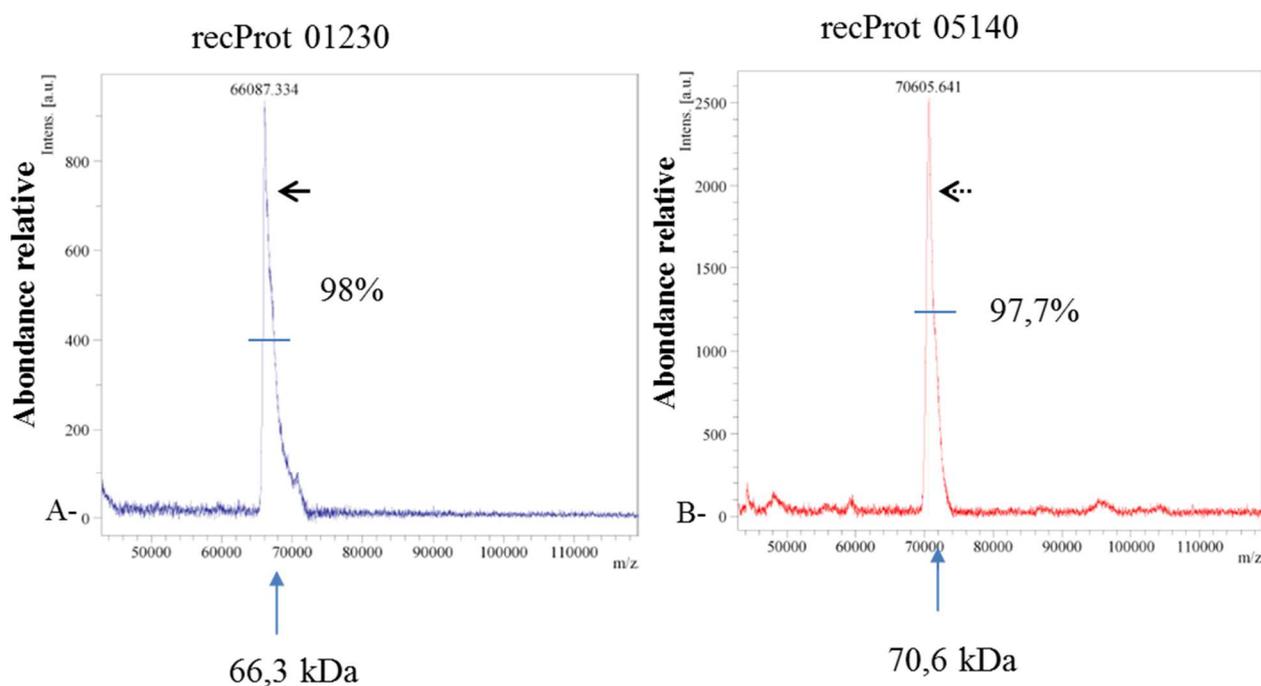


Figure 8: Détermination de la taille des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

A- Profil du spectre de masse de recProt 01230 (flèche noire) d'une taille de 66,3 kDa avec un épaulement à la base du pic. **B-** Profil de spectre de masse de recProt 05140 (flèche pointillée) d'une taille de 70,6 kDa avec des pics plus petits le long du spectre

Quant à la protéine recProt 05140, le spectre de masse de la protéine donne un pic m/z de 70605 Daltons, d'intensité plus importante (2500) que pour la protéine recProt 01230 et sans épaulement (*Figure 8B*). Par contre, plusieurs petits pics sont présents de part et d'autre du pic principal, ne résultant pas uniquement de l'ionisation de recProt 05140 mais très probablement de peptides contaminants. La taille prédite de la protéine est de 81kDa (étiquettes comprises), alors que le rapport mesuré indique 70,6kDa, ce qui suggère que seule une partie de la protéine pourrait avoir été produite.

Au niveau de la pureté des 2 protéines recProt 01230 et recProt 05140, les données de spectrométrie de masse permettent de dire qu'elles ont une pureté respectivement de 98% et de 97,7%. Ces pourcentages de pureté sont satisfaisants pour les essais prévus (*Tableau 3*). En effet, chacune d'elle est très faiblement contaminée par des protéines venant d'*E. coli* (<2%) utilisé pour la multiplication du vecteur d'expression et par des protéines venant du bovin (*Bos taurus* <0,01%), probablement associées au SBF contenu dans le milieu de culture.

De plus, dans chacune des protéines recombinantes sont retrouvées des traces de l'autre protéine recombinante (<0,6%), ce qui peut être attribué à un problème de recyclage des colonnes de purification. Nous avons considéré que les pourcentages faibles de contamination ne devraient pas affecter les résultats obtenus dans la suite du travail.

Contamination	recProt 01230	recProt 05140	<i>E. coli</i>	<i>Bos taurus</i>
RecProt 01230	98.01%	0.35%	1.63%	0.007%
RecProt 05140	0.53%	97.7%	1.76%	0.002%

Tableau 3 : Détermination du pourcentage de contamination des 2 protéines recombinantes par spectrométrie de masse Orbitrap. Les protéines ionisées et analysées révèlent une contamination par *E. coli* (<2%), *B. taurus* (<0,01%) et de l'une par l'autre (<0,6%).

I.A.2. Présence des étiquettes GFP et Histidine sur recProt 01230 et 05140

Concernant la présence de l'étiquette GFP, l'agrégation des protéines recProt 01230 et recProt 05140 sur la résine Probond (composée de billes de polypropylène greffées d'ions Ni²⁺), a permis d'observer des billes entourées d'un halo très fluorescent pour la protéine recProt 01230 et moins fluorescent pour recProt 05140 par microscopie à fluorescence. Les protéines

recombinantes sont donc dans des conditions de repliement favorables à la fixation de leur étiquette histidine au nickel de la résine, ce qui permet de concentrer la fluorescence liée à la GFP de ces mêmes protéines.

La présence de l'étiquette GFP au niveau de ces protéines et l'intensité observée par microscopie à fluorescence a été confirmée par immuno-blotting (*Figure 9A*). La coloration obtenue est plus intense pour la protéine recProt 01230 que pour la protéine recProt 05140.

Quant à l'étiquette histidine, l'immuno-blotting confirme sa présence chez la protéine recProt 05140 ; elle est difficilement détectable mais tout de même présente chez la protéine recProt 01230 (*Figure 9B*).

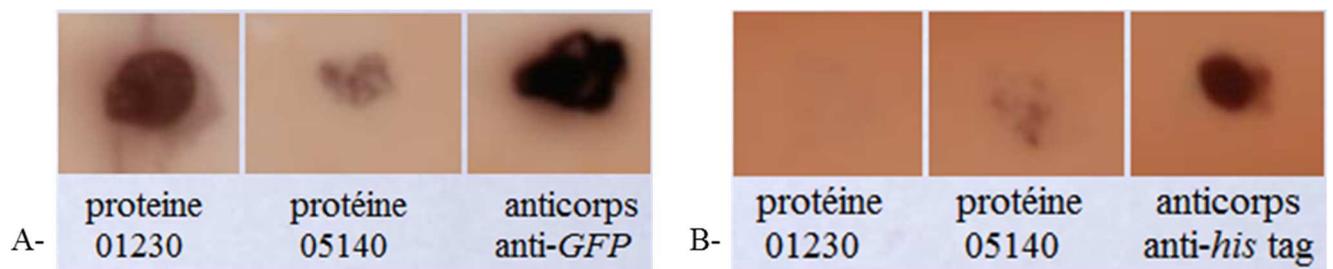


Figure 9 : Immuno-blotting de recProt 01230 et recProt 05140

A- avec un anticorps anti-GFP. Le témoin positif est de l'anticorps anti-GFP directement déposé sur la membrane. **B-** avec une sonde anti-histidine. Le témoin positif est constitué de la sonde anti-histidine directement déposé sur la membrane.

I.A.3. Présence de glycosylation sur recProt 01230 et 05140

Une autre caractéristique des protéines recombinantes étudiées est la présence de MPTs de type O-glycosylation.

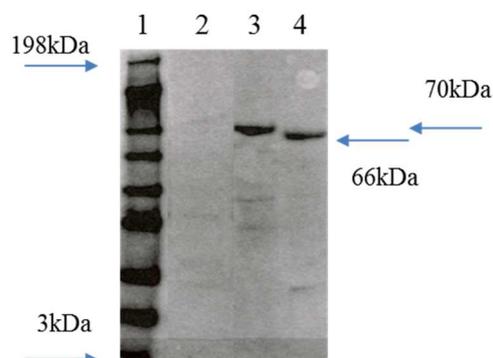


Figure 10 : « Western blot » des protéines recombinantes révélées avec un anticorps de souris anti-O-GlcNAc couplé à un anticorps anti-souris-HRP.

Ligne 1: marqueur de poids moléculaire. **Ligne 2:** témoin négatif. **Ligne 3:** recProt 05140. **Ligne 4:** recProt 01230.

La *Figure 10* montre que les 2 protéines recombinantes, recProt 05140 (colonne 3) et recProt 01230 (colonne 4) sont révélées avec un anticorps anti-O-GlcNAc, à la taille attendue respectivement de 70 et 66kDa, confirmant les résultats de spectrométrie de masse (*Figure 8A et B*).

Le système *Leishmania tarentolae* permet donc de produire des protéines recombinantes avec des MPTs de type glycosylation et pourra donc être utilisé pour l'étude d'autres protéines d'*E. ruminantium*. Les protéines recombinantes recProt 01230 et recProt 05140 d'*E. ruminantium* sont des protéines de fusion GFP portant une étiquette histidine, O-glycosylées et d'une pureté supérieure à 95%.

Ces protéines recombinantes répondent aux critères fixés et pourront être utilisées pour caractériser les protéines natives.

I.B. Prédiction des structures et localisation des protéines ERGA_CDS_ 01230 et 05140

A partir de la séquence protéique, les structures et localisation de chaque protéine peuvent être prédites, ce qui permet d'orienter vers leur fonction, par homologie avec ce qui est connu pour d'autres modèles.

La structure 3D proposée par « I-TASSER » montre que la protéine ERGA_CDS_01230 possède une succession d'hélices α reliées par des boucles réparties autour d'un feuillet β au centre desquelles pourrait se nicher le site de fixation du ligand. Le ligand est représenté en vert (*Figure 11A*). Par homologie avec d'autres structures I^{aire}, II^{aire} ou III^{aire} connues, « Swiss model » montre une forte analogie d'ERGA_CDS_01230 avec une structure « C-clamp », capable de lier le fer.

La protéine ERGA_CDS_05140 est constituée de feuillets β qui confèrent à la protéine une structure proche de celle d'une porine selon « Swiss model », pouvant permettre le passage de métabolites (*Figure 11B*). Au centre, on distingue des boucles et une hélice α , qui pourraient obturer la lumière de la porine. Le site de fixation potentielle du ligand se trouve plutôt sur un côté de la porine, à la limite du feuillet β , au niveau des hélices α .

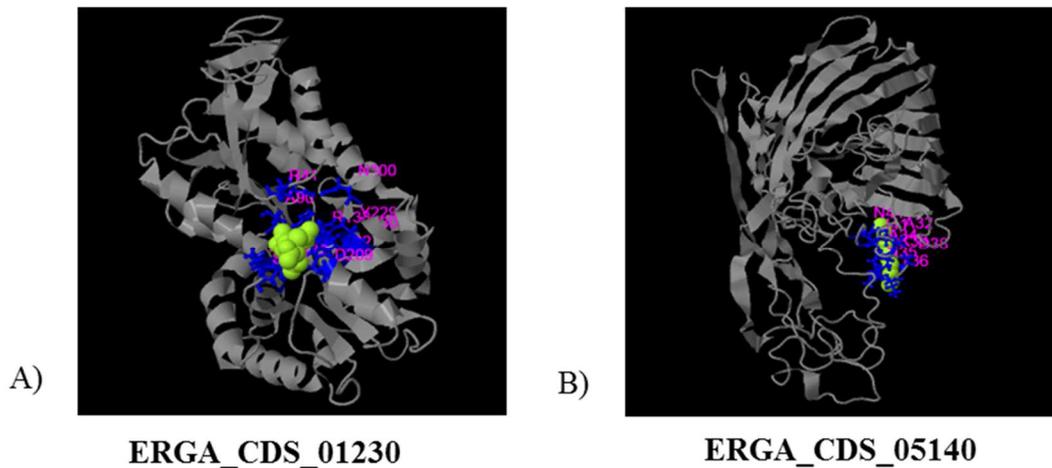


Figure 11 : Structure 3D prédictive des protéines recombinantes obtenues avec le logiciel « I-Tasser » et prédiction de la position des sites de liaison au ligand (en vert, le ligand).

A- ERGA_CDS_01230, succession d'hélices α reliées par des boucles réparties autour d'un feuillet β . B- ERGA_CDS_05140, feuillets β qui confèrent la forme d'un « tonneau ».

D'après le logiciel « CELLO 2.5 », la protéine ERGA_CDS_01230 a une prédiction de localisation préférentiellement cytoplasmique (score de 2,418) mais aussi au niveau de la membrane externe (1,652). La protéine ERGA_CDS_05140 a une prédiction de localisation plutôt au niveau de la membrane externe (4,026) et un score de 0,749 pour la localisation extracellulaire (*Tableau 4*).

LOCALISATION	Protéine recProt_01230	Protéine recProt_05140
Cytoplasmique	2,418	0,041
Membrane externe	1,652	4,026
Périplasmique	0,424	0,156
Membrane interne	0,404	0,028
Extracellulaire	0,102	0,749

Tableau 4 : Prédiction par score de fiabilité de la localisation subcellulaire des protéines natives d'*E. ruminantium* par le logiciel « CELLO 2.5.

ERGA_CDS_01230 est prédit dans le cytoplasme et sur la membrane externe. ERGA_CDS_05140 est retrouvée au niveau de la membrane externe et dans le milieu extracellulaire.

« Phyre2 » confirme bien une localisation cytoplasmique dominante de la protéine ERGA_CDS_1230 puisque sur 348 AAs, 208 constituent la partie cytoplasmique de la protéine (*Figure 12A*), 15 AA composent la partie transmembranaire et 125 la partie extracellulaire. Pour ERGA_CDS_05140 (*Figure 12B*), sur 495 AA, 375 AAs sont exposés à la surface de la

membrane externe ; 15 AA constituent la partie transmembranaire et 105 résidus la partie cytoplasmique, ce qui est conforme avec la localisation prédite par « CELLO 2.5 » au niveau de la membrane externe.

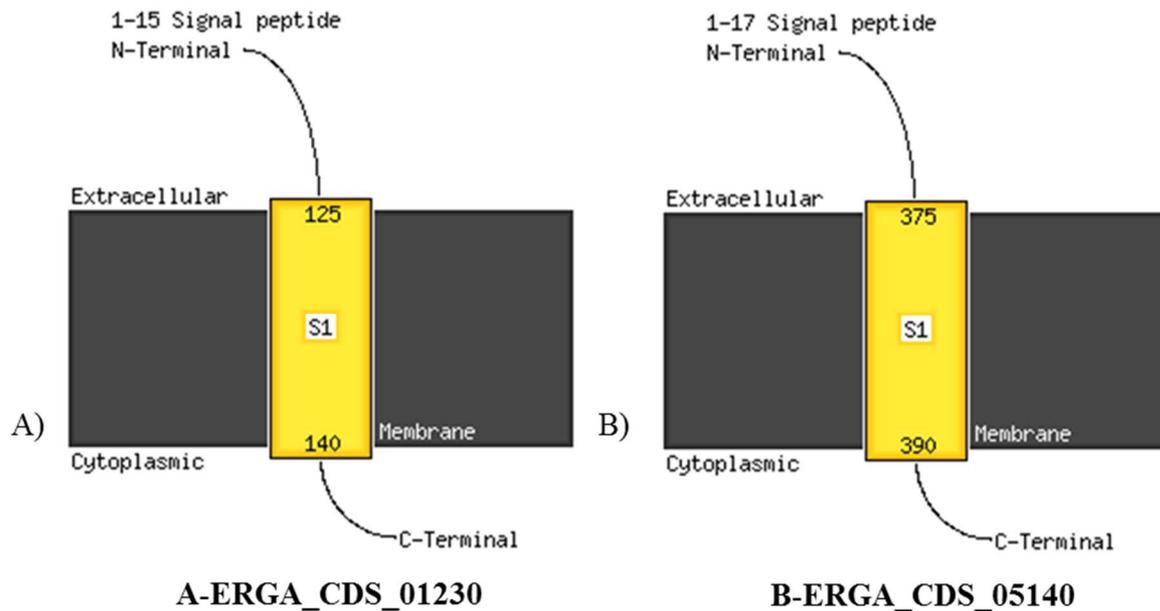


Figure 12 : Prédiction de la topologie des domaines transmembranaires par l’outil en ligne « Phyre2 ».
A- Protéine ERGA_CDS_01230, majoritairement cytoplasmique. B- Protéine ERGA_CDS_05140, à dominante extracellulaire.

Les protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 ont respectivement une structure de la forme « C-clamp » et « porine », ce sont des protéines de la membrane externe avec des sites potentiels de fixation de ligands.

II. Interaction des protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 d’*E. ruminantium* avec les BAEC

II.A. Mise en évidence de l’adhésion des protéines recombinantes avec les BAEC

Nous avons d’abord étudié l’interaction entre les protéines recombinantes et la cellule hôte. Pour ce faire, nous avons utilisé des billes adsorbées avec les protéines recombinantes recProt 01230 et recProt 05140 mises en contact avec les BAEC. L’adhésion a été évaluée par microscopie électronique à balayage.

Le témoin négatif montre qu'aucune bille ne se fixe à la surface des BAEC, qui est plane (*Figure 13F*). De plus, aucune fixation de billes adsorbées avec la protéine recProt 05140 n'a été observée à la surface des BAEC (*Figure 13E*). Pour écarter l'hypothèse que l'absence d'adhésion soit due à la non adsorption de recProt 05140 aux billes, un test immunoenzymatique ciblant l'étiquette GFP des recProt a permis de vérifier que la protéine recProt 05140 est bien capable de se fixer sur les billes de latex (données non montrées).

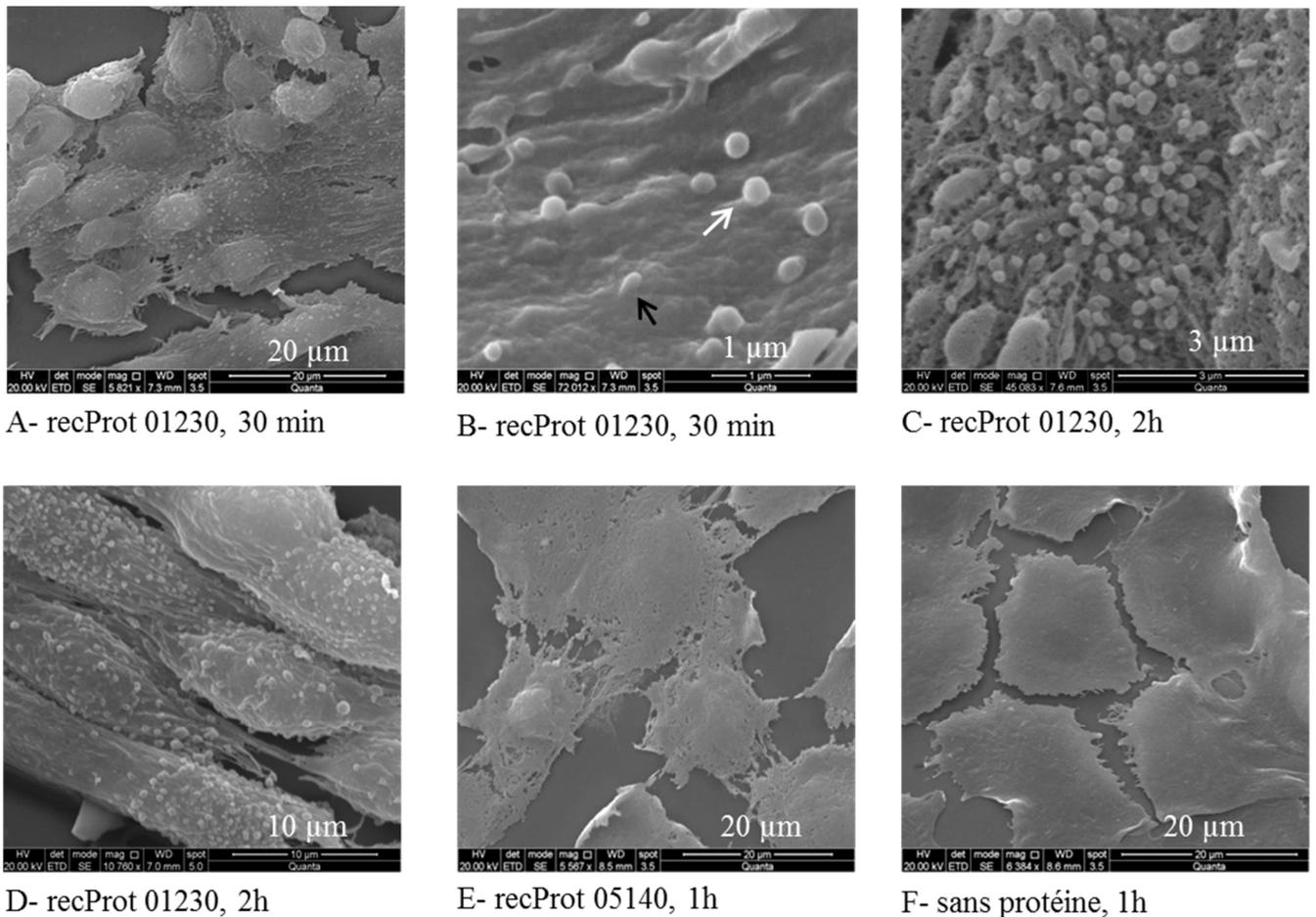


Figure 13 : Photos de microscopie électronique après incubation avec les BAEC, des billes adsorbées avec recProt 01230 ou 05140.

A-, B-, C- billes 0,1μm recProt 01230. D- billes 0,5μm recProt 01230. Adhésion de recProt 01230 aux BAEC. E- billes 0,1μm recProt 05140, pas d'adhésion aux BAEC. F-Témoin négatif avec billes non adsorbées. A-, B, D-, E- et F- 1.82×10^8 billes. C- 4.57×10^9 billes

En revanche, la *Figure 13A* montre des BAEC gonflées et constellées de billes adsorbées (0,1 μm) avec la protéine recProt 01230, après 30 minutes d'incubation. Ceci montre qu'il y a bien une interaction entre la recProt 01230 et les BAEC. La *Figure 13B* permet l'observation de billes qui commencent à être (flèche blanche) et sont invaginées (flèche noire) par la membrane

de la cellule endothéliale. L'augmentation du nombre de billes liées à recProt 01230 incubées ($4,57 \cdot 10^9$ de billes déposées) et du temps de contact est proportionnelle à la quantité de billes fixées observées (Figure 13C). L'incubation avec des billes de diamètre différent ($0,5 \mu\text{m}$), adsorbées avec la protéine recProt 01230 donne les mêmes résultats que ceux obtenus avec des billes de diamètre inférieur ($0,1 \mu\text{m}$) (Figure 13D et C). Les images montrées sont représentatives de ce qui a été observé dans d'autres champs.

Une autre manière de tester l'adhésion des protéines recombinantes aux BAEC est l'utilisation de la CF, via l'étiquette GFP des protéines recombinantes.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de BAEC marquées par la protéine recProt 01230 et recProt 05140 augmente avec la quantité de protéines (Figure 14 A et B).

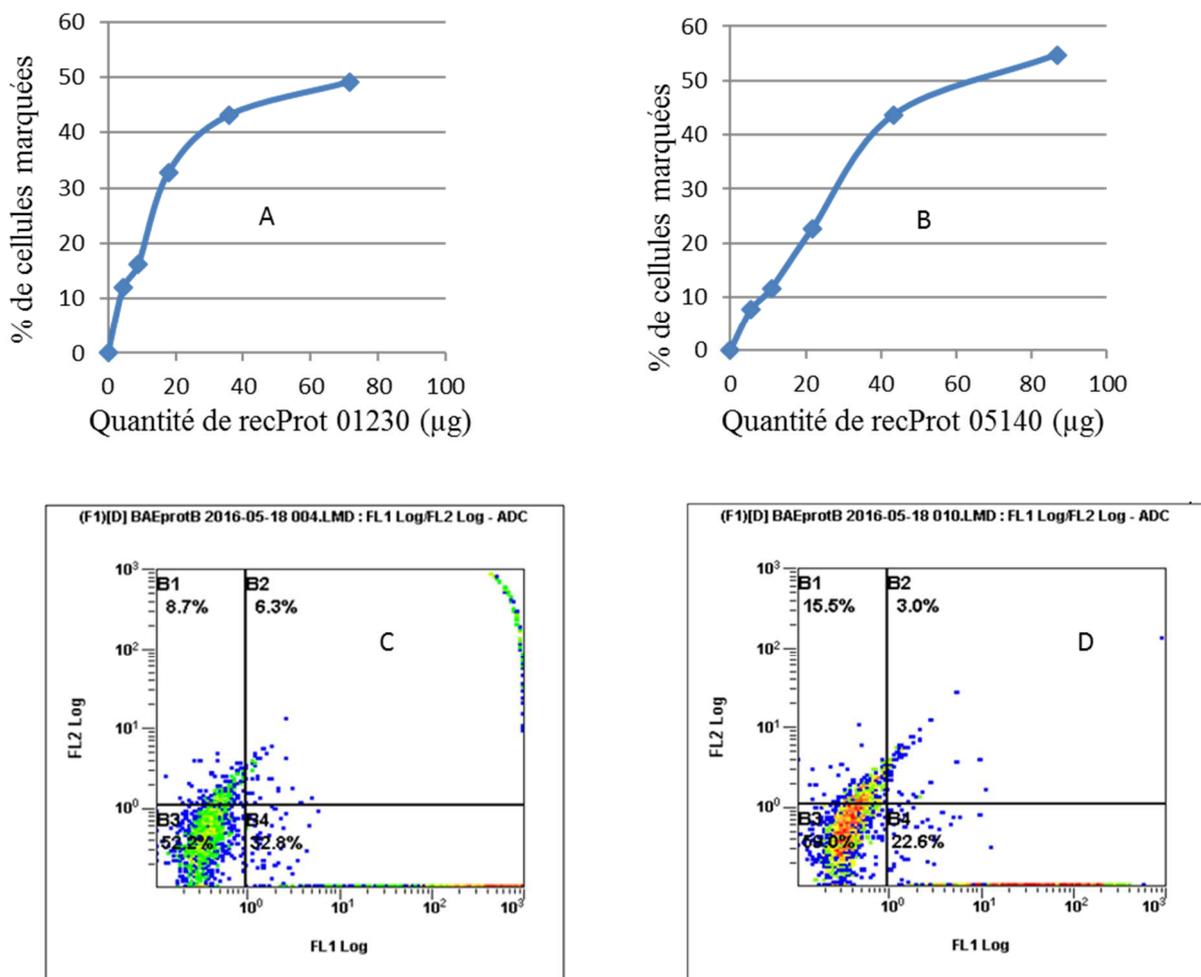


Figure 14 Marquage des BAEC par les recProt 01230 et 05140 en cytométrie en flux (A et B-). C- Profil « dot plot » obtenu avec 17,92 μg de protéine recProt 01230 D- Profil « dot plot » obtenu avec 21,67 μg de protéine recProt 05140. Profil identique pour les 2 recProt.

En effet, le cytomètre quantifie les cellules marquées par de la fluorescence suite à l'incubation avec chacune des deux protéines recombinantes. L'auto-fluorescence des cellules a été mesurée sur le témoin négatif, constitué de cellules non marquées par les protéines recProt.

Le pourcentage de cellules marquées (*Figure 14 A et B*) est proportionnel à la concentration en protéines jusqu'à 43 µg pour la protéine recProt 05140 et 36µg pour la protéine recProt 01230 ; c'est un effet « dose ». Au-delà de ces concentrations, on observe un début de saturation. Même à des concentrations élevées en protéines recombinantes, il n'y a pas 100% des cellules marquées. Les profils « dots plots » ne montrent pas de différences entre les 2 protéines, malgré une fluorescence plus élevée pour recProt 01230 que pour recProt 05140 sur résine Probond (*Figure 14 C et D*).

Les résultats de microscopie à balayage et de CF concordent à montrer que la protéine recProt 01230 interagit avec la membrane de la cellule hôte et pourrait intervenir dans l'adhésion d'*E. ruminantium* à la cellule hôte.

Ces résultats amènent donc à la recherche du ligand intervenant dans l'interaction agent pathogène/ cellule hôte.

II.B. Identification des ligands cellulaires intervenant dans l'adhésion

II.B.1. « Pull down » et « Far Western blot »

Des interactions entre les protéines recombinantes recProt 01230 et recProt 05140 et les BAEC ayant été observées par CF (pour les 2 recProt) et microscopie (pour recProt 01230 uniquement), l'objectif suivant était de tenter de caractériser les ligands des BAEC associés aux récepteurs d'*E. ruminantium*. Le « pull down » permet, à l'aide des protéines recombinantes fixées sur un support et représentant l'appât, de trouver leur ligand dans un lysat de BAEC.

A partir d'un 1^{er} « pull down » en conditions dénaturantes avec la protéine recProt 05140, des bandes qui paraissent se distinguer par rapport au témoin « protéine recombinante » ont été analysées par spectrométrie de masse « Orbitrap » puis triées comme décrit dans « Matériel et méthode ». Le *Tableau 5* liste les candidats les plus intéressants issus de ce tri.

Les ligands potentiels mis en évidence ont été étudiés bio informatiquement via « [UniprotKB](#) » (The UniProt, 2017), qui donne une carte d'identité de la protéine et oriente sur sa fonction et

« [Propsearch](#) » (Hobohm *et al.*, 1995), qui classe des protéines connues par familles de propriétés biologiques auxquelles est associée la protéine d'intérêt en fonction de sa composition en AA (*annexe 8*).

Une seconde analyse réalisée sur un second « pull down » dans les mêmes conditions, n'a pas permis de retrouver les candidats du *Tableau 5*, issus du 1^{er} pull down. L'ajout d'un témoin « lysat cellulaire » a montré que certaines de ces protéines ont de l'affinité pour la résine « Probond » et sont capables de s'y fixer sans l'intermédiaire de la protéine recombinante, ce qui a remis en doute la spécificité des protéines issues de l'analyse du 1^{er} « pull down ».

<u>Identifiant de la protéine</u>	<u>Identification FASTA</u>	<u>Nbre de protéines</u>	<u>Peptides</u>	<u>Peptides uniques</u>
A5D7D1	>sp A5D7D1 ACTN4_BOVINE Alpha-actinin-4 OS=Bos taurus GN=ACTN4 PE=2 SV=1	1	21	14
F1MYG5	>tr F1MYG5 F1MYG5_BOVINE Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LMNA PE=1 SV=1	1	17	17
A3KMV5	>sp A3KMV5 UBA1_BOVINE Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Bos taurus GN=UBA1 PE=2 SV=1	1	10	10
Q3SYU2	>sp Q3SYU2 EF2_BOVINE Elongation factor 2 OS=Bos taurus GN=EEF2 PE=2 SV=3	1	8	8
Q76LV2	>sp Q76LV2 HS90A_BOVINE Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus GN=HSP90AA1 PE=1 SV=3	1	8	4
E1BP91	>tr E1BP91 E1BP91_BOVINE Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=NPEPPS PE=4 SV=2	1	8	8

Tableau 5 : Ligands potentiels de recProt 05140 identifiés par Orbitrap. Tri des données effectué en fonction du nombre de peptides identifiés (col. peptides), du nombre de protéines dans lesquelles ils ont été identifiés (nb. de protéines) et du nombre de peptides spécifiques à cette protéine (peptides uniques).

Après pré-nettoyage du lysat par passages sur résine Probond, le « pull down » a été refait en conditions natives et dénaturantes avec la protéine recProt 01230.

Dans les conditions dénaturantes comme natives, il n'y a pas de fixation du lysat cellulaire sur la résine (*Figure 15 A b et B 3*). Des protéines sont toutefois visibles lorsque le lysat nettoyé est migré directement sur le gel sans subir de « pull down » (*Figure 15 B 2*). En comparant les profils de migration des « pull down » « résine + protéine recProt 01230 + lysat cellulaire » (*Figure 15 A c et B 4*) avec ceux du « pull down » « résine + protéine recProt 01230 » (*Figure 15 A d et B 6*), aucune bande supplémentaire n'est observée suite à l'incubation avec le lysat

cellulaire. Les bandes visibles sont essentiellement dues à la protéine recProt 01230. Les pistes « e » et « 5 » de chaque gel permettent de confirmer que la protéine recombinante fixée sur la résine est bien de même taille que la protéine recProt 01230 initiale.

Le « pull down » réalisé dans les conditions décrites ci-dessus n'a pas permis d'identifier le ligand de recProt 05140 et 01230. En effet, cette technique semble ne pas être la plus adaptée pour isoler les partenaires impliqués dans l'interaction révélée par le « Far Western Blot ».

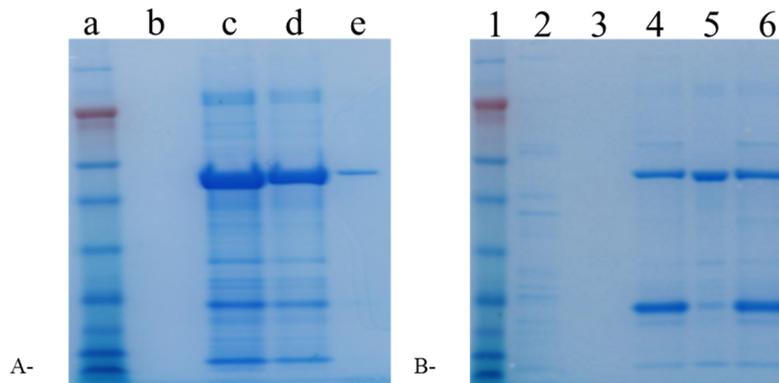


Figure 15: « Pull down » en conditions dénaturantes (A) et natives (B).

Migration sur gel d'acrylamide des éluats après incubation du lysat cellulaire avec recProt 01230 fixée sur la résine. a et 1: poids moléculaire. b et 3: témoin « résine + lysat ». c et 4: « résine + protéine recProt 01230 + lysat ». d et 6: « résine + recProt 01230 ». 5: recProt 01230 sans « pull down ». 2: migration du lysat après nettoyage.

Le « Far Western blot » permet la mise en évidence de l'interaction entre la protéine recombinante recProt 01230 et les fractions cellulaires des BAEC ainsi que son lysat.

Comme présenté sur la *Figure 16*, la protéine recProt 01230 est capable d'interagir avec des protéines du lysat cellulaire et plus spécifiquement avec celles de la fraction F2 (membranes et organelles) alors que la protéine recProt 05140 ne présente pas ce type d'interaction. Cela vient donc renforcer les résultats obtenus en microscopie et CF pour la protéine recProt 01230 et montre qu'elle intervient dans l'adhésion d'*E. ruminantium* à la cellule hôte.

Le ligand spécifique n'ayant pas été mis en évidence dans l'interaction de la protéine recProt 01230 avec le lysat cellulaire, l'adhésion d'autres agents pathogènes à des ligands plus communs a été testée.

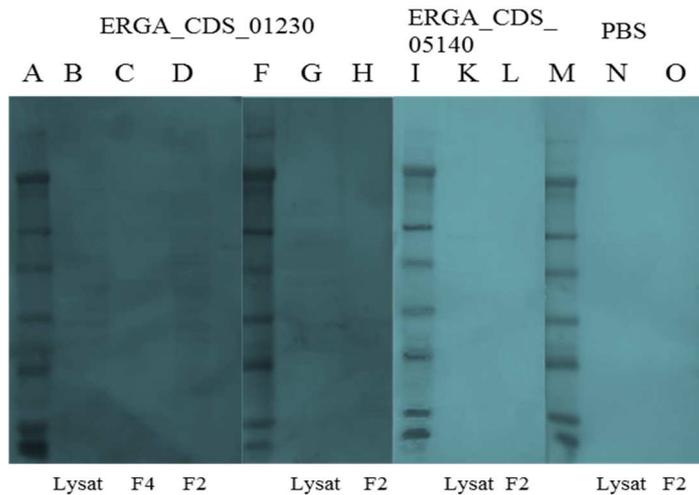


Figure 16 : Fixation de recProt 01230 au lysat cellulaire et à la fraction « membranes et organelles F2» des BAEC, lors du « Far Western blot ».

Migration du lysat et des fractions F2 et F4, transfert sur membrane, incubation avec recProt 01230 ou recProt 05140 puis révélation avec l'anticorps-anti GFP. De A à H, incubation avec recProt 01230 (B- G, D- H : répliques). De I à L, incubation avec recProt 05140. De M à O, incubation dans du PBS (témoin négatif). A, F, I et M : poids moléculaire. B, G, K et N : lysat cellulaire. C : fraction F4. D, H, L et O : fraction F2. La protéine recProt 01230 se fixe sous forme de smears à plusieurs endroits du lysat cellulaire (B et G) et de la fraction F2 (D). ERGA_CDS_05140 ne se fixe pas. Artéfact sous forme de bande très faible dans K et N.

II.B.2. Rôle des glycosaminoglycanes dans l'adhésion

Le rôle des GAGs de la cellule hôte dans l'adhésion d'*E. ruminantium* a été exploré. L'héparane sulfate adsorbé sur une plaque ne permet pas la fixation de la recProt 01230 quelle que soit la concentration en héparane sulfate utilisée (*Figure 17*).

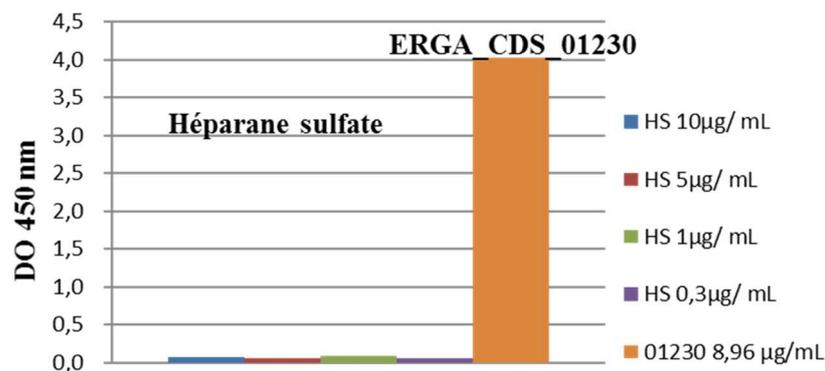


Figure 17 : Interaction de l'héparane sulfate et recProt 01230.

Adsorption d'héparane sulfate et de recProt 01230 (témoin positif) sur plaque; incubation avec recProt 01230 et révélation *via* l'HRP de l'anticorps anti-GFP. Représentation des DO en fonction des concentrations en héparane et en rprot adsorbée.

Le témoin positif uniquement constitué de protéine recProt 01230 adsorbée dans les mêmes conditions que l'héparane sulfate est positif, ce qui valide le test immuno-enzymatique.

Parallèlement, les BAEC ont été traitées avec de l'héparinase et de la chondroïtinase puis infectées avec *E. ruminantium*. La quantité de bactéries a été estimée à la fin de la croissance, lors de la lyse des BAEC, par qPCR Sol1 pour chaque traitement.

Après traitement des cellules à la chondroïtinase, le FC correspondant au différentiel de la quantité de bactéries pour la condition à 0,2U/mL est supérieur à la condition sans traitement mais cela peut s'expliquer par la variabilité inter-puits (*Figure 18A*). En augmentant les concentrations en chondroïtinase à 0,4 et 0,9U/mL, on obtient respectivement des FC de 0,52 et 0,58, correspondant à une diminution de moitié du nombre de bactéries par rapport à la condition sans traitement. Bien que les réplicas n'aient pas pu être réalisés, il semblerait tout de même qu'il y ait un effet de la chondroïtinase sur l'entrée de l'agent pathogène, le nombre de bactéries étant diminué de moitié par rapport à la condition sans traitement. Il est possible que la digestion de la chondroïtine et du dermatane impacte le taux d'infection des BAEC, *E. ruminantium* ne pouvant plus y adhérer.

Concernant le traitement à l'héparinase (*Figure 18B*), il semble qu'il y ait un effet du traitement à l'héparinase sur la croissance d'*E.ruminantium* mais il n'y a pas d'effet dose. L'effet de l'héparinase sur la diminution observée doit être confirmée par des répétitions de l'expérience.

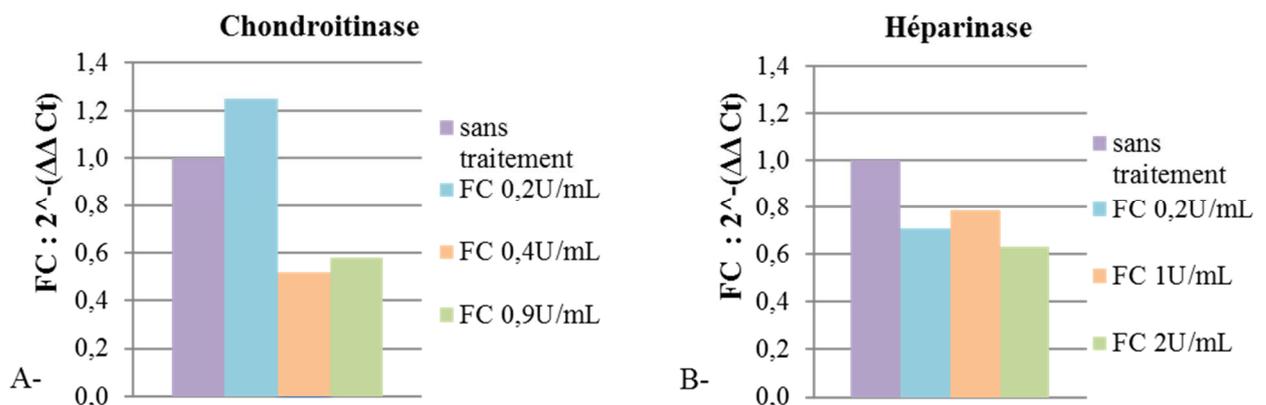


Figure 18 : Effet du traitement chondroïtinase ou héparinase sur l'infection des BAEC par *E. ruminantium*. A- Traitement à la chondroïtinase à différentes concentrations, 2 h avant infection. B- Traitement héparinase à différentes concentrations, 10 min avant puis 1 h après infection. Les FC issus des traitements sont normalisés par rapport à la condition sans traitement

Si les différents traitements enzymatiques avec l'héparinase ou la chondroïtinase n'ont pas affecté l'aspect des BAEC après traitement, les cellules traitées à la chondroïtinase ont été plus endommagées lors de l'infection que les cellules non traitées, infectées avec la même dose d'*E. ruminantium*.

La protéine recProt 01230 n'interagit pas avec l'héparane sulfate mais *E. ruminantium* pourrait avoir de l'affinité pour la chondroïtine et le dermatane lors de l'infection des cellules.

III. Modification de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et 05140 au cours de la croissance d'*E. ruminantium in vitro*

Afin de mieux comprendre le rôle des CDS ERGA_CDS_01230 et 05140 dans le cycle de développement de la bactérie, l'expression de ces gènes a été suivie au cours du temps.

III.A. Synchronisation de l'infection et croissance d'*E. ruminantium in vitro*

Les BAEC sont infectées lorsqu'elles sont fraîchement à confluence (*Figure 19-1*).

Le 1^{er} signe d'infection des BAEC est observable 12 à 24 hpi : les cellules apparaissent gonflées. A 96 hpi, les morulas sont clairement observables (*Figure 19-2*, flèche blanche) sous forme de grosses masses circulaires opaques, plus ou moins nombreuses dans la cellule endothéliale selon le taux d'infection.

A 120 hpi, les corps élémentaires arrivés à maturation lysent les BAEC. On observe la présence de plages de lyse dans le tapis cellulaire totalement déstructuré (*Figure 19-3*).

Après éclatement des morulas, les corps élémentaires sont relargués dans le milieu de culture et sont observables sous forme de petits grains (flèche blanche pointillée), se trouvant à la périphérie des cellules éclatées (*Figure 19-4*).

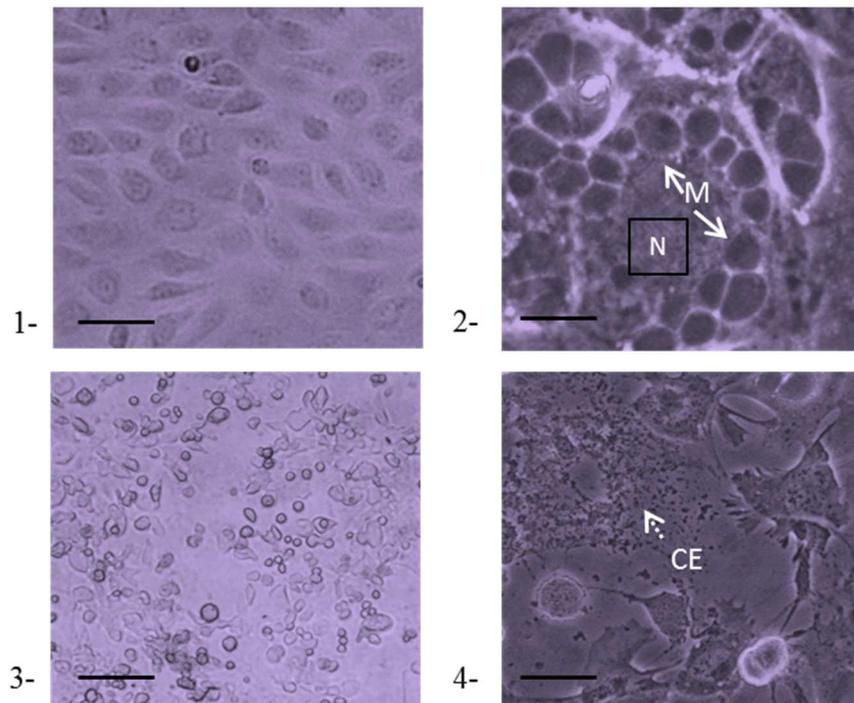


Figure 19 : Observation des stades d'*E. ruminantium* au microscope à contraste de phase.
 1- BAEC non infectées (échelle 20µm). 2- Morula (M) contenant *E. ruminantium* à 96 h post-infection (flèche blanche; échelle 5µm), N=noyau. 3 (échelle 30µm) et 4- lyse des BAEC avec libération des corps élémentaires (CE) d'*E. ruminantium* sous forme de corps élémentaires (flèche blanche pointillée; échelle 10µm).

Afin de mesurer l'expression des gènes codant les deux protéines, la normalisation est réalisée par rapport au nombre de bactéries présentes à chaque stade de développement. La quantification toutes les 24 h du nombre de bactéries présentes dans les BAEC par qPCR Sol1 donne une courbe sigmoïdale représentée en log₁₀ (Figure 20).

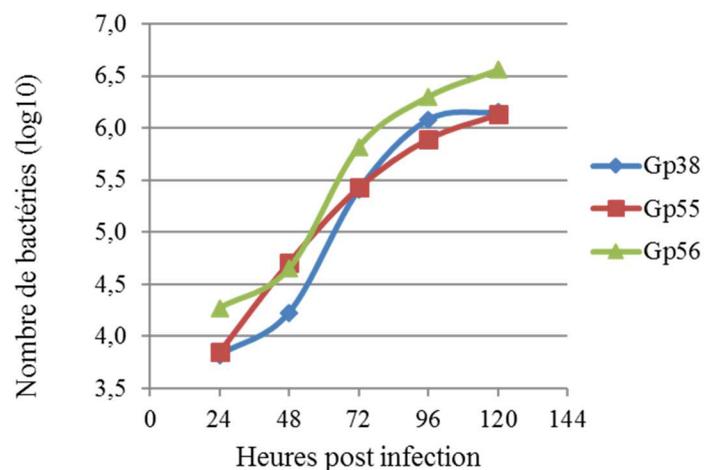


Figure 20 : Quantification du nombre de bactéries par qPCR Sol-1 dans l'ADN d'*E. ruminantium* A 24, 48, 72, 96 et 120 heures post-infection. Courbes sigmoïdales ; représentation en log de 10.

La bactérie montre une phase de croissance faible entre 24 et 48 h puis un développement exponentiel avec un ralentissement de la croissance, voire une phase stationnaire après 96 h et un maximum de copies atteint à 120 h pour Gardel passage 38 (Gp38) et 55 (Gp55). Il y a absence de phase de latence pour Gardel passage 55 dont la phase exponentielle a lieu entre 24 et 120 h. Les courbes de croissance obtenues pour les 2 réplicas biologiques, Gp38 et 56 sont quasi superposables.

La synchronisation du cycle de développement d'*E. ruminantium* est obtenue avec une lyse en 5 jours après l'infection de BAEC.

III.B. Modulation de l'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et 05140

Afin de comparer les niveaux d'expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 au cours du cycle de développement, les BAEC infectées ont été prélevées toutes les 24 hpi. Une mesure simultanée de la quantité de bactéries et du nombre de transcrits pour chaque CDS a été effectuée par qPCR à chaque temps de collecte. La quantité de transcrits est normalisée par la quantité de bactéries. En effet, aucun gène de référence dont l'expression soit assez stable n'est disponible pour *E. ruminantium* comme gène normalisateur.

Un 1^{er} ratio « nombre de cDNA d'*E. ruminantium* » / « nombre de copies ADN d'*E. ruminantium* » a été calculé pour chaque temps. Le FC est ensuite calculé par rapport à l'expression d'*E. ruminantium* à 120 h, correspondant au stade corps élémentaires. Il est représenté graphiquement (*Figure 21*).

Les cinétiques d'expression du gène ERG_CDS_01230 de Gp55 et 56 suivent la même tendance. Il y a une diminution significative de l'expression de ERG_CDS_01230 par rapport au stade corps élémentaires avec un FC inférieur à -1 à partir de 48 hpi (*Figure 21A*). L'expression est croissante au cours du temps et la plus forte à 120 hpi. Pour les 3 réplicas biologiques, on observe une augmentation de l'expression d'ERGA_CDS_01230 entre 96 hpi et 120 hpi.

L'expression d'ERGA_CDS_05140 varie beaucoup d'une cinétique à l'autre (*Figure 21B*). Une sur-expression est constatée pour Gp38 à 48 h et Gp55 à 24 h ($FC \geq 1$). La sous-expression de la protéine recProt 05140 est significative à 96 hpi pour Gp38 et Gp56 par rapport au stade

corps élémentaires ainsi qu'à 24 h pour Gp56. On ne distingue pas de tendance claire pour ce gène.

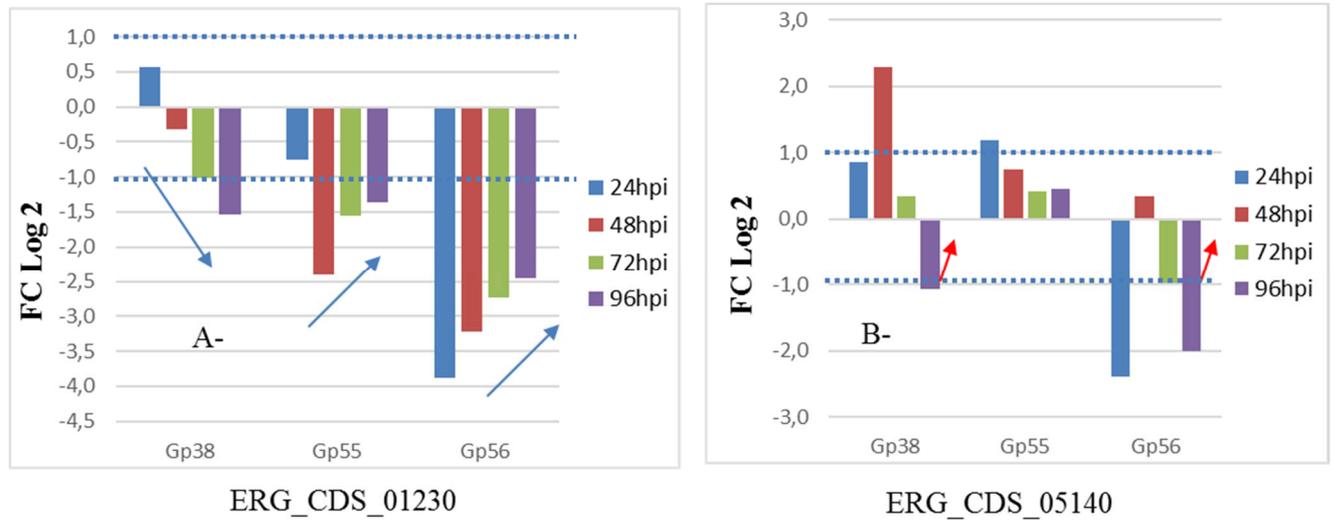


Figure 21 : Expression des CDS ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140 au cours du cycle de développement d'*E. ruminantium* par rapport à 120 hpi. Normalisation par rapport au nombre de bactéries à chaque temps. FC significatif quand ≥ 1 et ≤ -1 .

L'expression du gène ERGA_CDS_01230 est la plus forte à 120 hpi par rapport aux autres temps.

IV. Réponse humorale associée aux protéines natives ERGA_CDS_01230 et 05140 lors d'essais vaccinaux avec le vaccin à bactéries atténuées ou inactivées

Afin de vérifier si les protéines ERGA_CDS_01230 et 05140 d'*E. ruminantium* induisent une réponse humorale suite à une vaccination chez les chèvres, l'équipe du CIRAD de Montpellier (C. Puech-V. Rodrigues) a développé un test immunologique utilisant la recProt 01230 comme antigène. Des sérums issus d'expérimentations *in vivo* sur animaux vaccinés par un vaccin à bactéries inactivées ou atténuées ont été testés.

Les résultats préliminaires ont montré que pour les animaux 636 et 803 vaccinés avec un vaccin à bactéries atténuées, le sérum post-immunisation réagit avec la protéine recProt 05140 (données non montrées) et que le sérum pré-immun est négatif par « dot plot ». Le dosage immuno-enzymatique n'a toutefois pas confirmé ce résultat ; cela peut s'expliquer par une réponse humorale trop faible à quantifier ou un défaut de sensibilité du test.

Le test a ensuite été mis en place pour la protéine recProt 01230. Tous les animaux étaient naïfs avant la vaccination et 4/5 présentaient une absence d'anticorps contre ERG_CDS_01230 à J0 (Figure 22A).

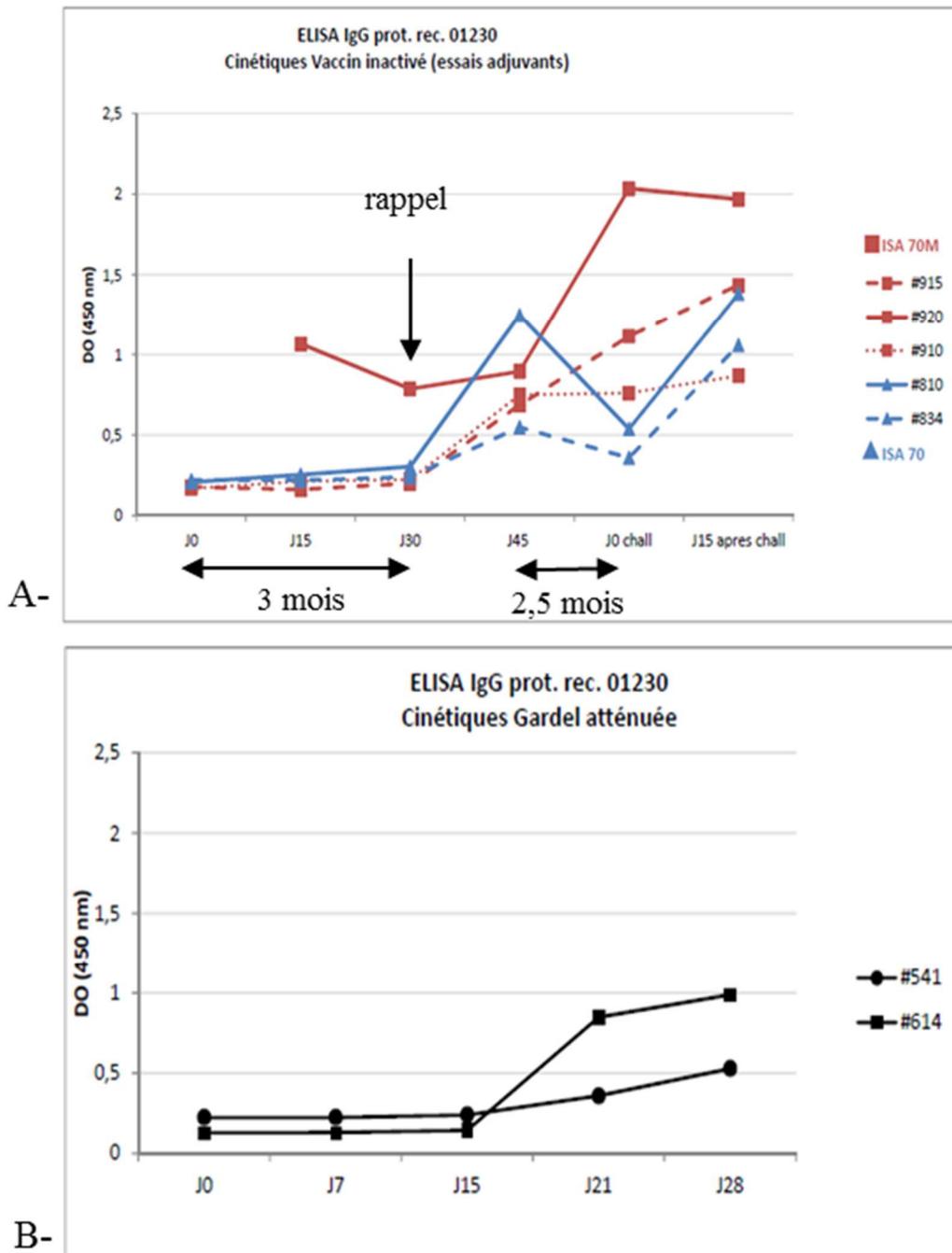


Figure 22 : Réponse anticorps à la protéine recProt 01230 au cours d'une cinétique de vaccination. ELISA (C. Puech) A- Réponse anticorps anti ERGA_CDS_01230 dans le sang des caprins après vaccination avec le vaccin inactivé et épreuve B- Réponse anticorps après vaccination avec la souche Gardel atténuée et épreuve. Chall : épreuve/ infection.

Le sérum de l'animal 920 n'a pas été testé à J0 mais l'animal était naïf comme les autres. L'ELISA montre bien qu'il y a une réponse humorale contre cette protéine pour les 5 animaux avec une augmentation de la réponse anticorps au cours du temps. En effet, on distingue la mise en place d'une réponse anticorps entre J30 et J45, J30 correspondant au rappel vaccinal pour 4 chèvres sur 5.

Le sérum de la chèvre 920 a une DO très élevée dès la primo vaccination. Entre J45 et l'épreuve, 2 mois et demi après, il apparaît une différence de réponse anticorps entre les animaux vaccinés avec l'Ag+ISA70 et l'Ag+ISA70M : la réponse anticorps apparaît plus stable ou plus efficace pour les animaux vaccinés avec le vaccin+ISA70M alors qu'elle semble diminuer pour ceux vaccinés avec le vaccin+ISA 70 (chèvres 810 et 834). Après l'épreuve, la réponse anticorps est stable ou augmente en fonction des animaux. Ces observations devraient être analysées avec un test statistique adapté et reconfirmées par une répétition de l'essai.

Sur le graphe B, la réponse humorale semble proportionnelle à la quantité de vaccin à bactéries atténuées inoculée, la chèvre 614 inoculée avec 9×10^5 corps élémentaires d'*E. ruminantium* présentant à J21 et J28 une réponse humorale légèrement plus élevée que la chèvre 541 inoculée avec 9×10^4 corps élémentaires.

Les protéines ERGA_CDS_01230 et 05140 induisent une réponse humorale lors d'une vaccination avec les vaccins à bactéries inactivées et atténuées.

Discussion

Les mécanismes d'infection de la cellule hôte par *E. ruminantium* sont peu connus et ce mémoire se propose de caractériser 2 protéines de la membrane externe de cet agent pathogène et leur rôle dans l'adhésion et l'invasion des cellules endothéliales et de l'hôte.

Le système d'expression *Leishmania tarentolae* est adapté à la production de protéines recombinantes d'*E. ruminantium*

Le système *L. tarentolae* est adapté pour l'expression avec une étiquette histidine des protéines de fusion GFP ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140. Ces deux protéines ont des caractéristiques différentes (cytoplasmique et de la membrane externe pour l'une, membrane externe et extracellulaire pour l'autre) avec des MPTs, notamment de type glycosylation. Le système serait toutefois plus efficace pour la production de N-glycosylation complexes que pour les O-glycosylations (Niimi, 2016) dont sont pourvues les protéines ERGA_CDS_01230 et ERGA_CDS_05140. Toutefois, Klatt *et al* (2013) ont publié la production d'une protéine fonctionnelle d'un précurseur amyloïde O- et N-glycosylé. Ce système pourra donc être utilisé pour d'autres protéines d'agents pathogènes qui subissent des MPTs. Les glycosylations sont importantes dans l'invasion comme expliqué ci-dessous.

Ces protéines recombinantes ont été utilisées pour étudier l'interaction d'*E. ruminantium* avec les BAEC et pour tester l'immunogénicité des protéines natives lors de vaccination avec du vaccin à bactéries inactivées ou atténuées.

Le repliement des protéines joue un rôle très important dans leurs interactions avec d'autres molécules ou surfaces (Stefani, 2008). Les effets d'une surface sur le repliement et l'agrégation des protéines dépendent des caractéristiques chimiques du monomère, de son état plié ou déplié, de ses propriétés physico-chimiques, y compris son potentiel électrostatique et son hydrophobie ainsi que de la façon dont il interagit avec la surface. Le repliement peut donc impacter l'accès de la protéine ou de son étiquette à un anticorps (cas de l'étiquette histidine pour recProt 01230 en immuno-blotting ou cas des anticorps caprins anti-05140 lors de l'ELISA) et limiter sa fixation à un support (bille). Il peut aussi avoir un impact sur la fluorescence de la GFP (différence de fluorescence observée entre recProt 01230 et 05140). De plus, (Engel *et al*, 2004) confirment que l'interaction d'une protéine avec des interfaces hydrophobes comme des nano-sphères de polystyrène peut influencer sur le bon repliement d'une protéine, capable de diminuer les propriétés de sa forme native.

Caractérisation d'ERGA_CDS_05140

La protéine recProt 05140 a montré une affinité pour les BAEC par CF. Mais même à des concentrations élevées en protéines recombinantes, seules 50 à 60% des cellules sont marquées, pour recProt 01230 et 05140 (données non montrées). Cela laisse supposer que toutes les cellules n'ont pas de ligand, en quantité insuffisante pour que la protéine recombinante y adhère et soit détectée ou encore que la population de cellules est hétérogène (cellules mortes/ vivantes ou sous-populations de cellules endothéliales). Ferreira *et al* (2018) expliquent que l'activité de ligands spécifiques et leur « turnover » sont régulés par des mécanismes post-traductionnels dont la glycosylation.

Cependant la protéine recProt 05140 n'a pas été capable de se fixer à la cellule hôte une fois adsorbée à des billes ; son repliement une fois adsorbée aux billes n'a pas été exploré. Ce résultat n'est pas en adéquation avec les observations faites en CF en termes d'adhésion aux cellules. La microscopie fait intervenir des billes, qui requièrent une fixation préalable de la protéine recombinante, ce qui pourrait modifier son repliement, cachant ainsi dans ces conditions le récepteur aux BAEC et empêchant ainsi sa fixation, contrairement à ce qui a été observé lorsqu'elle est sous forme libre. De plus, l'intégralité de la structure T^{aire} de la protéine n'a probablement pas été produite, la taille obtenue étant plus petite que celle prédite. Toutefois, la GFP et l'étiquette histidine étant bien présentes et situées à l'extrémité C-term de la protéine, nous pouvons en conclure que la potentielle délétion se trouve à l'extrémité N-term de la protéine recombinante, donc à l'extrémité extracellulaire qui interagit avec l'hôte, ce qui pourrait ne pas permettre une fonction (adhésion) optimale dans ce cas-là.

D'après sa structure prédictive, la protéine ERGA_CDS_05140 a une structure en « tonneau β », proche de celle d'une porine comme c'est le cas chez *E. coli* sous forme de trimère (Lou *et al*, 2011), jouant un rôle important dans l'acquisition de nutriments et avec un site de fixation à un ligand, qui pourrait lui permettre de se fixer à la cellule hôte.

Au niveau de l'expression des transcrits, il n'a pas été possible de statuer sur la variation d'expression du gène ERGA_CDS_05140 au cours du temps, qui diffère d'une cinétique à l'autre. Cela peut s'expliquer par le fait que la pré-amplification a amplifié des transcrits présents initialement en très faible quantité et non représentatifs de l'état réel de transcription de la bactérie. Emboule *et al* (2009) avaient d'ailleurs utilisé la méthode SCOTS afin de contourner ces problèmes et de pouvoir étudier le transcriptome d'*E. ruminantium* à différents stades de développement et notamment au stade corps réticulés à 24 et 48 hpi où les quantités

de transcrit bactérien sont en très faible quantité. Pruneau *et al* (2012) ne détectent pas de différentiel d'expression entre les stades pour ERG_CDS_05140 pour la souche Gardel. Nous avons montré une augmentation des transcrits associés à la protéine au stade corps élémentaires, ce qui pourrait malgré tout suggérer un rôle de celle-ci dans l'invasion des cellules, les corps élémentaires étant infectieux.

Enfin, la protéine ERGA_CDS_05140 semble immunogène mais la détection d'anticorps n'a été mise en évidence que par « dot blot » ; l'adsorption de recProt 05140 sur une membrane PVDF et un puits de polystyrène peut aboutir à des conformations différentes. Cela suggère aussi que la réponse humorale obtenue lors de la vaccination des animaux pourrait être trop faible pour être quantifiée.

L'intérêt porté à cette protéine vient aussi du fait qu'elle est surexprimée chez la souche atténuée avec une modification importante de la composition des protéines de membranes alors que la famille Map est sous- exprimée chez la souche atténuée (Pruneau, 2012 ; Marcelino *et al*, 2015b). L'une des hypothèses est que les protéines Map qui induisent une forte réponse humorale non protectrice sont probablement un leurre pour le système immunitaire, lors d'une infection avec la souche virulente. Ce sont probablement d'autres protéines membranaires qui permettent d'induire une protection lors des vaccinations avec la souche virulente inactivée ou la souche atténuée. Nous avons ciblé ERGA_CDS_05140 car c'est la protéine la plus fortement surexprimée chez l'atténuée. Chez l'animal, il y a multiplication de la souche atténuée car elle peut être mise en évidence et quantifiée lors de l'hyperthermie d'un animal infecté expérimentalement, ce qui prouve qu'elle a la capacité d'infecter et de se multiplier dans les cellules au moins pour un cycle de développement. Par contre, la souche n'induit que de faibles signes cliniques et est rapidement éliminée.

Caractérisation d'ERGA_CDS_01230

Ce travail a aussi permis de mettre en évidence que la protéine ERGA_CDS_01230 participe à l'adhésion d'*E. ruminantium* à la BAEC, voire à son internalisation. de la Fuente *et al* (2004) ont déjà rapporté la capacité de la mucine, adhésine d'*E. ruminantium*, à adhérer à des cellules de tique et suggère que la glycosylation des protéines bactériennes de membrane externe peut avoir un rôle dans l'adhésion. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse de l'existence sur *E. ruminantium* de plusieurs récepteurs intervenant dans l'invasion des cellules hôtes.

La structure prédictive de la protéine ERGA_CDS_01230 a une grande analogie avec la structure tridimensionnelle de la protéine FbpA de liaison du fer de *Campylobacter jejuni* et d'*Haemophilus influenzae*, de forme « c-clamp » à feuillet β (Shouldice *et al*, 2003 ; Tom-Yew *et al*, 2005). Au-delà de sa fonction probable de récepteur ERGA_CDS_01230, que nous nous proposons de nommer eFbpA (par analogie, *Ehrlichia* FbpA), pourrait donc aussi être un transporteur de fer. Cette protéine membranaire à prolongement cytoplasmique semble impliquée dans le transport de molécules nécessaires au développement et à la pathogénèse d'*E. ruminantium* car elle dispose de sites de liaison à un ligand.

ERGA_CDS_01230 est un récepteur intervenant dans l'adhésion

Les protéines ayant des fonctions de transport, peuvent cependant aussi intervenir dans l'adhésion des agents pathogènes à leurs cellules hôtes. En effet, Cao *et al* (2018) rapportent que la fixation et le pouvoir d'invasion de mutants de *S. pneumoniae* délétés au niveau des 2 protéines qui forment l'ABC transporteur de fer PitA, sont diminués et que ce transporteur de fer joue un rôle dans l'adhésion de la bactérie aux cellules pulmonaires. Chez d'autres bactéries intracellulaires (Tableau 6), les récepteurs peuvent être des protéines de surface mais aussi des effecteurs capables d'interagir directement avec l'actine du cytosquelette remanié pour laisser pénétrer l'agent pathogène (de la Fuente *et al*, 2003).

Agent pathogène		Famille	Récepteur intervenant dans l'adhésion à l'hôte	Source
<i>Anaplasma marginale</i>	Intracellulaire obligatoire	<i>Anaplasmataceae</i>	Msp1a, OmpA	de la Fuente <i>et al</i> (2003) ; Hebert <i>et al</i> (2017)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			Asp14, OmpA	Kahlon <i>et al</i> (2013); Ojogun <i>et al</i> (2012)
<i>Coxiella burnetii</i>		<i>Coxiellaceae</i>	OmpA	Martinez <i>et al</i> (2014)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		<i>Anaplasmataceae</i>	EtpE	Mohan Kumar <i>et al</i> (2013)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Intracellulaire facultative	<i>Listeriaceae</i>	Internaline A et B	Bonazzi <i>et al</i> (2009a) ; Bonazzi <i>et al</i> (2009b)
<i>Rickettsia conorii</i>	Intracellulaire obligatoire	<i>Rickettsiaceae</i>	OmpA	Hillman <i>et al</i> (2013)
<i>Wolbachia pipientis</i>		<i>Anaplasmataceae</i>	Effecteur de type IV, localisateur d'actine	Sheehan <i>et al</i> (2016)

Tableau 6 : Récepteurs de bactéries intracellulaires intervenant dans l'invasion de l'hôte

Une autre famille de protéines pouvant avoir un rôle de récepteur est la famille des protéines OmpA, souvent présentes chez les bactéries Gram négatives de manière abondante à la surface des agents pathogènes, a été décrite chez nombre d'entre eux comme intervenant dans la pathogénèse. Elles jouent aussi un rôle dans l'adhésion aux surfaces des muqueuses, l'invasion, la résistance aux peptides antimicrobiens et l'activation de la cellule hôte (Confer *et al*, 2013). Il est important de retenir qu'il y a une forte conservation des protéines OmpA parmi les genres *Anaplasma*, *Ehrlichia* et au sein de l'espèce *O. tsutsugamushi* (Ojogun *et al*, 2012) ; par exemple OmpA, protéine de la membrane externe promeut l'infection des cellules hôtes par *Anaplasma phagocytophilum*. L'homologue d'OmpA chez *E. ruminantium* est la protéine « WP_011255692.1, ERGA_CDS_05800 » annotée comme appartenant à la famille des protéines OmpA et qui a une localisation subcellulaire périplasmique et extracellulaire. Cela pourrait potentiellement en faire un récepteur et constituer le prochain candidat intéressant à produire dans *Leishmania* et à tester au niveau de l'adhésion et de l'internalisation d'*E. ruminantium*.

Mohan Kumar *et al* (2015) ont décrit qu'*E. chaffeensis* utilise la région C-terminale de sa protéine de surface EtpE pour lier la protéine DNase X présente à la surface des cellules de l'hôte. La recherche d'homologie d'EtpE (WP_011452964) chez *E. ruminantium* met en évidence le gène ERGA_CDS_08340 ([CAI28286.1](#)), qui code une protéine hypothétique que la prédiction de localisation subcellulaire situe au niveau de la membrane externe. L'équipe slovaque spécialisée dans la production de protéines recombinantes dans *Leishmania tarentolae* a tenté de produire la protéine ERGA_CDS_08340 mais ses tentatives sont restées infructueuses (communication personnelle, M. Bhide). Cette protéine recombinante aurait pu constituer, s'il avait été possible de la produire, un bon candidat dans les investigations menées dans ce mémoire pour la caractérisation d'un récepteur intervenant dans l'adhésion d'*E. ruminantium* à son hôte.

Il n'est donc pas possible pour l'instant de statuer sur le rôle de l'homologue d'EtpE dans ces fonctions. Enfin, l'homologue de ERGA_CDS_01230 chez *E. chaffeensis* code lui aussi un ABC transporteur de fer ([WP_006010454.1](#)), qui n'a pas été montré jusqu'à présent comme intervenant dans le processus de pénétration de la bactérie dans l'hôte.

Suite aux essais d'adhésion, les images obtenues par microscopie électronique ont révélé une possible internalisation des billes adsorbées avec la protéine recProt 01230. En effet, on distingue une invagination plus ou moins importante de certaines billes dans la membrane externe de la cellule, ce qui correspondrait à de l'endocytose à « fermeture éclair ». Chez *R. conorii*, le ligand Ku70 situé sur la membrane plasmique de l'hôte se lie *via* le récepteur bactérien OmpB, ce qui fait intervenir l'actine, l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl, permettant une internalisation clathrine et cavéoline dépendante (Chan *et al*, 2009 ; Martinez, 2012).

Afin de confirmer le rôle d'ERGA_CDS_01230 dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux BAEC, il peut être envisagé de bloquer la protéine avec des anticorps polyclonaux (produits par injection de la protéine recombinante à un lapin) ou monoclonaux puis de procéder à de nouveaux tests d'adhésion (de la Fuente *et al*, 2003) en incubant les cellules avec les anticorps avant infection par *E. ruminantium*. Comme observé chez certaines bactéries, les adhésines ne sont pas toujours des invasives. L'internalisation d'*E. ruminantium* grâce à l'interaction d'ERGA_CDS_01230 avec la cellule endothéliale pourrait être observée par microscopie électronique à transmission pour vérifier que des billes adsorbées avec la protéine recombinante ERGA_CDS_01230 sont bien invaginées. Si l'internalisation est confirmée, il est ensuite possible d'inhiber la dynamique du réseau d'actine avant infection, pour explorer cette fois-ci les mécanismes d'endocytose (Mohan Kumar *et al*, 2015 ; Martinez, 2012)

L'expression du gène ERGA_CDS_01230 semble augmenter à chaque stade de développement avec un maximum atteint lors de la lyse bactérienne, ce qui renforce l'hypothèse de l'implication de la protéine ERGA_CDS_01230 dans l'adhésion aux cellules à coloniser. En effet, lors de la lyse, *E. ruminantium* se retrouve dans le milieu, prête à coloniser un nouvel hôte ; c'est à ce moment-là que s'effectue l'adhésion à une autre cellule hôte et que son récepteur doit donc être disponible et fortement exprimé.

Ce résultat est nouveau et différent de ce qui a été observé notamment lors d'une analyse de données générées par microarrays où les niveaux d'expression n'étaient pas significativement différents au cours du temps (Pruneau, communication personnelle). Cela peut être lié au fait que les méthodes de qPCR peuvent être plus sensibles que les microarrays dans certains cas.

Les ligands et l'importance des glycosaminoglycanes dans l'adhésion d'E. ruminantium

Ces interactions cellules hôtes/ agent pathogène font interagir le récepteur de l'un et le ligand de l'autre, qu'il est crucial d'identifier pour comprendre le processus d'invasion et pouvoir le

bloquer. Nous avons mis en évidence qu'ERGA_CDS_01230 interagit avec les protéines du lysat cellulaire et la fraction « membranes et organelles » des BAEC. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour isoler le ligand d'ERGA_CDS_01230 et d'ERGA_CDS_05140 mais elles n'ont pas été fructueuses. La nature du ligand d'*E. ruminantium* à la surface des cellules hôtes reste pour l'instant inconnue.

Chez *Wolbachia*, la protéine WD0830 interagit avec l' α -synucléine retrouvée co-localisée au niveau des filaments d'actine de l'hôte afin de manipuler son cytosquelette et permettre son entrée (Sheehan *et al*, 2016). *Rickettsia conorii* se lie *via* sa protéine OmpA à l' α 2 β 1 intégrine, précédemment impliquée dans des processus d'endocytose cavéoline- et clathrine- dépendants (Hillman *et al*, 2013). Lin *et al* (2003) suggèrent que les protéines liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont impliquées dans l'adhésion d'*Anaplasma phagocytophilum* et d'*Ehrlichia chaffeensis* à leur cellule hôte. De plus, le cholestérol, constituant essentiel des cavéoles et radeaux lipidiques, joue un rôle important dans la survie et l'infection des cellules hôte et cela d'autant plus que *E. chaffeensis* et *A. phagocytophilum* n'ont pas les gènes nécessaires à la synthèse des lipides A et des peptidoglycanes.

Nous avons cependant constaté que la protéine recProt 01230 se fixe en plusieurs endroits du « Far Western blot », ce qui pourrait laisser supposer que l'adhésion à la cellule hôte pourrait, en complément d'un ligand spécifique, aussi se faire grâce à des molécules plus génériques et moins spécifiques, telles que les protéoglycanes. Plusieurs agents pathogènes expriment des adhésines de liaison aux glycosaminoglycanes pour s'attacher aux tissus de la cellule hôte.

Nous avons montré que la protéine recProt 01230 n'a pas d'affinité pour l'héparane sulfate qui ne semble pas être un ligand de cette protéine, mais l'effet de la dégradation des héparanes sulfate à la surface des BAEC de manière plus générale doit être confirmée.

En complément et plus globalement, la dégradation de la chondroïtine et du dermatane sulfate aboutit à une diminution du nombre de bactéries présentes lors de la lyse cellulaire, indiquant qu'ils pourraient être des ligands ou co-ligands impliqués dans l'adhésion d'*E. ruminantium* à la cellule hôte. L'inhibition de l'invasion des BAEC par *E. ruminantium* n'a cependant pas été complète, ce qui suggère bien la présence potentielle d'autres ligands à la surface des cellules. Les GAGs constituent une barrière physique à surface de la cellule. Leur dégradation rend probablement la cellule hôte plus accessible et vulnérable notamment lors de l'infection par *E. ruminantium*, ce qui explique l'obtention de cellules plus abimées lors de l'infection.

Les GAGs ont été décrits comme intervenant dans l'attachement et l'internalisation des virus, parasites mais aussi de plusieurs bactéries dont *Listeria monocytogenes* ou *Borrelia burgdorferi*. En effet, Jonquieres *et al* (2001) ont démontré que l'internaline InLB, responsable de l'invasion par *Listeria monocytogenes*, se lie aux GAGs par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale et que cette interaction favorise l'invasion de la cellule hôte déclenchée par l'extrémité N-terminale. L'adhésine OmpA d'*A. marginale* reconnaît des glycanes sur la cellule hôte (Hebert *et al*, 2017).

Chez *Borrelia burgdorferi*, plusieurs protéines de surface ont été montrées comme se fixant aux GAGs ou peptidoglycanes. Ainsi, DbpA et DbpB (connues pour promouvoir l'attachement à différents types de cellules de mammifères) sont des protéines identifiées comme liant la décorine, le biglycane et le dermatane sulfate (Lin *et al*, 2017).

Pour ce qui est des Rickettsiales, peu d'articles décrivent leurs interactions avec des protéoglycanes. Mais Sahni *et al* (2017) ont publié que les héparanes sulfates facilitent l'interaction entre les facteurs de croissance des fibroblastes et les récepteurs de tyrosines kinases (situés à la surface de l'hôte), impliqués dans l'adhésion d'agents pathogènes du genre *Rickettsia* aux cellules de l'endothélium. Ainsi, le peptide β de la protéine de la membrane externe OmpA se lie aux ligands des facteurs de croissance des fibroblastes 1 (FGFR1), qui se lient à la cavéoline et permettent l'entrée de la bactérie par endocytose cavéoline-dépendante. Cela démontre donc l'importance de la confirmation des résultats déjà obtenus.

Des essais supplémentaires devront être effectués pour confirmer ces résultats préliminaires en augmentant notamment le nombre de répliques biologiques et techniques ; des tests immunoenzymatiques complémentaires pourront être envisagés, avec l'adsorption d'autres GAGs tels que le dermatane sulfate, la chondroïtine sulfate, le kératane sulfate et le hyaluronane afin de tester leur affinité avec la protéine recProt 01230 (Jonquieres *et al*, 2001). Après traitement enzymatique visant à dégrader les GAGs, l'interaction avec la protéine recombinante recProt 01230 pourrait être quantifiée par CF *via* l'étiquette GFP.

La glycosylation d'ERGA_CDS_01230

Nous avons choisi d'utiliser le système *Leishmania tarentolae* pour la production de ces protéines recombinantes afin d'obtenir des modifications post-traductionnelles difficilement synthétisées par *E. coli*. Ainsi, des O-glycosylations ont été mises en évidence sur recProt 01230 et 05140, suggérant que les protéines natives le sont aussi. Les résultats pour la protéine ERGA_CDS_05140 ont par ailleurs été confirmés dans les études de protéomique

précédemment publiées. Ces glycosylations ont été relevées à maintes reprises au niveau des fonctions de motilité (O-glycosylation OTase indépendante) et d'adhésion, *E. ruminantium* n'ayant pas été démontrée comme étant motile. Toutefois, les adhésines sont souvent glycosylées et fréquemment associées à des fonctions d'adhésion, d'invasion ou d'auto-agrégation, ce qui pourrait bien être le cas de la protéine ERGA_CDS_01230.

Les *Streptococcus* et *Staphylococcus* synthétisent des adhésines glycosylées, impliquées dans l'adhésion aux cellules hôtes notamment. La maturation et la glycosylation de ces adhésines se font par l'intermédiaire de glycosyltransférases, sécrétion de protéines et protéines accessoires. L'interaction entre les protéines accessoires et les composants du système de sécrétion est requise pour la maturation et l'export de protéines glycosylées (Iwashkiw *et al*, 2013).

Mais la glycosylation pourrait surtout contribuer à la stabilité de la protéine à la surface de la cellule plutôt qu'à initier le contact avec le ligand cellulaire comme observé chez *E. coli* (Charbonneau *et al*, 2007). Il a aussi été démontré dans ces travaux que la glycosylation confère une résistance partielle aux protéases, ce qui peut donc contribuer à la protection de l'agent pathogène contre les attaques de son hôte.

Campylobacter jejuni infecte et envahit l'épithélium du petit intestin et du colon. Cette invasion dépend de la motilité conférée par les flagelles et de la présence d'adhésines telles PEB1a, CapA ou MOMP (Valguarnera *et al*, 2016). Jusqu'ici uniquement portée par les flagellines, il a été montré que la protéine majeure de surface MOMP est aussi O-glycosylée. Cette modification conformationnelle permet son interaction avec des antigènes particuliers, son auto-agrégation ou la formation d'un biofilm, confirmant l'importance de ces MPTs dans la pathogénèse de cette bactérie (Mahdavi *et al*, 2014). Les adhésines AIDA1, Ag43 et TibA O-glycosylées ont aussi un rôle dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales par *E. coli* (Valguarnera *et al*, 2016).

L'implication la plus importante que pourrait avoir la O-glycosylation chez *E. ruminantium* au vu de ce qui a été exposé ci-dessus, est la glycosylation d'adhésines comme montré pour ERGA_CDS_01230, voire d'invasines, éléments cruciaux de la pathogénèse de cette bactérie. D'après Postigo *et al* (2008), la protéine Map1 exprimée par *E. ruminantium* dans les BAEC et les 3 formes de Map1-1 exprimée dans les cellules de tiques sont des glycoprotéines.

L'immunogénicité d'ERGA_CDS_01230

La protéine ERGA_CDS_01230 a été montrée comme étant capable d'induire une réponse anticorps lors de vaccination avec le vaccin à bactéries inactivées ou atténuées. L'effet protecteur de cette protéine pourrait être testé sur animaux en produisant un vaccin contenant la protéine recombinante glycosylée émulsionnée avec ISA70M. Ceci est d'autant plus important qu'ERGA_CDS_01230 semble jouer un rôle clé dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux cellules de l'hôte.

Conclusions et perspectives

La compréhension des mécanismes d'adhésion et d'internalisation permet d'étendre les connaissances sur la pathogénèse d'*Ehrlichia ruminantium* (*E. ruminantium*). Elle permet aussi d'envisager des méthodes de lutte contre la cowdriose, dont celles qui cibleraient notamment le récepteur de l'agent pathogène ou le ligand au niveau de la cellule hôte.

Dans ce contexte, notre travail de recherche a montré que la protéine ERGA_CDS_01230, eFbpA, de structure « c-clamp » avec un site de liaison à un ligand, est une protéine permettant l'adhésion à la cellule hôte. Cette protéine est plus exprimée à la fin du cycle de développement d'*E. ruminantium* au stade corps libre infectieux, ce qui renforce l'hypothèse qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'invasion d'*E. ruminantium*. Elle est O-glycosylée. Nous avons montré que la protéine ERGA_CDS_01230 induit une réponse humorale chez les animaux vaccinés avec le vaccin à bactéries inactivées ou atténuées. La O-glycosylation est souvent mise en évidence chez les adhésines dans d'autres modèles bactériens ; les glycanes, importants déterminants épitopiques sont capables d'induire une réponse immunitaire protectrice (Faburay *et al*, 2017). D'autre part, la protéine ERGA_CDS_05140 d'*E. ruminantium*, protéine de la membrane externe, qui est aussi O-glycosylée, semble capable d'adhérer aux BAEC mais uniquement lorsqu'elle est sous forme libre. Nous avons uniquement pu confirmer sa capacité d'adhésion par la CF. La protéine native induit une réponse humorale lors d'une vaccination avec le vaccin à bactéries inactivées ou atténuées mais beaucoup plus faible qu'ERGA_CDS_01230, et difficilement quantifiable. Etant donné les résultats obtenus pour ERGA_CDS_05140 sur son rôle dans l'adhésion, il n'est pas envisagé de continuer à l'étudier plus en avant.

Les protéines OmpA bactériennes, protéines de la membrane externe, sont considérées comme de nouveaux motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs). Elles constituent les antigènes les plus immuno-dominants de la membrane externe des bactéries Gram-négatives, ce qui en fait de bons candidats vaccinaux (Martinez *et al*, 2014 ; Confer *et al*, 2013). OmpA ou ses homologues ont déjà fait partie de la formulation de plusieurs vaccins, notamment chez *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) avec l'homologue OprF ou encore chez la famille des *Pasteurellaceae*. Cependant, dans certains cas comme chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*), il a été rapporté qu'OmpA est fortement immunogène mais ne protège pas contre l'infection (Confer *et al*, 2013). Il pourrait être envisagé de tester d'autres protéines de membrane externe pour leur rôle dans l'invasion

des cellules : la protéine CDS ERGA_CDS_05800, homologue d'OmpA d'*Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) ou l'homologue d'OmpA d'*Anaplasma marginale* (*A. marginale*) (Hebert *et al*, 2017).

Pour la protéine ERG_CDS_01230 plusieurs perspectives ont été identifiées :

- 1/ approfondir son rôle dans l'invasion des cellules en étendant aux cellules endothéliales de la microvasculature plus proche des cellules cibles de l'hôte
- 2/ évaluer son rôle de transporteur de fer. L'effet de la carence ou de l'excès de fer sur les niveaux d'expression du gène *in vitro* pourra aussi être étudié pour mieux caractériser le rôle d'ERG_CDS_01230 dans le transport du fer
- 3/ évaluer le taux d'infection des cellules après avoir incubé les cellules ou les bactéries avec des anticorps anti ERGA_CDS_01230. Si le rôle de récepteur d'*E. ruminantium* de la protéine ERGA_CDS_01230 est prouvé, elle pourrait être utilisée comme protéine à inclure dans un vaccin recombinant à tester sur animaux
- 4/ utiliser le double hybride afin de mettre en évidence le ligand d'ERG_CDS_01230 en criblant une banque d'ADNc constituée d'un ensemble de protéines de l'hôte.

Dans cette étude, nous avons montré pour la 1^{ère} fois le rôle important de la chondroïtine sulfate et du dermatane sulfate dans l'adhésion d'*E. ruminantium* aux cellules hôtes. Des expériences complémentaires seront à faire pour confirmer leur rôle et étudier le rôle d'autres GAGs.

Plus largement, Aquino *et al* (2016) expliquent que les mécanismes de subversion des GAGs par les agents pathogènes sont des cibles potentielles pour le développement de thérapies antimicrobiennes, hautement spécifiques et largement efficaces. Bartlett *et al* (2010) abondent dans ce sens et proposent plusieurs méthodes qui inhibent efficacement l'infection dans les cellules et les modèles animaux cliniques :

- des GAGs de synthèse rivalisant avec les GAGs endogènes,
- des composés cationiques qui se lient et inhibent les GAGs,
- des inhibiteurs de la synthèse des GAGs
- ou encore le « knock-down » sélectif d'enzyme biosynthétique des GAGs ou de gènes des protéines de base des protéoglycanes.

Cependant, la toxicité et les effets hors-cible potentiels sont actuellement des obstacles majeurs à l'utilisation de ces composés *in vivo*. Une des stratégies de prévention des interactions agent pathogène-GAGs serait d'identifier les protéines d'agents pathogènes liant les GAGs et de dessiner de petites molécules analogues mimant le motif contribuant directement à l'activité de

liaison des GAGs (Lin *et al*, 2017). Plusieurs héparines et analogues de l'héparane sulfate ont provoqué des réductions de l'infection microbienne en bloquant l'interaction agent pathogène-héparane sulfate. Mais les GAGs incluant l'héparine interviennent dans de nombreuses fonctions comme l'anticoagulation et l'un des effets secondaires des propositions ci-dessus est l'observation de saignements et de thrombocytopénie (Lin *et al*, 2017).

Iwashkiw *et al* (2013) proposent la synthèse de glycoprotéines bactériennes recombinantes comme vaccin contre *C. jejuni* ; ils proposent aussi des composés inhibant la glycosylation des flagellines ou adhésines comme antimicrobien. Chez *E. ruminantium*, Faburay *et al* (2017) a récemment étudié la réponse immunitaire de moutons lors d'une vaccination avec un vaccin recombinant contenant une sous-unité glycosylée de la protéine Map1. La vaccination a induit une réponse CD4+ avec une production d'IFN γ qui est associée à une réponse immunitaire protectrice. Cependant aucune épreuve n'a été réalisée lors de cette étude. L'unité de recherche a d'ailleurs un projet d'évaluation de l'efficacité du vaccin recombinant Map1 glycosylé en collaboration avec des partenaires américains de l'Université du Kansas.

Krachler *et al* (2013) explique que des anticorps dirigés contre les adhésines bactériennes ont été utilisés comme stratégie anti-adhésion. L'hôte peut donc être immunisé avec une adhésine bactérienne, une sous-unité de celle-ci ou des fragments peptidiques immunogéniques. Plus récemment, l'utilisation d'un vaccin ADN codant une adhésine ou une partie de celle-ci a aussi été exploitée. Ces stratégies anti-adhésion sont une alternative à l'utilisation d'antimicrobiens et permettraient d'éviter des résistances bactériennes. L'identification d'adhésines d'*E. ruminantium* serait donc importante pour aller vers cette voie de recherche.

Bibliographie

- Adakal, H., F. Stachurski, M. Konkobo, S. Zoungrana, D. F. Meyer, V. Pinarello, R. Aprelon, I. Marcelino, P. M. Alves, D. Martinez, T. Lefrancois and N. Vachiery, 2010: Efficiency of inactivated vaccines against heartwater in Burkina Faso: impact of *Ehrlichia ruminantium* genetic diversity. *Vaccine*, **28**, 4573-4580.
- Allsopp, B. A., 2009: Trends in the control of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, **76**, 81-88.
- Allsopp, B. A., 2015: Heartwater--*Ehrlichia ruminantium* infection. *Rev Sci Tech*, **34**, 557-568.
- Aquino, R. S., E. S. Lee and P. W. Park, 2010: Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **93**, 373-394.
- Aquino, R. S. and P. W. Park, 2016: Glycosaminoglycans and infection. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **21**, 1260-1277.
- Aquino, R. S., Y. H. Teng and P. W. Park, 2018: Glycobiology of syndecan-1 in bacterial infections. *Biochem Soc Trans*.
- Barre, N., G. Garris and E. Camus, 1995: Propagation of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean. *Rev Sci Tech*, **14**, 841-855.
- Bartlett, A. H. and P. W. Park, 2010: Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, **12**, e5.
- Bartlett, A. H. and P. W. Park, 2011: *Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection, chapter II*; Glycans in Diseases and Therapeutics; p. 188.
- Bencurova, E., A. Kovac, L. Pulzova, M. Gyuranecz, P. Mlynarcik, R. Mucha, D. Vlachakis, S. Kossida, Z. Flachbartova and M. Bhide, 2015: Deciphering the protein interaction in adhesion of *Francisella tularensis* subsp. *holartica* to the endothelial cells. *Microb Pathog*, **81**, 6-15.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede, 2014: SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, **42**, W252-258.
- Bioscience, J., 2011: LEXSinduce 3 Expression Kit for inducible expression of recombinant proteins in *Leishmania tarentolae*. 28.
- Bonazzi, M. and P. Cossart, 2006: Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett*, **580**, 2962-2967.
- Bonazzi, M., M. Lecuit and P. Cossart, 2009a: *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**, a003087.
- Bonazzi, M., M. Lecuit and P. Cossart, 2009b: *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cell Microbiol*, **11**, 693-702.
- Bournez, L., N. Cangi, R. Lancelot, D. R. Pleydell, F. Stachurski, J. Bouyer, D. Martinez, T. Lefrancois, L. Neves and J. Pradel, 2015: Parapatric distribution and sexual competition between two tick species, *Amblyomma variegatum* and *A. hebraeum* (Acari, Ixodidae), in Mozambique. *Parasit Vectors*, **8**, 504.

- Cangi, N., V. Pinarello, L. Bournez, T. Lefrancois, E. Albina, L. Neves and N. Vachiery, 2017: Efficient high-throughput molecular method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. *Parasit Vectors*, **10**, 566.
- Cao, K., J. Zhang, X. Y. Miao, Q. X. Wei, X. L. Zhao, Q. Y. He and X. Sun, 2018: Evolution and molecular mechanism of PitAs in iron transport of *Streptococcus* species. *J Inorg Biochem*, **182**, 113-123.
- Castilla, M. A., M. V. Arroyo, E. Aceituno, P. Aragoncillo, F. R. Gonzalez-Pacheco, E. Texeiro, R. Bragado and C. Caramelo, 1999: Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells : effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res*, **85**, 1132-1138.
- Chan, Y. G., M. M. Cardwell, T. M. Hermanas, T. Uchiyama and J. J. Martinez, 2009: Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol*, **11**, 629-644.
- Charbonneau, M. E., V. Girard, A. Nikolakakis, M. Campos, F. Berthiaume, F. Dumas, F. Lepine and M. Mourez, 2007: O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol*, **189**, 8880-8889.
- Confer, A. W. and S. Ayalew, 2013: The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol*, **163**, 207-222.
- Cox, J. and M. Mann, 2008: MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, **26**, 1367-1372.
- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, A. F. Barbet, E. F. Blouin and K. M. Kocan, 2004: Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) to tick cells. *Vet Microbiol*, **98**, 313-322.
- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin and K. M. Kocan, 2003: Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol*, **91**, 265-283.
- Diaz-Ramos, A., A. Roig-Borrellas, A. Garcia-Melero and R. Lopez-Alemany, 2012: alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*, **2012**, 156795.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa, 2001: Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 2145-2165.
- Emboule, L., F. Daigle, D. F. Meyer, B. Mari, V. Pinarello, C. Sheikboudou, V. Magnone, R. Frutos, A. Viari, P. Barbry, D. Martinez, T. Lefrancois and N. Vachiery, 2009: Innovative approach for transcriptomic analysis of obligate intracellular pathogen: selective capture of transcribed sequences of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC Mol Biol*, **10**, 111.
- Engel, M. F., A. J. Visser and C. P. van Mierlo, 2004: Conformation and orientation of a protein folding intermediate trapped by adsorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11316-11321.

- Faburay, B., J. McGill and F. Jongejan, 2017: A glycosylated recombinant subunit candidate vaccine consisting of *Ehrlichia ruminantium* major antigenic protein1 induces specific humoral and Th1 type cell responses in sheep. *PLoS One*, **12**, e0185495.
- Ferreira, I. G., M. Pucci, G. Venturi, N. Malagolini, M. Chiricolo and F. Dall'Olio, 2018: Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int J Mol Sci*, **19**.
- Frutos, R., A. Viari, C. Ferraz, A. Bensaid, A. Morgat, F. Boyer, E. Coissac, N. Vachery, J. Demaille and D. Martinez, 2006: Comparative genomics of three strains of *Ehrlichia ruminantium*: a review. *Ann N Y Acad Sci*, **1081**, 417-433.
- Gagoski, D., S. Mureev, N. Giles, W. Johnston, M. Dahmer-Heath, D. Skalamera, T. J. Gonda and K. Alexandrov, 2015: Gateway-compatible vectors for high-throughput protein expression in pro- and eukaryotic cell-free systems. *J Biotechnol*, **195**, 1-7.
- Gannon, F., J. Neilan and R. Powell, 1988: Current Protocols in Molecular-Biology - Ausubel, Fm. *Nature*, **333**, 309-310.
- Hall, R. A., 2015: Studying protein-protein interactions via blot overlay/far western blot. *Methods Mol Biol*, **1278**, 371-379.
- Hebert, K. S., D. Seidman, A. T. Oki, J. Izac, S. Emani, L. D. Oliver, Jr., D. P. Miller, B. K. Tegels, R. Kannagi, R. T. Marconi and J. A. Carlyon, 2017: Anaplasma marginale Outer Membrane Protein A Is an Adhesin That Recognizes Sialylated and Fucosylated Glycans and Functionally Depends on an Essential Binding Domain. *Infect Immun*, **85**.
- Hillman, R. D., Y. M. Baktash and J. J. Martinez, 2013: OmpA-mediated rickettsial adherence to and invasion of human endothelial cells is dependent upon interaction with alpha2beta1 integrin. *Cell Microbiol*, **15**, 727-741.
- Hobohm, U. and C. Sander, 1995: A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol*, **251**, 390-399.
- Iwashkiw, J. A., N. F. Voza, R. L. Kinsella and M. F. Feldman, 2013: Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation. *Mol Microbiol*, **89**, 14-28.
- Jinno, A. and P. W. Park, 2015: Role of glycosaminoglycans in infectious disease. *Methods Mol Biol*, **1229**, 567-585.
- Jonquieres, R., J. Pizarro-Cerda and P. Cossart, 2001: Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **42**, 955-965.
- Kahlon, A., N. Ojogun, S. A. Ragland, D. Seidman, M. J. Troese, A. K. Ottens, J. E. Mastronunzio, H. K. Truchan, N. J. Walker, D. L. Borjesson, E. Fikrig and J. A. Carlyon, 2013: *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect Immun*, **81**, 65-79.
- Kelley, L. A., S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass and M. J. Sternberg, 2015: The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, **10**, 845-858.
- Klatt, S., M. Rohe, K. Alagesan, D. Kolarich, Z. Konthur and D. Hartl, 2013: Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in *Leishmania tarentolae*. *J Proteome Res*, **12**, 396-403.

- Kobayashi, K., K. Kato, T. Sugi, H. Takemae, K. Pandey, H. Gong, Y. Tohya and H. Akashi, 2010: *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem*, **285**, 1716-1725.
- Krachler, A. M. and K. Orth, 2013: Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*, **4**, 284-294.
- Krishnan, S. and N. V. Prasadarao, 2012: Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J*, **279**, 919-931.
- Lin, M. and Y. Rikihisa, 2003: Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Cell Microbiol*, **5**, 809-820.
- Lin, Y. P., L. Li, F. Zhang and R. J. Linhardt, 2017: *Borrelia burgdorferi* glycosaminoglycan-binding proteins: a potential target for new therapeutics against Lyme disease. *Microbiology*, **163**, 1759-1766.
- Lou, H., M. Chen, S. S. Black, S. R. Bushell, M. Ceccarelli, T. Mach, K. Beis, A. S. Low, V. A. Bamford, I. R. Booth, H. Bayley and J. H. Naismith, 2011: Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PLoS One*, **6**, e25825.
- Lu, Q., S. Li and F. Shao, 2015: Sweet Talk: Protein Glycosylation in Bacterial Interaction With the Host. *Trends Microbiol*, **23**, 630-641.
- Lundberg, M., S. Wikstrom and M. Johansson, 2003: Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther*, **8**, 143-150.
- Mahdavi, J., N. Pirinccioglu, N. J. Oldfield, E. Carlsohn, J. Stoof, A. Aslam, T. Self, S. A. Cawthraw, L. Petrovska, N. Colborne, C. Sihlbom, T. Boren, K. G. Wooldridge and D. A. Ala'Aldeen, 2014: A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biol*, **4**, 130202.
- Maillard, J., 1998: The historical introduction of cattle and *Amblyomma variegatum* in the French West Indies: bibliographic synthesis. *Ethnozootechnie* **n°61**
- Marcelino, I., A. M. de Almeida, M. Ventosa, L. Pruneau, D. F. Meyer, D. Martinez, T. Lefrancois, N. Vachier and A. V. Coelho, 2012: Tick-borne diseases in cattle: applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J Proteomics*, **75**, 4232-4250.
- Marcelino, I., T. Lefrancois, D. Martinez, K. Giraud-Girard, R. Aprelon, N. Mandonnet, J. Gaucheron, F. Bertrand and N. Vachier, 2015a: A user-friendly and scalable process to prepare a ready-to-use inactivated vaccine: the example of heartwater in ruminants under tropical conditions. *Vaccine*, **33**, 678-685.
- Marcelino, I., M. F. Sousa, C. Verissimo, A. E. Cunha, M. J. Carrondo and P. M. Alves, 2006: Process development for the mass production of *Ehrlichia ruminantium*. *Vaccine*, **24**, 1716-1725.
- Marcelino, I., M. Ventosa, E. Pires, M. Muller, F. Lisacek, T. Lefrancois, N. Vachier and A. V. Coelho, 2015b: Comparative Proteomic Profiling of *Ehrlichia ruminantium* Pathogenic Strain and Its High-Passaged Attenuated Strain Reveals Virulence and Attenuation-Associated Proteins. *PLoS One*, **10**, e0145328.

- Marcelino, I., C. Verissimo, M. F. Sousa, M. J. Carrondo and P. M. Alves, 2005: Characterization of *Ehrlichia ruminantium* replication and release kinetics in endothelial cell cultures. *Vet Microbiol*, **110**, 87-96.
- Martinez, E., F. Cantet, L. Fava, I. Norville and M. Bonazzi, 2014: Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog*, **10**, e1004013.
- Martinez, J. J., 2012: *Invasion of the mammalian host : early events at the cellular and molecular levels : chapter IV*; Intracellular Pathogens II: Rickettsiales; p. 458.
- McBride, J. W., X. J. Yu and D. H. Walker, 2000: Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Infect Immun*, **68**, 13-18.
- Michelon, A., F. R. Conceicao, P. C. Binsfeld, C. W. da Cunha, A. N. Moreira, A. P. Argondizzo, D. McIntosh, G. R. Armoa, A. S. Campos, M. Farber, J. McFadden and O. A. Dellagostin, 2006: Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. *Vaccine*, **24**, 6332-6339.
- Miller, E. M. and J. A. Nickoloff, 1995: *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol*, **47**, 105-113.
- Mitra, S., P. S. Dunphy, S. Das, B. Zhu, T. Luo and J. W. McBride, 2018: *Ehrlichia chaffeensis* TRP120 effector targets and recruits host polycomb group proteins for degradation to promote intracellular infection. *Infect Immun*.
- Mohan Kumar, D., M. Lin, Q. Xiong, M. J. Webber, C. Kural and Y. Rikihisa, 2015: EtpE Binding to DNase X Induces Ehrlichial Entry via CD147 and hnRNP-K Recruitment, Followed by Mobilization of N-WASP and Actin. *MBio*, **6**, e01541-01515.
- Mohan Kumar, D., M. Yamaguchi, K. Miura, M. Lin, M. Los, J. F. Coy and Y. Rikihisa, 2013: *Ehrlichia chaffeensis* uses its surface protein EtpE to bind GPI-anchored protein DNase X and trigger entry into mammalian cells. *PLoS Pathog*, **9**, e1003666.
- Moumene, A., S. Gonzalez-Rizzo, T. Lefrancois, N. Vachiere and D. F. Meyer, 2017: Iron Starvation Conditions Upregulate *Ehrlichia ruminantium* Type IV Secretion System, tr1 Transcription Factor and map1 Genes Family through the Master Regulatory Protein ErxR. *Front Cell Infect Microbiol*, **7**, 535.
- Moumene, A., I. Marcelino, M. Ventosa, O. Gros, T. Lefrancois, N. Vachiere, D. F. Meyer and A. V. Coelho, 2015a: Proteomic profiling of the outer membrane fraction of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia ruminantium*. *PLoS One*, **10**, e0116758.
- Moumene, A. and D. F. Meyer, 2015b: *Ehrlichia's* molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes Infect*.
- Niimi, T., 2012: *Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite Leishmania tarentolae: a review*; 824; p. 307-315.
- Niimi, T., 2016: *Leishmania tarentolae for the Production of Multi-subunit Complexes*; 896; p. 155-165.
- Ojogun, N., A. Kahlon, S. A. Ragland, M. J. Troese, J. E. Mastronunzio, N. J. Walker, L. Viebrock, R. J. Thomas, D. L. Borjesson, E. Fikrig and J. A. Carlyon, 2012: *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane protein A interacts with sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells. *Infect Immun*, **80**, 3748-3760.

- Peixoto, C. C., I. Marcelino, N. Vachierey, A. Bensaid, D. Martinez, M. J. Carrondo and P. M. Alves, 2005: Quantification of *Ehrlichia ruminantium* by real time PCR. *Vet Microbiol*, **107**, 273-278.
- Perez, J. M., D. Martinez, C. Sheikboudou, F. Jongejan and A. Bensaid, 1998: Characterization of variable immunodominant antigens of *Cowdria ruminantium* by ELISA and immunoblots. *Parasite Immunol*, **20**, 613-622.
- Peter, T. F., M. J. Burridge and S. M. Mahan, 2002: *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol*, **18**, 214-218.
- Postigo, M., A. Taoufik, L. Bell-Sakyi, C. P. Bekker, E. de Vries, W. I. Morrison and F. Jongejan, 2008: Host cell-specific protein expression in vitro in *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Microbiol*, **128**, 136-147.
- Pretorius, A., N. E. Collins, H. C. Steyn, F. van Strijp, M. van Kleef and B. A. Allsopp, 2007: Protection against heartwater by DNA immunisation with four *Ehrlichia ruminantium* open reading frames. *Vaccine*, **25**, 2316-2324.
- Pruneau, L., 2012: Analyse du transcriptome d'*Ehrlichia ruminantium* agent causal de la cowdriose : mise en évidence des gènes impliqués dans la virulence et les mécanismes d'atténuation et application à l'élaboration d'un vaccin recombinant *Guadeloupe*. Thèse de Université des Antilles et de la Guyane.
- Pruneau, L., L. Emboule, P. Gely, I. Marcelino, B. Mari, V. Pinarello, C. Sheikboudou, D. Martinez, F. Daigle, T. Lefrancois, D. F. Meyer and N. Vachierey, 2012: Global gene expression profiling of *Ehrlichia ruminantium* at different stages of development. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **64**, 66-73.
- Pruneau, L., K. Lebrigand, B. Mari, T. Lefrançois, D. F. Meyer and N. Vachierey, 2018: Comparative Transcriptome Profiling of Virulent and Attenuated *Ehrlichia ruminantium* Strains Highlighted Strong Regulation of map1- and Metabolism Related Genes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**.
- Pruneau, L., A. Moumene, D. F. Meyer, I. Marcelino, T. Lefrancois and N. Vachierey, 2014: Understanding *Anaplasmataceae* pathogenesis using "Omics" approaches. *Front Cell Infect Microbiol*, **4**, 86.
- Rajas, O., L. M. Quiros, M. Ortega, E. Vazquez-Espinosa, J. Merayo-Lloves, F. Vazquez and B. Garcia, 2017: Glycosaminoglycans are involved in bacterial adherence to lung cells. *BMC Infect Dis*, **17**, 319.
- Rikihisa, Y., 2003: Mechanisms to create a safe haven by members of the family *Anaplasmataceae*. *Ann N Y Acad Sci*, **990**, 548-555.
- Rikihisa, Y., 2015: Molecular Pathogenesis of *Ehrlichia chaffeensis* Infection. *Annu Rev Microbiol*, **69**, 283-304.
- Roth, J. A., J. A. Richt and I. Morozov, 2013: *Vaccines and diagnostics for transboundary animal diseases : Ames, Iowa, 17-19 September 2012*; p. x, 226 pages. Karger, Basel ; New York.
- Sahni, A., J. Patel, H. P. Narra, C. L. C. Schroeder, D. H. Walker and S. K. Sahni, 2017: Fibroblast growth factor receptor-1 mediates internalization of pathogenic spotted fever rickettsiae into host endothelium. *PLoS One*, **12**, e0183181.

- Sava, I. G., F. Zhang, I. Toma, C. Theilacker, B. Li, T. F. Baumert, O. Holst, R. J. Linhardt and J. Huebner, 2009: Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells. *J Biol Chem*, **284**, 18194-18201.
- Sheehan, K. B., M. Martin, C. F. Lesser, R. R. Isberg and I. L. Newton, 2016: Identification and Characterization of a Candidate *Wolbachia pipientis* Type IV Effector That Interacts with the Actin Cytoskeleton. *MBio*, **7**.
- Shouldice, S. R., D. R. Dougan, R. J. Skene, L. W. Tari, D. E. McRee, R. H. Yu and A. B. Schryvers, 2003: High resolution structure of an alternate form of the ferric ion binding protein from *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem*, **278**, 11513-11519.
- Stefani, M., 2008: Protein folding and misfolding on surfaces. *Int J Mol Sci*, **9**, 2515-2542.
- Tago, D. and D. F. Meyer, 2016: Economic Game Theory to Model the Attenuation of Virulence of an Obligate Intracellular Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol*, **6**, 86.
- The UniProt, C., 2017: UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, **45**, D158-D169.
- Tom-Yew, S. A., D. T. Cui, E. G. Bekker and M. E. Murphy, 2005: Anion-independent iron coordination by the *Campylobacter jejuni* ferric binding protein. *J Biol Chem*, **280**, 9283-9290.
- Vachiéry and Marcelino, 2017: *Cowdriose, chapitre 2.1.9*; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, vol I & II; 7e.
- Vachiéry, Marcelino, Martinez and Lefrançois, 2013: Opportunities in Diagnostic and vaccine approaches to mitigate potential heartwater spreading and impact on the american mainland. *Vaccines and diagnostics for transboundary animal diseases. Dev Biol*, **135**, 191-200.
- Valguarnera, E., R. L. Kinsella and M. F. Feldman, 2016: Sugar and Spice Make Bacteria Not Nice: Protein Glycosylation and Its Influence in Pathogenesis. *J Mol Biol*, **428**, 3206-3220.
- Walker, A., Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Pena A, Horak IG and e. a. Latif AA, 2003: <Ticks of Domestic Animals in Africa a guide_Walker_2014.pdf>. *Bioscience reports Edinburgh*.
- Yang, J. and Y. Zhang, 2015: I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*, **43**, W174-181.
- Yu, C. S., Y. C. Chen, C. H. Lu and J. K. Hwang, 2006: Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, **64**, 643-651.

Annexes

ANNEXE 1 : Séquence des CDS étudiés

ERGA_CDS_01230 >gi|58616727:209571-210668 *Ehrlichia ruminantium* str. Gardel, complete genome

```
TTGACATTGTATAATTACTTGCCTTTTTTACATTTTTACTATGGTAAAATTATGAAGAAACTACTAG
GTAGTATTATTATTATTGTAGCCGTTATTTTTAGGATTTAATTTTTCTTAATAGGCAAGATAAAGACTT
TAAAGATTCTTTACAAGAAGTACATGTTTATTCTCTCGTAAAGAAGAGCTACTGCAAGATTTATTT
GAAAAATTTACTAAGGAACTGGTATAAAGGTAATAATATTATTGATGAAGCTGCTCAACTAATT
AATAGAATGGAGAATGAGGGGGAAGCTACATCAGCAGATGTGTTTTTAACTGCTGATGCTGTAAT
CTAATTTTTAGCAAAAAAGAAGGGACTTTTACAACCTATACAGTCAGATGTTTTAACTAGAGCAATC
CCGAGTAAATACAGAGACCATGATGGATTTTGGTTTGGGTTGACTAAACGTGCAAGAGTTATAGTT
TATAATAAGAAGTTAGTTGAAGATAAAGAAGTAACTAAGTACATATGAGCATCTTGCAAAATAGGAAATG
GAAAGATAAGATTTTAGTTCGATCTTCTAGTAGTCCATATAATCAGTCATTGATTGCTTTTTATGATA
GCAAATGATGGTATAGAAAATGCGAAAATTTGGATTAGAGGACTTGTGATAATATGGCAAGAAA
GCCTAGTGGAGGAGATACAGATCAAATCTATGCAGTTGCTGCTGGTGAAGGTAGTGTAGCTATAGT
TAATAGTTATTATTTTGGTCCGATTATTGCATCTACTAAAAAGAGAGATCAGGCTATTGTTGAAGAT
ATTGGTATATTTTTTCTAATCAAGAGACTACTGGTACTATGATAAATATTAGTGGTGGTGGCTGTTA
CTAAAAATGCAAAAAATAAACTAAATGCTATAAAATTATTAGAGTTCTTATCTAGTAAAGAGGCC
AGAAGGTTTATGCTCAAGTAAATCAAGAATACCCTGTAGTGCAAGGTGTAGAGCTTTCAGAAGTAT
TAAAGAGTTTGGTCCATTTAAAGAGAGTAATCTACCATTACAAGAATTAGAAAAGCATCTAGCTG
ATTCTGTAAAATTGCTGATGAAGAAGGTTGGAAGTAA
```

ERGA_CDS_05140 >gi|58616727:c827201-825717 *Ehrlichia ruminantium* str. Gardel, complete genome

```
TTGGTAATCTTTATGTGTAAATTTTTCTTTGACTACAGCTTTTGTCTTTGCTCTTTTTGTATAATGTT
GATGCATTTGCAGTTGATAATTTAGCTAAAGCTAATACAAATGATAACAAGATAACAGTTAATACT
AAAAAAAATCATAGTGACATGAAGCGTGTAGTTTTGCGTAAATTAGCAAAGGGTTACCATAGGATT
GAGCTAGGCGGTCAAATATTATCTTATGCTTGGTGTACAGATAATGTTAATCAATCTCAAAGCAT
GGGGTAGGAGTAAGTGGTATTTTAAATGTAAAGTCTGTAAGTGAATAATCCTAATTTAGGAATTTCT
TATGGTGTAGTCTGCAAATAGGAGTGCCAGCTATAAAGGATAAATATTTTATTCCTACTGTAAAA
GCTTATAATAGAGGTGCCAGTTATTTATTGATTCTTCTTATGGAAATATATCAATGGGTTATCAGG
AAGGTGTTGATTCTATAATGAAGATTGATGCTTTTACTATAGGGTCTGGAGATAACAGCATTACGT
GGGTACAGAATTTAAATATCTTGGATAAAGGATAAAAATTTAGTGTACCATGTTTTCCCTGGTTTATA
TACTGAAAGTTTATTTAATGGAAGTGAATCACTTGCATTGCTTAGTATTCAAGGTAGAGGTAAGA
TTTTATTAATAATTTACCGTTTAGGATATCTTATCAGTCCCCTAGTTTTGCTGGGTTAAAAGTTGCTG
TAAGTTATGCTCCTCTAGGATATCCTACCAGCTTGTGTTGAACATGCAGATCGTGATGATTATAAAGT
TGATAAATTAACAATACCTCCACTACTAGGTCCTTTACAGGAAAAAACTGCAGATAAGAAAATAGA
AGAAATAGTTGCTGTATTAGGTGATAAGATAGCATTACAAGATGTTGAAATGGAGGGGTTAGCTGA
TTCAGGTAAGGTAAAGTTTTTAGGGCCGAATTATAAGAATATAATCAATGCAGGATTATCTTATAG
TCATTCTTTTGTAGTATTGATTTTCAAGCTTCTGTTATTGCAGAATATGCTTCTAATGATGTTGAAG
CTTTGAAAAATCCTCATATTCGGGACCTCTTGTACCATTTAATGGCTTATCAGGTATTGCTGTTGG
TACATCTGTTGCTTATGATAGTGAATAGTTGCAGCGTCTTACGGATATCTAGGAAAATCTGGTCAA
CCTATTAATGTTAAGGGGAATGCTTATTATTGGACTCTTGGTGCAAAGTATACTTATGATAATGCAT
CAATAAGTACTTCTTATTTTAGAAGTAATAATTTTGGTAATGAATTTCAAGATTTTGGTATAGGAAT
AGATTGTAATTTATCTGCTAATAGTAAGTATAAAGGGCAATATAAGGTATTTGGTAATTATCATCGT
```

TTTAATGTAAAAAATATTTCAAGTACTAGCAGTGGTCTTATGCTGGTAATGTTCTATTGTTGGGTA
TGAAGTATGAATTTTAA

ANNEXE 2 : Milieux utilisés lors de la production des protéines recombinantes

100mL milieu LB (lysogeny broth medium) : 1g tryptone, 0,5g extrait de levure, 1g NaCl, 1,5g agar bactériologique, 1g glucose. Autoclavage. Ajout 100µL carbénicilline 1000x, 100 µL kanamycine 1000x

Préparation des antibiotiques : 25 mg kanamycine + 1ml H₂O + filtration 0,2µm. Idem pour la carbénicilline avec 50 mg.

100mL Milieu SOC (super optimal broth with catabolite repression medium)

2g Tryptone, 0,5g extrait de levure, 0,2mL NaCl 5M , 0,25mL KCl 1M. Dissoudre dans 90mL H₂O et équilibrer à pH 7 ; ajuster à 100mL et autoclaver.

Ajouter 1mL MgCl₂, 1mL MgSO₄ 1M, 2mL glucose 1M stérilisés à 0,2µm et ajouter à la solution précédente. Conserver à 4°C

10mL BHI (brain heart infusion) ajouter 20µL d'hémine (photosensible, Jena Bioscience), 50µL pénicilline- streptomycine (200x Jena Bioscience), 10µL d'hygromycine (Hygro, Jena Bioscience), et 10µL de nourseothricine (NTC, Jena Bioscience)

ANNEXE 3 : Tampons utilisés pour l'immuno-blotting et le « Far Western blot »

1L TTBS 1x : 12,1g TRIS (10mM), 8,77g NaCl (150mM). Dissoudre dans 900mL d'H₂O, ajuster le pH à 8,3 ; ajouter 500µL de tween 20 et ajuster à 1L

ANNEXE 4 : Séquence des protéines étudiées

Protéine ERGA_CDS_01230

>WP_044156912.1 Fe(3+) ABC transporter substrate-binding protein [Ehrlichia ruminantium]

MKLLGSIIIVAVILGFNFLNRQDKDFKDSLQEVHVYSSRKEELLQDLFEKFTKETGIKVKYIIDEAAQLI
NRMENEGEATSADVFLTADAVNLILAKKKGLLQPIQSDVLTRAIPSKYRDHDGFWFGLTKRAR
VIVYNKNLVEDKELSTYEHLANRKKWKILVRSSSPYNQSLIAFMIANDGIENAKIWIRGLVD
NMARKPSGGDTDQIYAVAAGEGSVAIVNSYFGRIIASTKKRDQAIVEDIGIFFPNQETTGTMIN
ISGGAVTKNAKNKLNAILLLEFLSSKEAQKVYAQVNQVEYPPVQGVELSEVLKSFPGPFKESNLP
LQELEKHLADSVKIADEEGWK

Protéine ERGA_CDS_05140

>gi|499574848|ref|WP_011255631.1| hypothetical protein [Ehrlichia ruminantium]

MVIFMCKFSLTTAFVSLFLYVNDFAVDNLAKANTNDNKITVNTKKNHSDMKRVVLRKLAKGYHRI
ELGGQILSYAWCTDNVNQSQKHGVGVSILNVKSVSENPNLGISYGASLQIGVPAIKDKYFIPT
VKAYNRGAQLFIDSSYGNISMGYQEGVDSIMKIDAFTIGSGDNSITWVQNLNLDKDKNLVYH
VFPGLYTESLFGSESLALLSIQGRGKDFINLPRISYQSPSFAGLKVAVSYAPLGYPTSLFEHA
DRDDYKVDKLTIPPLGPLQEKTAADKKIEEIVAVLGDKIALQDVEMEGLADSGKVKFLGPNYK
NIINAGLSYSHSFDSDIFQASVIAEYASNDVEALKKSSYSGPLVPFNGLSGIAVGTSVAYDSVIVA

ASYGYLGKSGQPINVKGNAYYWTLGAKYTYDNASISTSYFRSNNFGNEFQDFGIGIDCNLSAN
SKYKGYKQVFGNYHRFNVKNISSTSSGSYAGNVLLLGMKYEF

ANNEXE 5 : Milieu de culture des BAEC

600 mL milieu BHK21 : 372mL H₂O PPI, 30 mL NaHCO₃ 5,5%, 120mL BHK21 5x (Eurobio), 60mL SBF (Thermofisher), 6mL L glutamine 100x (Eurobio), 6mL pénic/strepto 100x (Eurobio), 6mL amphotéricine B 100x (Sigma)

ANNEXE 6 : Tampon de lyse du culot cellulaire

En conditions natives : 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, NP-40 1%, anti-proteases 1%

ANNEXE 7 : Tampons de l'ELISA

1L de tampon carbonate bicarbonate : 4,2 g de NaHCO₃ bicarbonate (50 mM), 5,3 g de Na₂CO₃ carbonate (50mM); équilibrer le pH à 9,6

1L de PBS 10 X : 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄, 2H₂O, 2g de KH₂PO₄

ANNEXE 8 : Carte d'identité et propriétés biologiques des ligands potentiels

<u>Identifiant de la protéine</u>	<u>Identification FASTA</u>	<u>Uniprot</u>	<u>Propsearch</u>
A5D7D1	>sp A5D7D1 ACTN4_BOVIN Alpha-actinin-4 OS=Bos taurus GN=ACTN4 PE=2 SV=1	interaction with nuclear receptor; cell junction, cytoplasm, nucleus	Alpha-actinin 4 (Non-muscle alpha-actinin 4) (F-actin cross linking)
F1MYG5	>tr F1MYG5 F1MYG5_BOVIN Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LMNA PE=1 SV=1	lamin filament, nuclear membrane, nucleoplasm (wikipedia : The trimeric proteins intersect to form a cross-like structure that can bind to other cell membrane and extracellular matrix molecules)	Lamin A/ C
A3KMV5	>sp A3KMV5 UBA1_BOVIN Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Bos taurus GN=UBA1 PE=2 SV=1	degradation through ubiquitin proteasome system; cell response to DNA damage stimulus; cytoplasm, mitochondrion, nucleus	Ubiquitin-activating enzyme E1.
Q3SYU2	>sp Q3SYU2 EF2_BOVIN Elongation factor 2 OS=Bos taurus GN=EEF2 PE=2 SV=3	positive regulation of translation, ribosomal translocation; cytoplasm, nucleus	Elongation factor 2
Q76LV2	>sp Q76LV2 HS90A_BOVIN Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus GN=HSP90AA1 PE=1 SV=3	protein folding, chaperone mediated protein complex assembly, regulation of protein ubiquitination; cytosol, nucleus	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)
E1BP91	>tr E1BP91 E1BP91_BOVIN Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=NPEPPS PE=4 SV=2	cytoplasm, plasma membrane, metalloaminopeptidase activity, proteolysis	Puromycin-sensitive aminopeptidase

Interactants de la protéine recombinante 05140 après « pull down » sur du lysat cellulaire, spectrométrie de masse par ionisation sur Orbitrap, tri et analyse des données par Max Quant. Détermination de la carte d'identité, de la fonction de la protéine et de ses propriétés biologiques *via* les bases de données « Uniprot » et « Propsearch »