



UNIVERSITÉ  
DE NAMUR

University of Namur

# Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

[researchportal.unamur.be](http://researchportal.unamur.be)

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation de PdhS, une histidine kinase essentielle localisée au pôle chez *Bruxella abortus* par une approche de délimitation de fragments fonctionnels

Beaufay, François

*Award date:*  
2010

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



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

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Caractérisation de PdhS, une histidine kinase  
essentielle localisée au pôle chez *Brucella abortus* par  
une approche de « délimitation de fragments  
fonctionnels »**

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

François Beaufay

Janvier 2010





**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Caractérisation de PdhS, une histidine kinase  
essentielle localisée au pôle chez *Brucella abortus* par  
une approche de « délimitation de fragments  
fonctionnels »**

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

François Beaufay

Janvier 2010



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

## **Caractérisation de PdhS, une histidine kinase essentielle localisée au pôle chez *Brucella abortus* par une approche de « délimitation de fragments conservés »**

BEAUFAY François

### Résumé :

A l'instar des cellules eucaryotes, la division asymétrique est un processus très répandu parmi les procaryotes. Ces 20 dernières années, une  $\alpha$ -protéobactérie, *Caulobacter crescentus*, a émergé comme modèle d'étude de la division asymétrique et des mécanismes moléculaires de différenciation. En effet, via des réseaux de régulation interconnectés impliquant des protéines de la famille des systèmes de transduction du signal, *C. crescentus* parvient à coupler son processus de différenciation avec son cycle cellulaire. Parmi ces réseaux, un système à deux composants faisant intervenir deux histidines kinases, DivJ et PleC et un régulateur de réponse DivK a été caractérisé. Des homologues des différents acteurs de ce couplage sont présents chez *Brucella abortus*, l' $\alpha$ -protéobactérie étudiée au sein du laboratoire. De plus, un autre homologue de PleC et DivJ, absent chez *C. crescentus* a pu être identifié chez *B. abortus*. Cette histidine kinase essentielle, nommée PdhS, localise au vieux pôle et semble être responsable de l'état de phosphorylation de DivK chez *B. abortus*. Cinq interactants potentiels de PdhS, PicC, PipP, FumC, DivK et lui-même ont été mis en évidence par des tests double hybride en levure. De plus, le fragment<sub>1-613</sub> N-terminal semble suffisant pour permettre la localisation polaire de la protéine.

Au cours de ce mémoire, nous avons découpé PdhS sur base d'alignements de séquence afin de générer une banque de fragments protéiques tronqués de PdhS (nommés de 1 à 5 puis PAS et Kin). Chacun des fragments générés a été fusionné à l'YFP afin de déterminer le fragment minimum permettant la localisation de la protéine chez *B. abortus*. Tous les fragments furent également fusionnés au domaine AD du facteur de transcription Gal4p pour déterminer les fragments les plus courts requis pour l'interaction avec les cinq partenaires connus de PdhS au cours de tests double hybride en levure.

Ainsi, nous avons pu déterminer un rôle pour la plupart des fragments constituant la partie N-terminale de 650 résidus sans domaine fonctionnels prédits de PdhS. Le fragment minimum pour la localisation polaire de PdhS chez *B. abortus* serait le fragment 3, et le fragment<sub>1-3</sub> serait requis pour la localisation au pôle pédonculé chez *C. crescentus*. Le fragment 2-3 semble requis pour l'interaction PdhS-PdhS tandis que le fragment 3 semble nécessaire à l'interaction avec FumC et PicC. Les fragments PAS et 4 seraient impliqués dans l'interaction avec PipP. Le fragment 5 semble induire l'apparition d'altérations morphologiques (AM). L'étude des cellules AM au cours d'expérience de *time-lapse* semble indiquer une possible croissance polaire chez *B. abortus*.

Mémoire de Master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire  
Janvier 2010

**Promoteur** : Prof. X. De Bolle

**Tuteur** : Charles Van der Henst



# Remerciements

Avoir pu réaliser mon mémoire en URBM fut pour moi une expérience inoubliable et des plus enrichissantes. Chaque jour apportait son lot de surprises et j'ai pris plaisir à discuter de science ou autres avec chacun d'entre vous.

Je tiens tout d'abord à remercier les professeurs Xavier De Bolle et Jean-Jaques Letesson pour m'avoir transmis votre goût de la science et pour savoir expliquer les mécanismes les plus complexes avec les mots les plus simples.

Merci à vous monsieur De Bolle d'être si disponible et de vous émerveiller à chaque nouvelle découverte en particulier dans l'étude des cellules aux phénotypes « branchés ».

Merci à toi Charles, mon cher tuteur pour ta patience et ton éternel calme. J'ai appris énormément à tes côtés, en particulier qu'une paillasse en désordre n'est pas la conséquence d'un bon travail scientifique mais que c'est ce désordre qui permet un bon travail. Tu as été bien plus qu'un simple professeur au cours de ce mémoire.

Marie et Gégé, votre soutien et votre encadrement au début de mon mémoire ont été d'un grand secours. Mike, non tu n'es pas gros, ce n'est pas ta faute si tu es tombé dans la marmite de potion magique quand tu étais petit. Merci de dispenser ta bonne humeur à toute heure de la journée ou de la nuit. Merci à Matthieu pour son imagination débordante et à tous les autres membres de l'URBM (Richard, Christian, Monique, les GEMO, Dédé, Aurore...) participant à faire de ce labo un endroit où travailler est un réel plaisir (quelle pub !!!).

Merci à toi ma Julie, depuis plus de trois ans maintenant tu supportes et souris toujours à mes bêtises et mes enfantillages. Ton rire est un des plus beaux cadeaux que tu puisses me faire. Sans toi, je me serais perdu de nombreuses fois.

Merci à tous les membres de ma famille, en particulier mes parents. Merci maman de m'avoir poussé malgré mes nombreuses réticences face aux séances de dictées de calcul, pendant toutes ces années. Merci à toi papa, de ton calme et ton ouverture d'esprit. A vous deux, vous m'avez enseigné à trouver un équilibre en toute chose, en particulier entre le travail et les guindailles, avec bien entendu des petits écarts de temps en temps, d'un côté comme de l'autre.

Merci aux amis, Oli, Nico, Ben, Thib, Tom, Jupiler et Carapils pour toutes ces aventures vécues ensemble. Merci à Picou pour son flair et m'avoir tenu compagnie de nombreuses soirées dans la pénombre du labo... Bien entendu un grand merci à Ben. Depuis le début de nos études nous avons réussi à escalader toutes les difficultés ensemble. Toujours à la bourre, savoir qu'on était dans la même « merde » les vieilles d'examen m'a été d'un grand réconfort.

Pour terminer, je tiens à remercier les cinq membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire. J'espère pouvoir éveiller votre intérêt...

Bonne lecture !





## Liste des abréviations utilisées

Abréviation	Nom complet	Explication complémentaire
AD	Activating domain	Domaine de transactivation de Gal4p
Spect	Spectinomycine	Antibiotique
Amp	Ampicilline	Antibiotique
BD	Binding domain	Domaine de liaison à l'ADN de Gal4p
<i>bla</i>	b-lactamase	Gène de résistance à l'ampicilline
<i>cat</i>	Cm-acétyltransférase	Gène de résistance au chloramphénicol
DIC	Differential interference contrast	Mode d'observation en microscopie photonique
DO	Densité optique	Mesure, entre autre, le nombre de bactéries
GW <sup>TM</sup>	Gateway <sup>TM</sup>	Technique de clonage par recombinaison
Ura	Uracile	Acide aminé
Leu	Leucine	Acide aminé
His	Histidine	Acide aminé
HK	Histidine kinase	Acteur du système à deux composants
<i>kan<sup>R</sup></i>	Néomycine phosphotransférase	Gène de résistance à la kanamycine
Hpt	Histidine phosphotransférase	Acteur du système à deux composants
Kb	Kilopaires de base	10 <sup>3</sup> paires de bases nucléotidiques
LB	Luria Bertani	Milieu de culture riche pour bactéries
ORF	Open reading frame	Phase ouverte de lecture
pb	Paire de base	Deux nucléotides appariés
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique d'amplification de fragments ADN
rpm	Rotation par minutes	Unité de centrifugation
RR	Régulateur de réponse	Acteur du système à deux composants
ts, cs	Thermo-, cryosensible	Létalité d'une souche à température élevée, basse
Fx	Fragment x	Fragment x tronqué de PdhS
Fa-b	Fragment a-b	Fragment allant de la région a à la b incluse
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le jaune
CFP	Cyan fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le cyan
AM	Aberration morphologique	
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazole	Inhibiteur de la synthèse de l'histidine



# Tables des matières

## Avant Propos

Les Bactéries de Pavlov (Mitchell et al., 2009) .....	19
---	----

## Introduction

La division asymétrique : .....	1
---------------------------------	---

<b>Caulobacter crescentus, différenciation et asymétrie</b> .....	5
---	---

- Nomade puis sédentaire .....
- *Caulobacter crescentus* : modèle d'asymétrie .....
- Cycle cellulaire et différenciation, une coopération main dans la main .....

<b>DivJ- PleC- DivK : les pongistes moléculaires</b> .....	7
--	---

DivK (division cell gene K): .....	7
------------------------------------	---

DivJ (Division cell gene J) : .....	7
-------------------------------------	---

PleC (Pleiotropic effects C) : .....	7
--------------------------------------	---

- « Ping-Pong » moléculaire(Matroule et al., 2004) .....
- CtrA et la centralisation des signaux .....

<b>Les alpha-protéobactéries (Batut et al., 2004)</b> .....	15
---	----

- Asymétrie chez les alpha-protéobactéries (Hallez et al., 2004) .....

<b>Brucella abortus</b> : .....	19
---------------------------------	----

- *B. abortus*, entre conservation et innovation évolutives .....
- Ping-Pong moléculaire chez *Brucella abortus*, une partie à trois (Hallez et al., 2007)  
23

<b>PdhS, une HK atypique</b> : .....	25
--------------------------------------	----

- Premier défrichage autour de PdhS : .....
- PdhS et ses collaborateurs: .....

## Résultats et discussion

<b>Partie I : Approche de « délimitation de fragments conservés » : générer une banque de protéines tronquées de PdhS</b> .....	35
---	----

- Délimitation des différents fragments conservés au sein de *pdhS* .....
- Génération d'une banque de fragments de PdhS .....
- Construction des vecteurs nécessaires pour les tests de localisation et d'interactions  
39
- Vérification des constructions d'expression .....

<b>Partie II : Recherche du fragment minimum suffisant pour la localisation (FML) polaire de PdhS</b> .....	43
---	----

- Le fragment 1-5 chez *Brucella abortus*: confirmation et surprise .....
- Localisation des Fragments de PdhS chez *Brucella abortus* .....
- Localisation des Fragments 1-4, 1-3 et 1 fusionnés à l'YFP chez *Brucella abortus* ...
- Localisation des fragments 2-5, 3-5, 4-5 et 5 fusionnés à l'YFP chez *Brucella abortus*  
.....
- Autres localisations .....



Variation de l'intensité de fluorescence : .....	49
Stabilité des fusions protéiques .....	51
▪ Localisation chez <i>Caulobacter crescentus</i> .....	53

**Partie III : Impact des fragments de PdhS sur la morphologie et le cycle cellulaire de *Brucella abortus*. .... 57**

▪ Morphologies aberrantes dans une souche <i>Brucella abortus</i> 544 <i>pMR10_cat_fragment<sub>1-5</sub>-yfp</i> .....	57
▪ Cycle d'apparition des cellules AM .....	61
▪ Fragment minimum d'altération morphologique (FMAM) : .....	62
▪ Stimulation de croissance et croissance polaire .....	63

**Partie IV : Test d'interaction par un double hybride en levure. .... 65**

▪ Principe du test d'interaction double hybride en levure.....	65
▪ Mise en évidence des fragments minimum d'interaction (FMI) avec les 5 partenaires connus de PdhS .....	65

**Discussion**

▪ Fragment minimum de localisation chez <i>Brucella abortus</i> et chez <i>Caulobacter crescentus</i> .....	71
▪ Aberration morphologique et division cellulaire .....	75
▪ Fragment minimal d'interaction (FMI) avec les partenaires de PdhS .....	79

**Conclusion générale et perspectives**

**Matériels et méthodes**

**Souches et plasmides ..... 95**

▪ Souches.....	95
<i>Escherichia coli</i> DH10B .....	95
<i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda$ pir.....	95
<i>Escherichia coli</i> DB3.1 .....	95
<i>Brucella abortus</i> 544.....	95
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15N (Evinger and Agabian, 1977) .....	95
La souche utilisée pour ce travail est <i>C. crescentus</i> CB15N.....	95
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	95
▪ Plasmides.....	97
pDonR223 .....	97
pVV212 .....	97
pVV213 .....	97
pMR10_cat_GW_yfp ( <i>pRH005</i> ).....	97

**Milieu de culture, Tampons et solutions : ..... 99**

▪ Milieux riches pour <i>E. coli</i> : milieu Luria Bertani (LB) .....	99
▪ Milieux riches pour <i>B. abortus</i> : milieu 2YT .....	99
▪ Milieu Riche pour <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : milieu YPD .....	99
▪ Milieu minimum pour <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : milieu SC .....	99
▪ Milieu pour <i>Caulobacter crescentus</i> : milieu PYE .....	101
▪ Tampons et solutions.....	101
Fabrication du gel d'agarose .....	101



Tampon PBS 20x .....	101
Tampon TE.....	101
Solution d'acetate de lithium (LiAc) 10x.....	101
Poly éthylène glycol (PEG) 40% .....	101
Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M.....	101
Antibiotiques .....	101
Valap .....	103
<b>Techniques relatives à l'utilisation d'ADN .....</b>	<b>103</b>
▪ PCR (Polymerase Chain reaction).....	103
Mix .....	103
Programme .....	103
▪ Électrophorèse en gel d'agarose.....	105
Fabrication du gel.....	105
▪ Purification sur colonne .....	105
▪ Extraction d'ADN plasmidique : mini/midipréparation de plasmide .....	105
▪ Clonage Gateway® .....	107
<b>Techniques relatives à l'utilisation de bactéries .....</b>	<b>109</b>
▪ Transformation bactérienne : choc thermique.....	109
▪ Conjugaison bactérienne ( <i>B. abortus</i> , <i>C. crescentus</i> ) .....	111
<b>Techniques relatives aux protéines.....</b>	<b>113</b>
▪ Analyse par western blot .....	113
Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	113
Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	113
Immunodétection.....	113
Révélation.....	115
<b>Techniques relatives à l'utilisation des levures.....</b>	<b>115</b>
▪ Principe du double Hybride.....	115
▪ Transformation levure .....	117
<b>Techniques relative à la microscopie .....</b>	<b>119</b>
▪ Appareillage .....	119
▪ Préparation d'échantillons pour la microscopie .....	119
Agarose pad :.....	119
Lorsque les agarose pads sont prêts : .....	119
Agarose pad pour time-lapse pour <i>B. abortus</i> .....	119
▪ Molécules fluorescentes .....	119



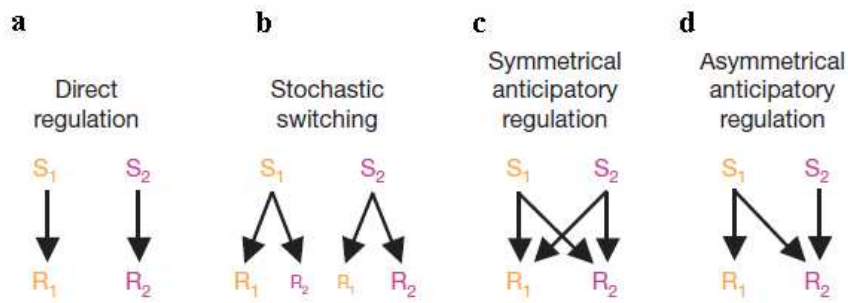


« On ne peut pas tout savoir ! Ni arpenter les chemins de la vie sans marcher de temps en temps sur une bouse. L'essentiel, quand ça arrive, est de ne pas glisser et s'étaler tête la première dans le caca. »

Terry Goodkind : extrait du livre  
*La pierre des larmes* (L'épée de vérité, Tome II).

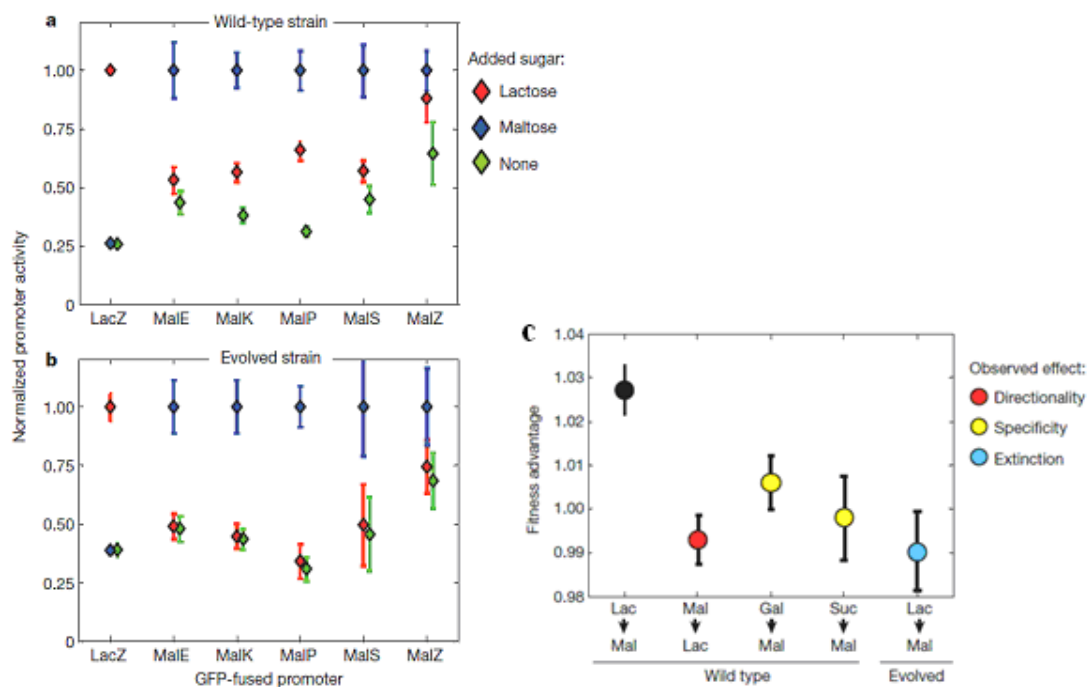
« Qui vit sans folie n'est pas si sage qu'on croit »

François de La Rochefoucauld



**Figure 1** : stratégies d'adaptation face aux fluctuations du milieu

(a) Chaque stimulus ( $S_1$  ou  $S_2$ ) sont associés à leur réponse spécifique ( $R_1$  et  $R_2$ ). (b) Dans le switch stochastique, les stimuli sont associés à plusieurs réponses mais avec une préférence pour une réponse ( $R_1$  pour  $S_1$  et  $R_2$  pour  $S_2$ ). (c) Chacun des deux stimuli active les deux réponses de façon équivalente. (d) le stimulus apparaissant en premier stimule les deux réponses, le second induisant une uniquement sa réponse associée (Mitchell et al 2009).



**Figure 2** : Réponse conditionnée chez *E. coli* et fitness en fonction des réponses

Activité des promoteurs fusionnés à la GFP (a) dans une souche WT, (b) dans une souche élevée pendant 500 générations sur milieu lactose, sans exposition au maltose. Une pré-exposition au lactose induit une légère induction des gènes du métabolisme du maltose (a). Ceci n'est plus observé dans la souche évoluée (b), spécialisée dans l'utilisation du lactose (c) Fitness et spécificité de l'apprentissage lactose(Lac)-maltose (Mal). Un avantage de fitness est observé dans la souche WT lors d'une pré-exposition au lactose (Mitchell et al, 2009). Cet apprentissage est spécifique du lactose car il n'est pas observé avec du galactose (Gal) ou du saccharose (Sac). De plus, une souche évoluée spécialisée dans l'incorporation du Lac sans exposition au Mal perd ce fitness du à l'apprentissage.

# Avant Propos

## *Les Bactéries de Pavlov* (Mitchell et al., 2009)

Les microorganismes, sont en constante interaction avec leur environnement. La perception et l'adaptation aux variations notamment en nutriments, pH, température de cet environnement est un processus clé pour la survie de ces microorganismes. Au cours de l'évolution, différentes stratégies d'adaptation ont été retenues afin de faire face à ces fluctuations. La plus simple consiste à associer à chaque signal une réponse spécifique (**Figure 1a**). Je perçois, puis je réagi via un mécanisme approprié. Une autre stratégie, observée chez la levure, est basée sur un switch stochastique. Au lieu de percevoir correctement les fluctuations du milieu, ces microorganismes génèrent une variation phénotype au sein de la population. Cette diversité de réponses disponible permet à une partie de la population d'être adaptée au stress aléatoire à venir (**Figure 1b**) (Kussell et al., 2005). Néanmoins, l'habitat naturel de certains microorganismes a tendance à varier de façon plus prédictible, comme c'est le cas dans le parcours d'*Escherichia coli* à travers le tractus digestif où les fluctuations suivent une chronologie bien précises. Serait-il possible que des microorganismes ayant évolué dans ce type de milieux puisse en percevant un signal, anticiper la variation suivante ? En d'autres termes, existent-ils un mécanisme d'apprentissages au sein des microorganismes ?

Ce phénomène d'apprentissage a été longuement étudié chez les mammifères sous le nom de conditionnement classique Pavlovien. Pavlov est un médecin et physiologiste russe connu pour ses travaux, au début du XXème, sur l'acquisition et la perte des reflexes conditionnels chez le chien. L'expérience la plus connue de Pavlov consistait à présenter de la nourriture à un chien ce qui provoquait la salivation de l'animal. Ensuite, Pavlov commença à faire sonner une cloche à chaque fois qu'il se préparait à servir un repas. Après peu de temps, le chien salivait dès qu'il entendait la cloche, même en absence de nourriture. L'animal a réussi à associer l'arrivée de nourriture au son de la cloche.

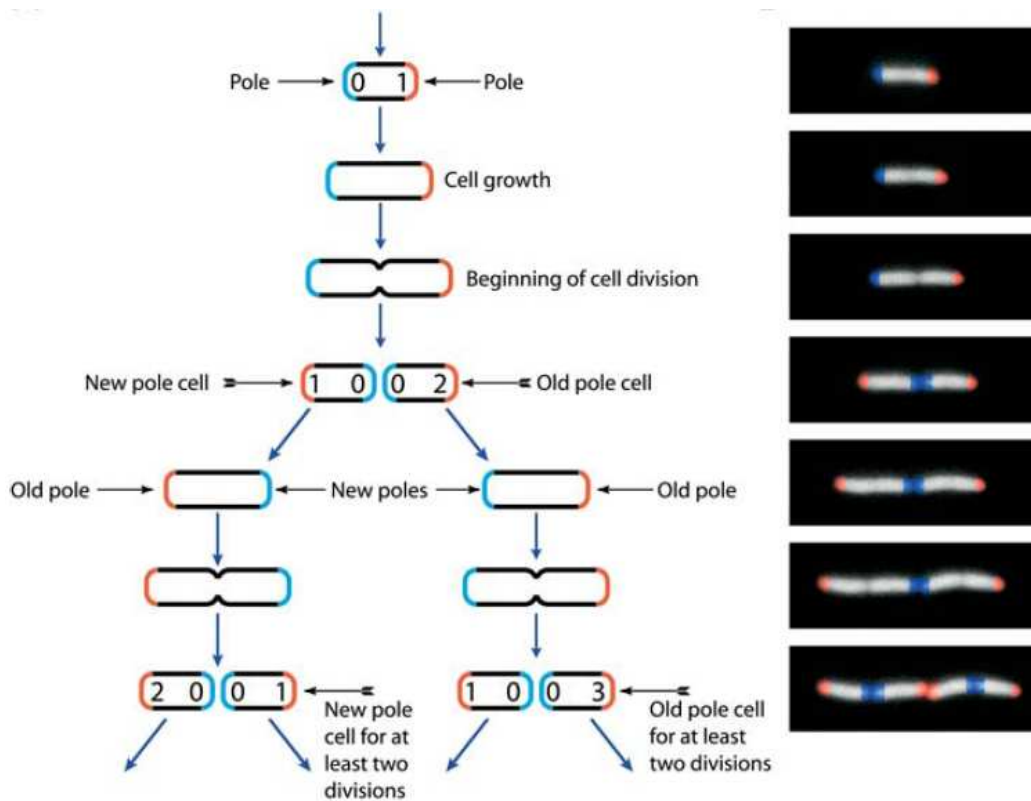
L'entrée d'*E. coli* dans le tractus digestif est caractérisée par une augmentation de la température suivi d'une rapide chute du taux d'O<sub>2</sub>. En étudiant la réponse à ces deux signaux, un mécanisme d'anticipation a pu être mis en évidence chez cette bactérie (figure 1c). Chacun des deux signaux va individuellement induire les réponses nécessaires aux deux variations environnementales. Une fois la hausse de température perçue, *E. coli* peut anticiper la diminution en O<sub>2</sub>. Néanmoins, l'inverse est également valable illustrant que la bactérie n'a pas saisi la chronicité des événements.

Un autre environnement prédictible perçu par *E. coli* dans le tractus digestif est l'exposition au lactose (S1) avant une exposition au maltose (S2). En testant l'activité des promoteurs des opérons nécessaires au métabolisme du lactose et du maltose, un mécanisme d'anticipation a pu être mis en évidence (**Figure 2**). Une pré-exposition au lactose induit l'expression des gènes nécessaires au métabolisme du maltose. De plus, l'inverse, une pré-exposition au maltose n'induit pas l'expression des gènes Lac, montrant que la bactérie a saisi la chronologie des événements. Cette pré-exposition augmente le fitness de la bactérie et est spécifique à ces deux sucres (**figure 2**). Il s'agit bien d'un mécanisme d'apprentissage puisque des souches élevées sur un milieu sans cette fluctuation lactose-maltose (evolved strain) ne présentent pas cette stimulation.

Un mécanisme d'apprentissage semblable à celui décrit chez les mammifères par Pavlov a été identifié chez *E. coli*, illustrant l'énorme potentiel d'adaptabilité dont font preuve les microorganismes. Il serait maintenant intéressant de voir dans quelle mesure ces mécanismes d'apprentissage sont répandus parmi les microorganismes ainsi que leur fréquence d'apparition.



# **Introduction**



**Figure 3 :** Formation et vieillissement des pôles au cours des cycles cellulaires d'*Escherichia coli*.

Formation des pôles pendant la division d'*E. coli*. Chaque cellule hérite d'un pôle néoformé et d'un pôle plus âgé. Les chiffres correspondent à l'âge des pôles en terme de nombre de division. Les nouveaux pôles sont en bleu, les vieux pôles sont en rouge (Stewart et al, 2005)

# Introduction

## ***La division asymétrique :***

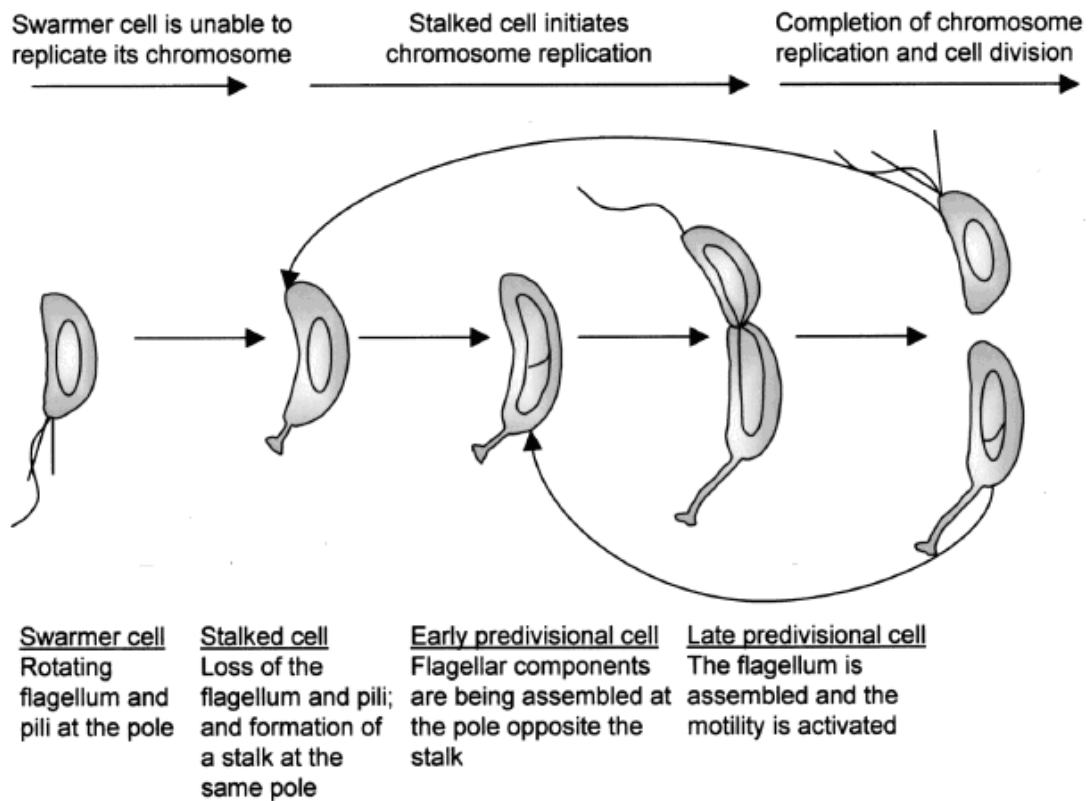
La division asymétrique génère des cellules de nature différente à partir d'un même bagage génétique et, est donc fondamentale dans la diversification cellulaire. L'acquisition de caractéristiques morphologiques et/ou fonctionnelles différentes résulte de la polarité cellulaire, c'est-à-dire d'une répartition inégale de constituants cellulaires au cours du processus de division.

Chez les métazoaires (multicellulaires eucaryotes mobiles et hétérotrophes), l'importance de la division asymétrique a été mise en exergue dans l'étude du développement du ver *C. elegans*. Chez ce nématode utilisé comme organisme modèle, le devenir de toutes les cellules de l'embryon, du zygote à la formation d'un organisme complet, est connu. Après fécondation, l'œuf subit cinq divisions asymétriques permettant de générer les différentes lignées cellulaires. Ces divisions sont également indispensables dans le positionnement des trois plans principaux du corps, l'axe antéro-postérieur, l'axe dorso-ventral et l'axe gauche-droite (Gonczy and Rose, 2005).

Le rôle de la division asymétrique ne se résume pas au développement. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH), par exemple, ont pour rôle de maintenir la population de certaines cellules hautement différenciées comme les globules rouges, les macrophages ou les mégacaryotes produisant les plaquettes (Eckfeldt et al., 2005). Pour maintenir une population suffisante de ces cellules et de cellules souches, ces dernières ont la possibilité de se diviser asymétriquement, produisant une cellule identique à la cellule souche mère et une cellule qui initiera le programme de différenciation (Mantel et al., 2008; Yamashita and Fuller, 2008). Des facteurs extrinsèques tel le contact de la cellule souche avec ses cellules voisines et avec le tissu formant sa niche, déterminent le devenir des cellules au cours du processus de division. Pour la lignée hématopoïétique, il s'agit des cellules endostéales de la moelle osseuse. La perte de ce contact induit le processus de différenciation. Des facteurs intrinsèques à la cellule comme une répartition asymétrique de différents constituants cellulaires dans les deux cellules filles influencent également le processus de division. Le récepteur de surface Notch, par exemple, est impliqué dans l'intégration de ces facteurs extrinsèques et intrinsèques (Mantel et al., 2008; Tien et al., 2009). Ancré en membrane, Notch et des récepteurs apparentés se lient à leurs ligands, présent à la surface des cellules de la niche. Ce phénomène résulte en la ségrégation de ces récepteurs à un endroit précis de la cellule en division. L'orientation du fuseau mitotique par rapport à ces récepteurs va déterminer quelle cellule hérite de quels déterminants cellulaires, définissant ainsi le devenir des cellules filles.

Chez les procaryotes, la division asymétrique a été particulièrement étudiée dans des processus présentant une asymétrie morphologique évidente comme la sporulation chez *Bacillus subtilis* ou la différenciation de *Caulobacter crescentus* (Errington, 1996; Newton and Ohta, 1990). La sporulation permet à *B. subtilis* de générer une cellule dormante capable de résister à différents stress environnementaux comme la dessiccation ou des températures élevées. La formation d'une spore débute par une division asymétrique générant une grande cellule, le sporangium, et une petite cellule, la préspore. Par un mécanisme comparable à la phagocytose eucaryotique, la préspore va être internalisée par le sporangium. Dans la grande





**Figure 4 :** Schéma du cycle cellulaire et des différentes étapes clés du processus de différenciation chez *Caulobacter crescentus*.

La cellule flagellée doit se différencier en cellule pédonculée pour pouvoir initier un nouveau cycle. La cellule pédonculée reste fixée par son *holdfast* et peut directement entrer dans un nouveau cycle répliatif. La cellule flagellée est mobile et sa chémotaxie est compétente, ce qui n'est pas le cas de la cellule pédonculée, elle peut donc nager à la recherche de nutriments (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003).

cellule, la préspore va subir un mécanisme de maturation la rendant extrêmement résistante. Le sporangium finit par mourir libérant la spore qui peut subsister ainsi quasi indéfiniment et reformer, une fois l'environnement redevenu favorable, une cellule fonctionnelle (Errington, 1996).

La division asymétrique a également pu être mise en évidence chez des organismes connus pour présenter une symétrie morphologique évidente (Stewart and Taddei, 2005). Chez *Escherichia coli* par exemple, une asymétrie fonctionnelle est impliquée dans le mécanisme de sénescence de la bactérie. A chaque division de la bactérie, un nouveau pôle est généré en face d'un pôle préexistant (**Figure 3**). Le pôle néoformé est défini comme un jeune pôle par opposition au vieux pôle, c'est-à-dire le pôle préexistant. On peut dès lors définir l'âge des pôles en termes de nombres de division. Chez *E. coli*, malgré une répartition apparemment uniforme de l'ADN et des lipides membranaires à chaque division, les cellules héritant du vieux pôle croissent plus lentement, produisent moins de descendants et présentent un taux de mortalité plus élevé (Stewart and Taddei, 2005). Plus un pôle est vieux, plus ce phénomène s'accroît tandis que les cellules acquérant des jeunes pôles présentent un fitness plus élevé par rapport aux lignées parentales.

Ce phénomène de sénescence peut s'expliquer par une répartition asymétrique de certains constituants cellulaires au moment de la division. Un pôle servirait dès lors de poubelle permettant l'accumulation de matériels délétères pour la cellule tels que des composés toxiques ou des protéines mal repliées. Plus un pôle est vieux, plus cette accumulation est importante et affecte ainsi le fitness de la bactérie (Stewart and Taddei, 2005) (**Figure 3**).

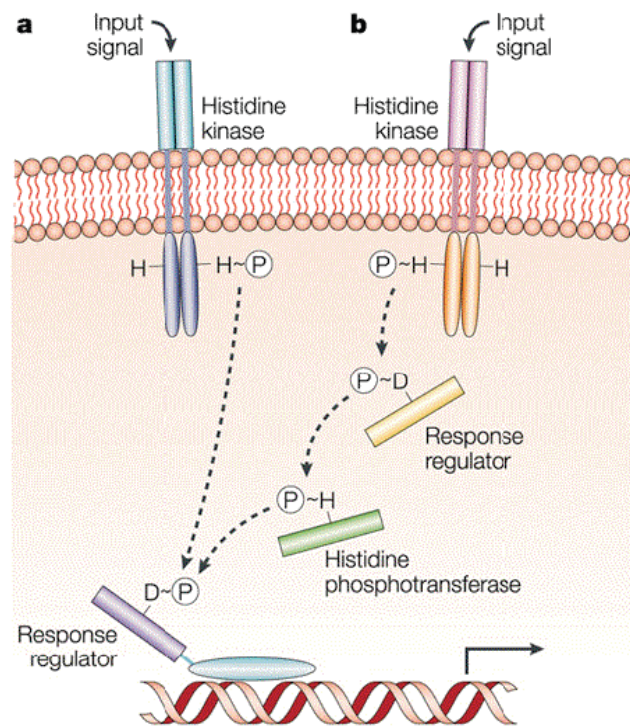
Ainsi, cette division asymétrique de constituants cellulaires provenant de la création d'un « pôle poubelle » permettrait le renouvellement d'une descendance jeune aux dépens d'une partie de la population bactérienne afin d'éviter un vieillissement global.

**Box 1** : Les systèmes à deux composants :

Les systèmes à deux composants (TCS) sont un des mécanismes les plus répandus chez les bactéries permettant de percevoir et de répondre aux variations de l'environnement, au sens le plus large. Ils sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes comme la chimotaxie, la sporulation chez *Bacillus subtilis* ou encore la différenciation chez *C. crescentus* (Stock et al, 2000).

A de rares exceptions, comme les *Mycoplasma* spp., des systèmes TCS, souvent organisés en opéron, sont retrouvés dans tous les génomes bactériens, certains pouvant en compter jusqu'à 80 (*Synechocystis* sp.) (Mascher et al 2006 ; Stock et al, 2000). A contrario, ce type de mécanisme est beaucoup plus rare, sans toutefois être inexistant, chez les eucaryotes. Le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne possède qu'un unique système de phospho-relais impliqué dans l'osmorégulation.

L'architecture principale d'un TCS se compose d'une histidine kinase (HK) et d'un régulateur de réponse (RR). Quand un signal est perçu par le domaine senseur de l'HK, il induit l'autophosphorylation d'un résidu histidine du domaine de transduction du signal (**voir figure a**). Le RR catalyse ensuite le transfert du groupement phosphate du résidu histidine phosphorylé de l'HK à un de ses propres résidus aspartate. Ce transfert va permettre de générer une réponse spécifique au stimulus perçu via, par exemple, une variation de l'expression génique (Skerker and Laub, 2004). Des mécanismes de phosphorelais sont également très courants au sein des TCS. Dans ce cas, une histidine phosphotransférase sert d'intermédiaire entre deux RR (**voir figure b**) (Skerker and Laub, 2004).



Nature Reviews | Microbiology

## ***Caulobacter crescentus*, différenciation et asymétrie**

### ▪ **Nomade puis sédentaire**

*Caulobacter crescentus* est une alpha-protéobactérie Gram négative non pathogène colonisant les milieux aquatiques d'eau douce (lacs et rivières). Elle joue un rôle important dans le cycle du carbone en métabolisant des substrats carbonés. Face à une carence en nutriments, *C. crescentus* a adopté une stratégie différente du processus de sporulation étudié chez *Bacillus subtilis*, (Errington, 1996; Poindexter, 1981). A chaque cycle cellulaire, *C. crescentus* donne naissance, par division asymétrique, à deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement distinctes (Brun et al, 2000) (**Figure 4**). Chaque division produit donc deux sous-populations, des cellules pédonculées et des cellules nageuses flagellées (Jenal and Stephens, 2002; Poindexter, 1981). Les cellules possédant un pédoncule, permettant l'ancrage de la bactérie, restent sur place et peuvent directement initier la réplication de leur chromosome. Les cellules nageuses, via leur flagelle, quant-à-elles, peuvent remonter un gradient de nutriments et ainsi, aller coloniser une nouvelle niche écologique (Newton and Ohta, 1990). Une fois cette niche atteinte, la cellule flagellée doit d'abord se différencier en cellule pédonculée pour pouvoir entrer dans un nouveau cycle cellulaire (Quon et al., 1996; Wortinger et al., 1998).

### ▪ ***Caulobacter crescentus* : modèle d'asymétrie**

En raison de son asymétrie morphologique et fonctionnelle évidente, *C. crescentus* constitue un organisme modèle dans l'étude de processus comme la différenciation, le cycle cellulaire et la division asymétrique. De plus, le temps de génération relativement court (1h30 dans des conditions optimales), la possibilité d'obtenir des populations synchronisées pour leur cycle cellulaire, le séquençage complet de son génome et sa non-pathogénicité font de *Caulobacter crescentus* un outil biologique pratique dans l'étude de ces différents mécanismes.

### ▪ **Cycle cellulaire et différenciation, une coopération main dans la main**

La coordination du cycle cellulaire avec le processus de différenciation a donc permis à *C. crescentus* de développer une stratégie bien particulière face aux environnements oligotrophes. De plus, ce couplage entre division asymétrique et différenciation indique une parfaite régulation et synchronisation de ces deux processus. Parmi les différents mécanismes de régulation du cycle cellulaire et/ou de la différenciation chez *C. crescentus*, un système à deux composants (**Box 1**) a été identifié comme participant à la coordination de ces deux événements chez la bactérie aquatique (Quon et al., 1996).

**Box 2 : Les histidines kinases (HK)**

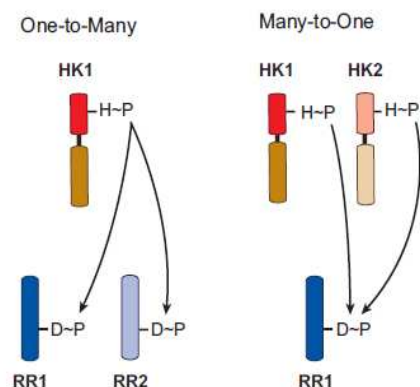
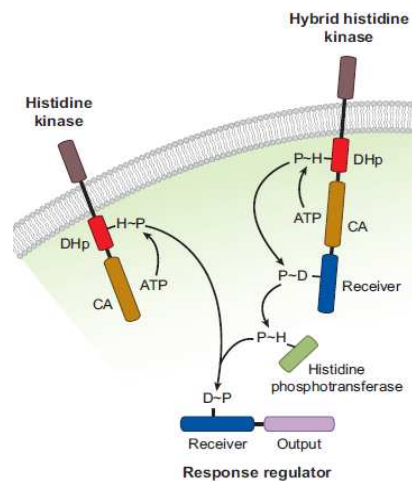
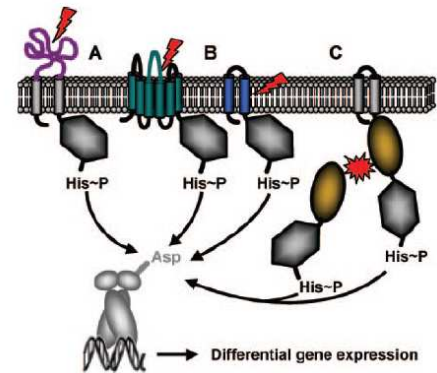
Les HK sont des protéines constituées d'une région N-terminale, le domaine senseur, réagissant à un ou des stimuli bien particuliers et d'une région C-terminal de transduction du signal, contenant le domaine histidine kinase. Le terme « domaine HK » regroupe le domaine de liaison à l'ATP, l'activité HK et le petit domaine contenant le résidu histidine phosphorylable (Goa and Stock, 2009).

Les HK sont classées en trois groupes en fonction de leur structure (Mascher et al, 2006). Les HK extracellulaires, ou périplasmiques, est le groupe le plus répandu (A). Ces HK possèdent un domaine senseur périplasmique, deux segments transmembranaires et un domaine de transduction du signal. Elles servent typiquement à détecter des nutriments et autres solutés dans l'environnement extracytoplasmique. Le second groupe contient des HK où les segments transmembranaires sont directement impliqués dans la perception du signal (B). Ces segments, dont le nombre varie de 2 à 20, sont impliqués dans la perception de stimuli associés à la membrane tels que les stress mécaniques, les variations de gradients électrochimiques ou encore la perception de substances affectant l'intégrité de la membrane.

Le dernier groupe, le moins fréquent, est celui des HK cytoplasmiques (C) (Mascher et al, 2006). Ne disposant pas d'hélice transmembranaire, leur domaine senseur est cytoplasmique servant généralement à détecter des signaux cytoplasmiques impliqués dans le métabolisme, le développement ou le cycle cellulaire.

Ce classement fournit une architecture générale des HK à laquelle peuvent venir se greffer des domaines senseurs additionnels, comme des domaines PAS ou comme pour les HK hybrides, des domaines de phosphorylation supplémentaires (Laub and Goulian, 2007 ; Stock et al, 2000) (**Figure ci-contre**). Les HK hybrides possèdent un domaine RR à côté du domaine HK classique. Il y a donc transfert intramoléculaire du groupement phosphate de l'histidine à l'aspartate. De plus, les HK (et les RR) font souvent partie de familles de gènes paralogues qui partagent une similarité dans leur structure et leur séquence, surtout au niveau du domaine C-terminal permettant la mise en place de régulations croisées ou de voies du type « one-to-many » ou « many-to-one » (**Figure ci-contre**).

L'augmentation de domaines et d'intermédiaires au niveau du domaine senseur ou du domaine de transduction du signal permet une amplification ainsi qu'une meilleure intégration réponse plus spécifique au signal perçu (Laub and Goulian, 2007).



## ***DivJ- PleC- DivK : les pongistes moléculaires.***

Chez *Caulobacter crescentus*, un système à deux composants participe à la synchronisation du cycle cellulaire et du processus de différenciation. Il implique deux HK (**Box 2**), DivJ et PleC et un RR, DivK (Quon et al., 1996).

### **DivK (division cell gene K):**

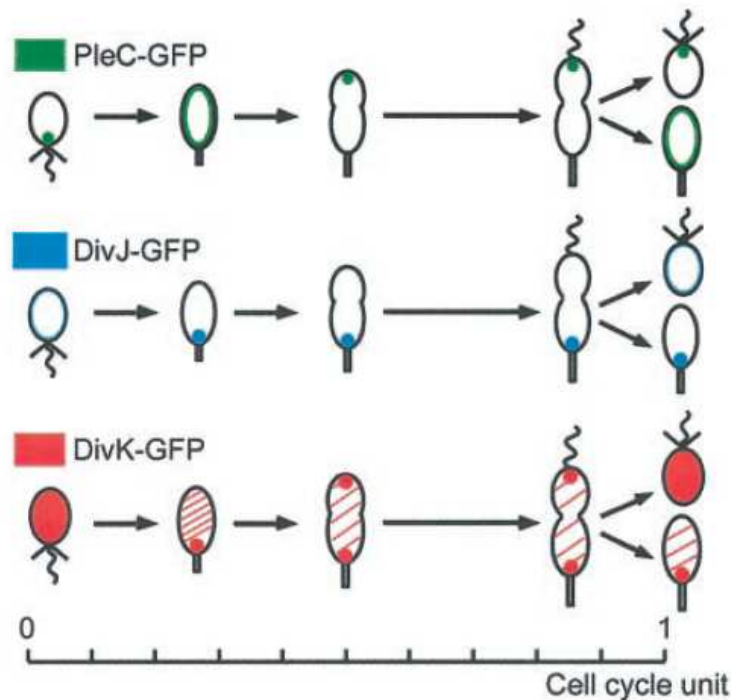
DivK est un régulateur de réponse soluble de 125 résidus. La délétion de *divK* au locus nécessitant la présence d'une copie de sauvegarde du gène, *divK* est essentielle chez *C. crescentus* (Hecht et al., 1995). Contrairement à la structure classique des RR qui possèdent un domaine receveur avec l'aspartate phosphorylable et un domaine de transduction du signal, DivK dispose d'un unique domaine receveur contenant l'aspartate phosphorylable en position 53 (Asp<sub>53</sub>) (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003) (**Figure 5**). Le caractère soluble de DivK lui permet de diffuser librement dans la cellule. Néanmoins, sa distribution spatiale au sein de la cellule est dépendante de son état de phosphorylation et ainsi, influencée par deux HK, DivJ et PleC (Hung and Shapiro, 2002; Lam et al., 2003). Des expériences de FRET ont également montré, *in vivo*, une interaction directe entre DivJ et DivK et entre PleC et DivK (Matroule et al., 2004).

### **DivJ (Division cell gene J) :**

DivJ est une HK de 597 résidus possédant 5 segments transmembranaires prédits délimitant un domaine N-terminal et un domaine C-terminal contenant le domaine HK avec le résidu histidine phosphorylable (His<sub>338</sub>) (Ohta et al., 1992; Ohta and Newton, 2003). DivJ localise au pôle pédonculé de la cellule et, comme la plupart des HK, elle n'est pas essentielle chez *C. crescentus* (**Figure 5 et 6**). Cette HK, présentant cinq segments transmembranaires répartis le long de sa séquence N-terminale et ne disposant donc pas de domaine périplasmique, est classée dans le groupe des HK où les segments transmembranaires jouent le rôle de domaine senseur. DivJ est requis dans le contrôle du positionnement et dans la biogenèse du pédoncule ainsi que dans l'initiation de la division cellulaire (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003)

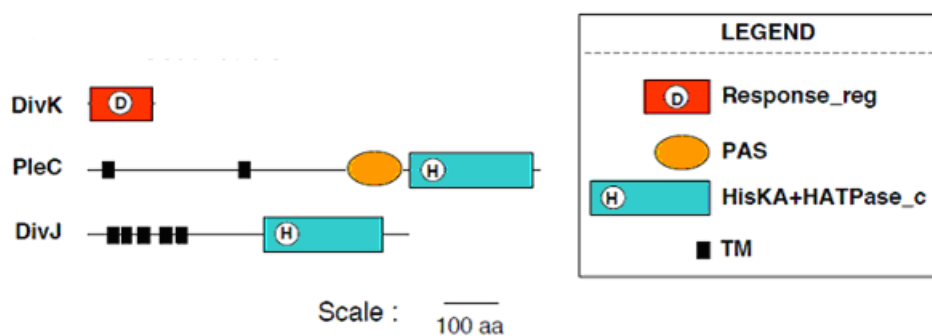
### **PleC (Pleiotropic effects C) :**

PleC est une HK de 842 acides aminés insérée en membrane interne via quatre segments transmembranaires au niveau du pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle (Wang et al., 1993) (**Figure 5 et 6**). PleC est une HK appartenant au groupe des HK périplasmiques avec son domaine senseur extracellulaire et son domaine de transduction du signal cytoplasmique contenant le résidu histidine phosphorylable (His<sub>610</sub>). Elle intervient dans le contrôle de la différenciation de la cellule nageuse en cellule pédonculée. PleC est indispensable pour activer la motilité du flagelle et la chémotaxie après la séparation des deux cellules filles (Jacobs-Wagner, 2004).



**Figure 5 :** Localisation de PleC, DivJ et DivK au cours du cycle cellulaire chez *C. crescentus*.

PleC-GFP est représenté en vert, DivJ-GFP en Bleu et DivK-GFP en rouge. Ces observations proviennent d'expériences en time-lapse à partir de souches synchronisées avec le même temps de génération (Jacobs et al, 2001)



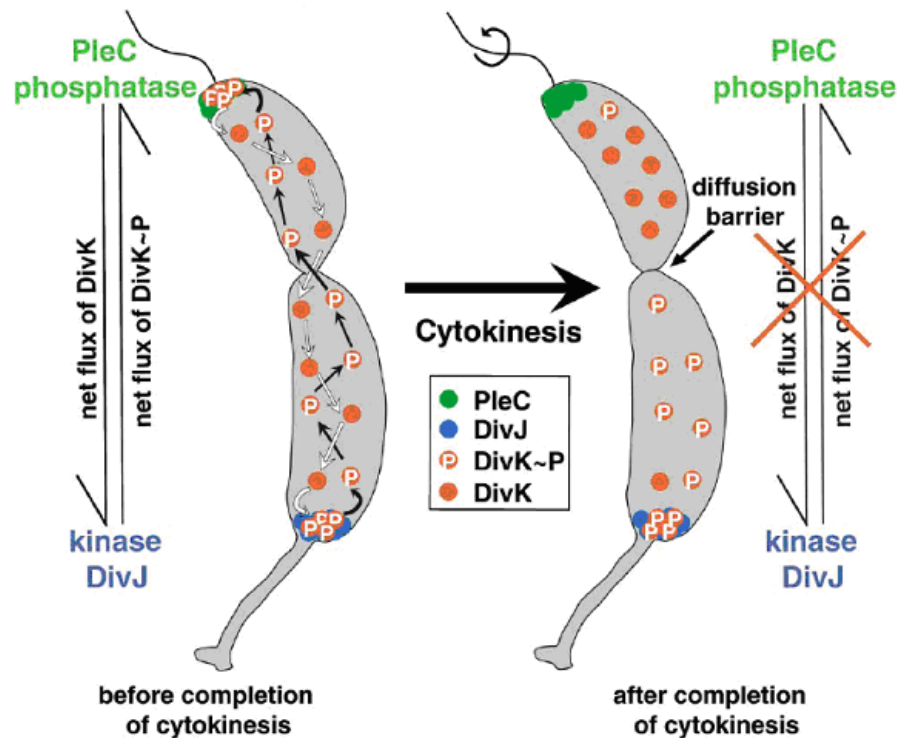
**Figure 6 :** Représentation des domaines de PleC, DivJ et DivK chez *C. crescentus*.

En rouge, le domaine régulateur de réponse (Response\_reg), en jaune, les domaines PAS et en noir les segments transmembranaires prédits (TM). Le domaine HK (HisKA+HATPase\_c) est représenté en bleu. DivK ne comprend qu'un unique domaine accepteur et DivJ ne disposerait pas de domaine PAS (Hallez et al, 2007).

DivJ intervient dans la localisation de DivK au sein de la cellule en le recrutant au pôle pédonculé où DivJ agit comme une kinase du RR DivK. Au contraire, dans la cellule prédivisionnelle, PleC agit en tant que phosphatase de DivK induisant le relargage du RR du pôle flagellé (Matroule et al., 2004). La distribution spatiale de DivK est donc dépendante de son état de phosphorylation, lui-même sous le contrôle des deux HK (**Figure 5**). De cette manière, DivK sert de signal de cytokinèse. En effet, une fois les deux cellules filles séparées, on observe une distribution hétérogène de DivK entre celles-ci. Ainsi, dans la cellule flagellée, DivK est distribué de façon homogène dans le cytoplasme tandis qu'il présente une localisation au pôle pédonculé de la cellule sédentaire (Jenal and Stephens, 2002).

Un mutant  $\Delta divJ$  possède un phénotype filamenteux, des pédoncules allongés souvent mal placés et une délocalisation de DivK (Jacobs et al., 2001; Ohta et al., 1992). Les mutants  $\Delta pleC$  se divisent normalement mais présentent des problèmes dans toutes les étapes de différenciation de la cellule flagellée après cytokinèse (Sommer and Newton, 1989). Notamment une incapacité à former les pili polaires, à perdre ensuite ce flagelle et ces pili. De plus, la cellule ne peut pas former un nouveau pédoncule au pôle et, dans les cellules prédivisionnelles, un flagelle non motile est assemblé. Dans les mutants  $\Delta pleC$ , DivK se localise aux deux pôles de la cellule (Jacobs et al., 2001).





**Figure 7 :** Représentation du « ping-pong » moléculaire régulant le cycle cellulaire chez *C. crescentus*.

Dans la cellule prédivisionnelle, l'activité phosphatase de PleC au pôle flagellé et l'activité kinase de DivJ au pôle pédonculé sur DivK induit une localisation dynamique du RR. DivK va ainsi osciller d'un pôle à l'autre en fonction de son état de phosphorylation. Tant qu'un pont cytoplasmique est maintenu entre les deux cellules filles un pool de DivK~P est maintenu au pôle flagellé empêchant la différenciation précoce. Une fois la cytokinèse terminée, l'échange moléculaire de DivK et DivK~P entre les pôles DivJ et PleC est interrompu. Cette ségrégation des activités kinase et phosphatase induit un relargage complet de DivK du pôle flagellé conduisant à la mise en route du programme de différenciation dans cette cellule (Matroule et al (2004).

---

- « **Ping-Pong** » moléculaire (Matroule et al., 2004)

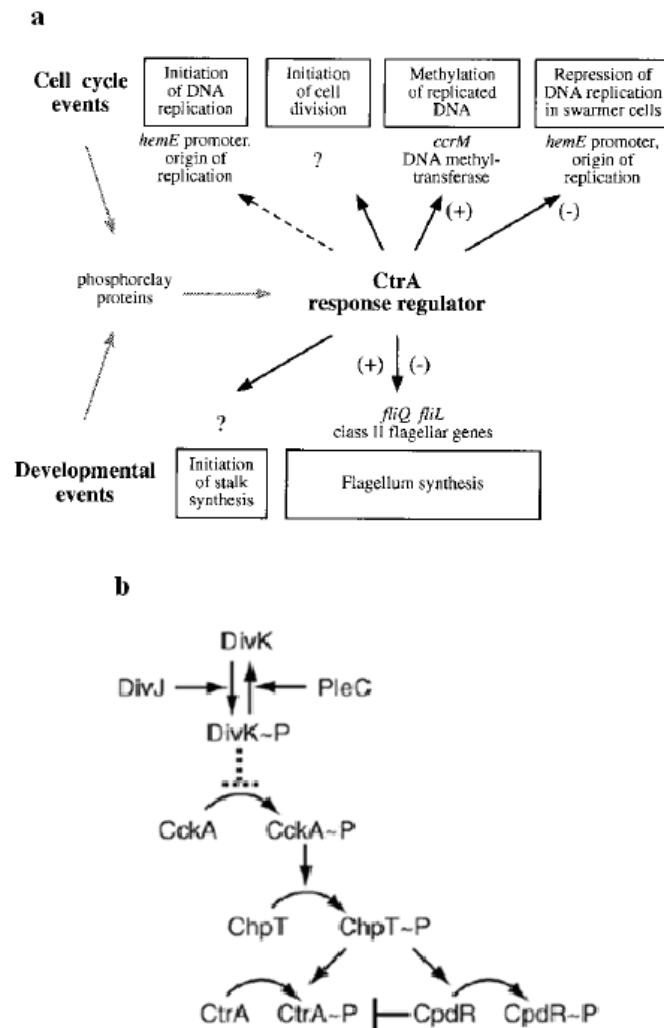
Chez *Caulobacter crescentus*, une relation de type « ping-pong » moléculaire, s'établit donc entre les deux pôles dans la cellule prédivisionnelle en raison de la localisation et de l'activité antagoniste de DivJ et PleC sur DivK (**Figure 7**).

Dans la cellule prédivisionnelle, DivK, jouant le rôle de balle, est libre de diffuser d'un pôle à l'autre de la cellule. Au pôle pédonculé, DivJ recrute et phosphoryle le RR. Cette phosphorylation va permettre la diffusion passive du RR (DivK~P) vers le pôle opposé. A l'inverse, PleC, au pôle flagellé est responsable de la déphosphorylation du DivK~P induisant, de cette manière, son relargage du pôle et sa diffusion passive vers le pôle pédonculé. Ainsi, dans la cellule prédivisionnelle, DivK et DivK~P oscillent d'un pôle à l'autre permettant la mise en place d'un équilibre basé sur la localisation et les activités opposées de DivJ et PleC. La concentration faible en DivK~P au pôle flagellé suffit à inhiber la suite du programme de différenciation. Cela permet notamment d'inhiber la rotation de l'appareil flagellaire tant que la cellule nageuse est liée à la cellule pédonculée.

Néanmoins, après la cytokinèse, le pont cytoplasmique reliant les deux cellules filles est rompu empêchant la diffusion passive du RR d'un pôle à l'autre (**Figure 7**). DivJ ne se trouvant que dans la cellule pédonculée, DivK sera donc majoritairement sous forme DivK~P. Dans la cellule nageuse, la présence de PleC va induire la déphosphorylation du pool de DivK, permettant ainsi le relargage complet de DivK du pôle flagellé. La délocalisation du RR est perçue par la cellule comme un signal de fin de cytokinèse, permettant la remise en route du programme de différenciation. Ainsi, l'absence de DivK~P au pôle flagellé va, notamment, permettre la rotation du flagelle et induire la répression de la réplication du chromosome .

Pour entrer dans un nouveau cycle cellulaire, la cellule nageuse va devoir se différencier à nouveau en cellule pédonculée. Pour ce faire, la cellule doit perdre son flagelle en réprimant PleC et doit former un nouveau pédoncule via la localisation de DivJ au pôle. La réapparition de DivJ au pôle pédonculé va induire le recrutement et la phosphorylation de DivK remettant en route la réplication du chromosome.

S'inscrivant dans un mécanisme de régulation plus global, le système à deux composants DivJ-PleC-DivK participe ainsi à la régulation et au couplage du cycle cellulaire avec le processus de différenciation chez *C. crescentus*.



**Figure 8** : Modèle illustrant la régulation de et par CtrA chez *C. crescentus*

(a) schéma illustrant différentes cibles de CtrA lui permettant de réguler le cycle cellulaire et différentes étapes du processus de différenciation chez *C. crescentus*. CtrA agit sur des cibles très variées soit en les stimulant ou les inhibant directement soit en régulant leur expression géniques (Quon et al, 1996).

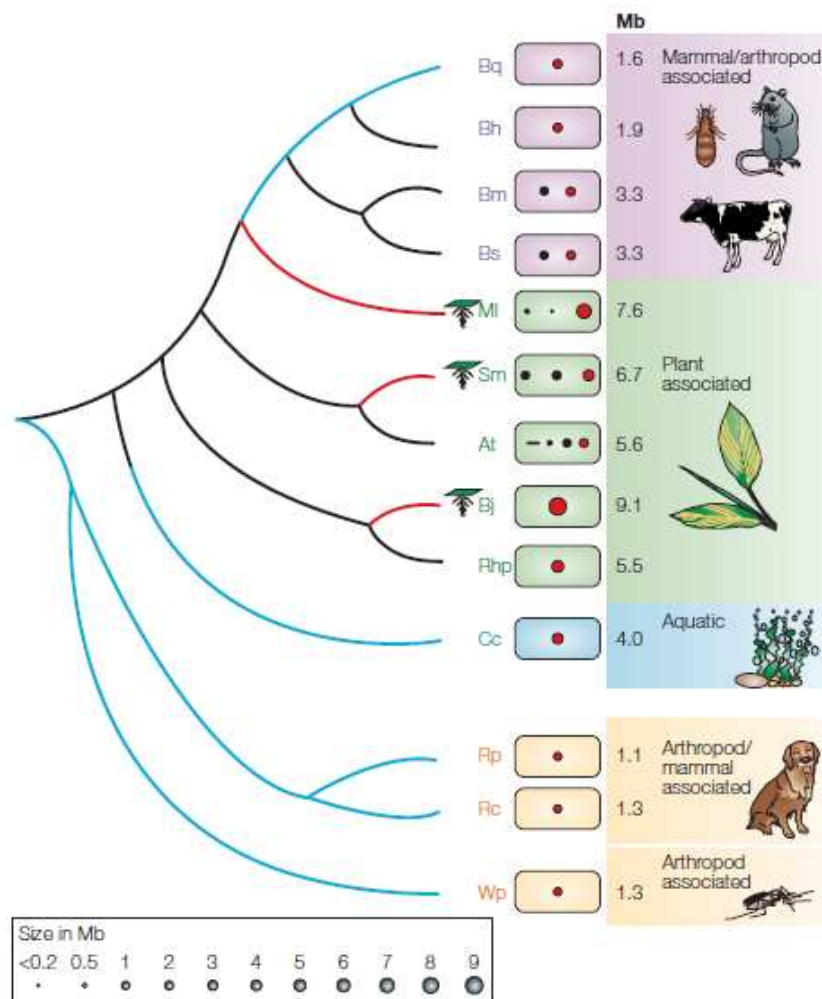
(b) Un réseau de régulation permet le contrôle de CtrA au cours du cycle cellulaire en régulant soit son état de phosphorylation soit sa protéolyse. Le système DivJ-PleC-DivK joue un rôle central dans cette régulation et influence directement l'état de phosphorylation de CtrA. Le phosphorelay CckA-ChpT, stimulé par DivJ, intervient de la même manière dans la régulation du RR global. Le système CpdR-ClpXP, quant-à-lui, régule CtrA en contrôlant sa protéolyse. En absence de phosphorylation, CpdR induit la colocalisation de la protéase ClpXP avec CtrA, permettant la dégradation de ce régulateur de réponse global. CpdR/ClpXP est sous le contrôle du système CckA/ChpT. (Bowers et al, 2008, Iniesta et al, 2006).

---

## ▪ CtrA et la centralisation des signaux

La recherche de supresseurs de mutants conditionnels cryosensibles de *divK* générés par l'insertion d'un transposon, a permis d'identifier, CtrA, pour Cell cycle Transcriptional Regulator A, un acteur agissant en aval de DivK (Wu et al., 1998). Ainsi, la mutation *sokA*, présente au locus de *ctrA*, permet de supprimer le phénotype filamenteux et l'absence de mobilité et de division de mutants conditionnels de *divK* à température restrictive (24°C). De plus, un mutant *sokA* permet également de supprimer les aberrations morphologiques d'une souche *C. crescentus*  $\Delta divJ$ . Ces observations suggèrent donc que CtrA agit donc en aval de DivJ et de DivK. Le gène *ctrA*, est essentiel chez *C. crescentus* et encode un régulateur de réponse global de 231 aa avec son aspartate phosphorylable en position 51 (Asp<sub>51</sub>) (Quon et al., 1996). Chez *C. crescentus*, CtrA contrôle la transcription de près d'un quart des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Laub et al., 2000). De cette manière, CtrA régule le cycle cellulaire en agissant entre autres, sur la division via *ftsZ*, et le processus de différenciation en influençant par exemple, la biosynthèse du flagelle (**Figure 8a**).

Un réseau de régulation complexe a été identifié contrôlant l'activité de CtrA tout au long du cycle cellulaire (**Figure 8b**). le système à deux composants DivJ-PleC-DivK et un système de phosphorelay (**Box 2**) impliquant CckA, une HK hybride et ChpT, une histidine transférase, agissent sur l'état de phosphorylation de CtrA (Bowers et al., 2008). Le régulateur de réponse, CpdR et la protéase ClpXP interviennent dans la protéolyse de CtrA (Chien et al., 2007; Iniesta et al., 2006).



**Figure 9 :** Diversité des styles de vie et des génomes en taille et en structure au sein des alpha-protéobactéries.

Représentation des liens phylogénétiques de 13 alpha-protéobactéries dont le génome est totalement séquencé. Les branches rouges illustrent l'évolution des génomes par gain de gènes, les bleus par perte de gènes. La taille des ronds correspondent à une taille des réplicons de chaque bactérie, ceux en rouges représentant le chromosome principal. *Agrobacterium tumefaciens* a un chromosome linéarisé représenté par un trait. A droite, une illustration très schématique du style de vie de ces bactéries.

At, *Agrobacterium tumefaciens* ; Bh, *Bartonella henselae* ; Bj, *Bradyrhizobium japonicum* ; Bm, *Brucella melitensis* ; Bq, *Bartonella quintana* ; Bs, *Brucella suis* ; Cc, *Caulobacter crescentus* ; MI, *Mesorhizobium loti* ; Sm, *Sinorhizobium meliloti* ; Rc, *Rickettsia conorii* ; Rhp, *Rhodopseudomonas palustris* ; Rp, *Rickettsia prowazekii* ; Wp, *Wolbachia pipientis* (Batut et al, 2004).

## ***Les alpha-protéobactéries*** (Batut et al., 2004)

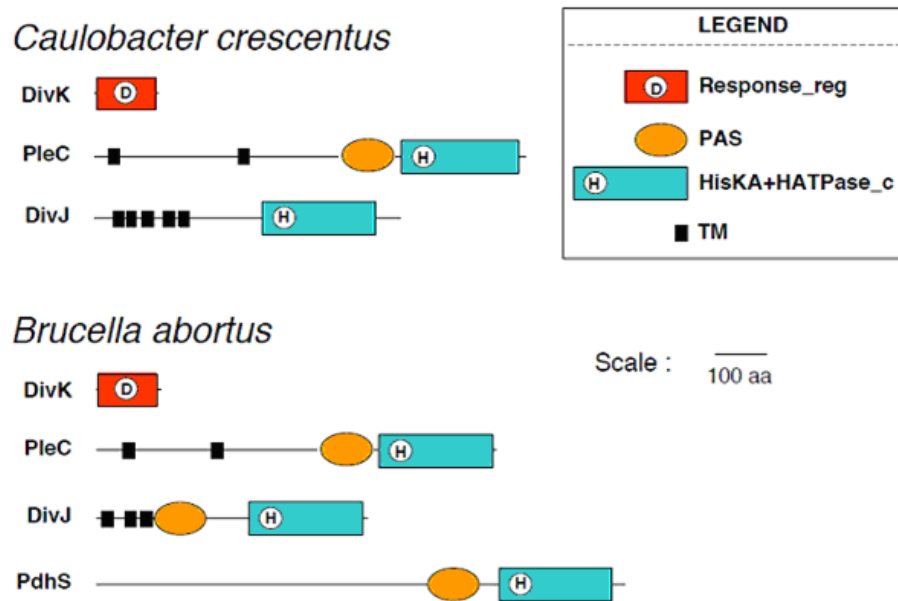
La classe des  $\alpha$ -protéobactéries regroupe des bactéries à Gram-négatifs sur base de l'analyse de séquence de l'ARN16S et d'autres gènes. Le nom protéobactérie provient du grec Proteo et a pour origine, dans la mythologie grecque, le nom de Protée, une divinité marine qui avait la capacité de prendre n'importe quelle forme physique souhaitée. Ce terme illustre donc l'extraordinaire hétérogénéité de ce groupe de bactéries (**Figure 9**).

Ces bactéries se distinguent notamment par les nombreuses interactions qu'elles ont su tisser avec des espèces eucaryotes variées. Des  $\alpha$ -protéobactéries sont ainsi retrouvées en association avec des mammifères (*Brucella* spp., *Bartonella* spp.), avec des végétaux supérieurs (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*) ou encore avec des arthropodes (*Rickettsia prowazekii*).

Les  $\alpha$ -protéobactéries présentent une grande hétérogénéité du point de vue de la taille de leur génome, allant de 1 Mb (*Rickettsia prowazekii*) à 9 Mb (*Bradyrhizobium japonicum*). Cette observation est en lien direct avec le style de vie adopté par ces bactéries. En effet, les bactéries aux génomes les plus grands sont des bactéries symbiotiques ou pathogènes extracellulaires facultatives des plantes telles qu'*A. tumefaciens* (association pathogène avec un génome de 5,6 Mb), *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum* (association symbiotique, respectivement 6,7 et 9 Mb). La taille importante de leur génome reflète l'important bagage génétique nécessaire pour s'adapter aux différents milieux rencontrés ainsi qu'à leurs fluctuations. De cette façon, l'adaptation à une niche constante telle que l'environnement intracellulaire conduit à une réduction dans la taille du génome (Yus et al, 2009). Ainsi, les bactéries pathogènes intracellulaires facultatives, toujours capables de se répliquer indépendamment de leur hôte mais en lien plus étroit avec celui-ci, présentent déjà une réduction importante de leur génome comme observé chez *Brucella melitensis* (génome de 3,3 Mb) ou *Bartonella henselae* (1,9 Mb). Les bactéries pathogènes intracellulaires obligatoires, adaptées à un unique environnement, telles que *Rickettsia prowazekii* (1,1 Mb) et *Wolbachia pipientis* (1,3 Mb), présentent les génomes les plus réduits, illustrant l'interaction avec l'hôte indispensable à la bactérie (**Figure 9**).

Dans le groupe des  $\alpha$ -protéobactéries, la mitochondrie illustre l'étape ultime de l'association obligatoire avec les cellules eucaryotes. La domestication de ce procaryote symbiotique s'est accompagnée de transferts successifs d'ADN mitochondrial vers le noyau eucaryote. Aujourd'hui, le génome des mitochondries est très réduit, codant pour un nombre limité de protéines. La plupart des protéines nécessaires à la respiration sont ainsi encodées par des gènes localisés dans le noyau.

Les  $\alpha$ -protéobactéries, en plus de leur grande hétérogénéité dans la taille de leurs génomes, présentent également une structure génomique extrêmement variable. *C. crescentus* et *B. henselae*, par exemple, contiennent un unique chromosome tandis que certaines comptent deux voire trois chromosomes comme *B. melitensis* ou *S. meliloti*. D'autres encore, comme *A. tumefaciens*, disposent d'éléments associés tels que des plasmides. Cette hétérogénéité au sein de la structure et de la taille des génomes des  $\alpha$ -protéobactéries illustre la plasticité et la dynamique génétique de ces bactéries.



**Figure 11 :** Représentation des domaines de PleC, DivJ et DivK et PdhS chez *C. crescentus* et *B. abortus*.

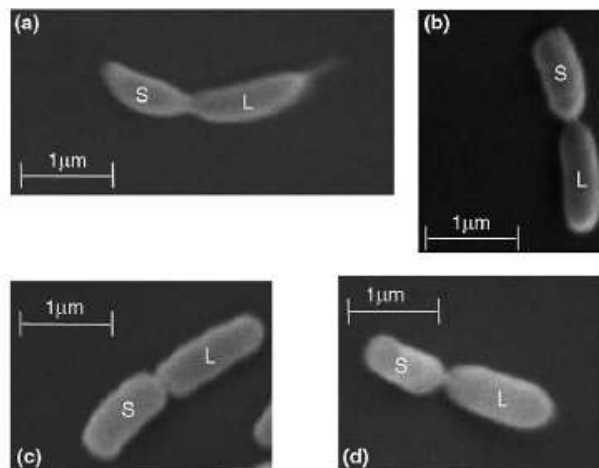
En rouge, le domaine régulateur de réponse (Response\_reg), en orange, les domaines PAS, en noir les segments transmembranaires prédits (TM) et les domaines HK (HisKA+HATPase c) sont en bleu (Hallez et al, 2007).

▪ **Asymétrie chez les alpha-protéobactéries** (Hallez et al., 2004)

Des analyses en microscopie électronique à balayage ont montré que plusieurs  $\alpha$ -protéobactéries, en plus de *C. crescentus* présentaient une division asymétrique. Ainsi, à chaque division, *B. abortus*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* génèrent une grande et une petite cellule (**Figure 10**).

De plus, un homologue de *ctrA* a également pu être identifié chez ces alpha-protéobactéries (Barnett et al., 2001; Bellefontaine et al., 2002; Hallez et al., 2004). Différentes observations telles que l'identification de « CtrA-box » permettant la liaison du RR dans les régions promotrices de certains gènes ou le phénomène de restauration partielle du phénotype sauvage par l'homologue de *ctrA* chez *Rickettsia* d'un mutant conditionnel de *ctrA* chez *C. crescentus*, suggèrent que la régulation globale du cycle cellulaire et de la morphogénèse impliquant CtrA est conservée parmi les alpha-protéobactéries (Barnett et al., 2001; Bellefontaine et al., 2002; Brassinga et al., 2002). Etant donné que ces trois bactéries appartiennent au même groupe que *C. crescentus*, il a été proposé qu'un mécanisme homologue au système à deux composants DivJ-PleC-DivK puisse réguler CtrA et ainsi la division asymétrique de ces  $\alpha$ -protéobactéries. En effet, des gènes orthologues de *divK*, *divJ* et *pleC* ont été identifiés dans les cinq autres genres à l'exception de *R. prowazekii* qui ne dispose que d'un homologue de *pleC* et de *ctrA*.

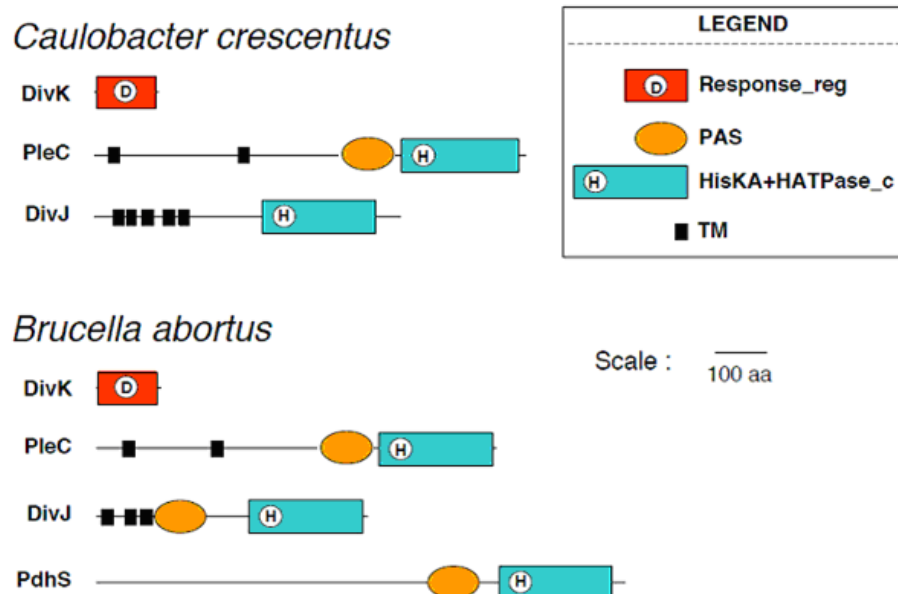
Le RR DivK ainsi que les domaines de transduction du signal des HK sont néanmoins nettement plus conservés par rapport à leur domaine senseur respectif suggérant que le mécanisme de régulation du cycle cellulaire étudié chez *C. crescentus* pourrait bien être conservé. Cependant, étant donné la variation observée dans les domaines senseurs, ceux-ci pourraient intégrer des signaux différents, spécifiques à chaque  $\alpha$ -protéobactérie.



**Figure 10 :** microscopie électronique à balayage de quatre alpha-protéobactérie juste avant septation.

Différentes alpha-protéobactéries présentent une division asymétrique morphologique. (a) *Caulobacter crescentus*; (b) *Brucella abortus*; (c) *Sinorhizobium meliloti*; (d) *Agrobacterium tumefaciens*. Chaque division produit une grande (L) et une petite (S) cellule. (Hallez et al, 2004)





**Figure 11 :** Représentation des domaines de PleC, DivJ et DivK et PdhS chez *C. crescentus* et *B. abortus*.

En rouge, le domaine régulateur de réponse (Response\_reg), en orange, les domaines PAS, en noir les segments transmembranaires prédits (TM) et les domaines HK (HisKA+HATPase c) sont en bleu (Hallez et al, 2007).

## ***Brucella abortus* :**

Le modèle bactérien utilisé au sein de notre laboratoire dans l'étude des mécanismes impliqués dans l'infection cellulaire par des pathogènes procaryotes est *Brucella abortus*. Le genre *Brucella* regroupe à ce jour 9 espèces que l'on distingue par leurs tropismes respectifs pour un hôte particulier : *B. abortus* (bovins), *B. melitensis* (chèvres et moutons), *B. suis* (porcs), *B. ovis* (moutons), *B. canis* (chiens), *B. neotomae* (rongeurs) *B. cetaceae* (cétacés) et *B. pinnipedialis* (phoques) *B. microti* (renards) (Foster et al., 1996; Scholz et al., 2009). Les *Brucella* spp. sont des bactéries Gram-négatives pathogènes intracellulaires facultatives mesurant 1,2 µm de long et 0,8 µm de large. Elles sont responsables d'une des zoonoses les plus répandues au monde (Ko and Splitter, 2003). Ces bactéries sont, d'un point de vue scientifique, fascinantes de par leur capacité à envahir un hôte, contrôler le trafic de leur vacuole dans la cellule infectée pour finalement se constituer une niche de réplication associée au réticulum endoplasmique (Boschioli et al., 2001; Celli, 2006). Les différentes espèces sont néanmoins responsables d'infections chroniques se manifestant, entre autres, par des avortements spontanés chez les animaux et chez l'homme par une maladie appelée « fièvre de Malte ». Néanmoins, il est important de noter que l'homme est probablement un hôte accidentel et que les infections humaines recensées proviennent toujours de la proximité d'un réservoir animal domestique ou sauvage (Godfroid and Kasbohrer, 2002). Cependant, aucun vaccin humain n'est actuellement disponible et le traitement est long et onéreux tandis que les vaccins animaux ont souvent des effets secondaires néfastes tels que l'avortement de l'animal ou une persistance de la réponse sérologique (Schurig et al., 2002).

En plus des risques d'infections humaines, le contrôle de la brucellose représente un enjeu économique important. En effet, on estime les pertes annuelles dues à des infections par *Brucella* à plus de 600 millions de dollars en Amérique latine (Boschioli et al., 2001).

L'absence de vaccin humain, les effets secondaires liés aux vaccins animaux et les enjeux économiques font des *Brucella* spp des pathogènes de classe III, à manipuler dans des conditions de sécurité bien particulières (laboratoire de niveau de sécurité 3).

### ▪ ***B. abortus*, entre conservation et innovation évolutives**

A l'instar de *M. loti*, *S. meliloti* et *A. tumefaciens*, des orthologues de chacune des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation chez *C. crescentus* (*ctrA*, *divJ*, *pleC*, *divK*, *cckA*, *chpT* et *clpXP*) ont été identifiés chez *Brucella abortus* (Hallez et al., 2004). L'homologue de *divK* chez *B. abortus* (*Ba

K*) partage 79% d'identité avec *divK* de *Caulobacter crescentus* (*Cc

K*). De plus, *Ba

K* semble essentiel chez *Brucella abortus* (Johann Mignolet et C. Van der Henst, données non publiées) et la présence sur un plasmide d'une copie de *Ba

K* supprime la létalité d'un mutant  $\Delta_{Cc

K}$  chez *C. crescentus* (Hallez et al., 2007). Un phénomène de restauration partielle du phénotype sauvage est observé entre *Ba~~pleC~~* et *Cc~~pleC~~* dans une souche *C. crescentus*  $\Delta_{Cc~~pleC~~$  (Hallez et al., 2007). Une interaction entre *Ba

K* et *Ba~~pleC~~* ainsi qu'entre *Ba

K* et *Ba

J*, a également été mise en évidence via un test double hybride en levure. Finalement, tout comme cela a été montré chez *C. crescentus* et *S. meliloti*, la localisation subcellulaire de DivK est dépendante de son état de phosphorylation chez *Brucella abortus*, un mutant D53A de *Ba

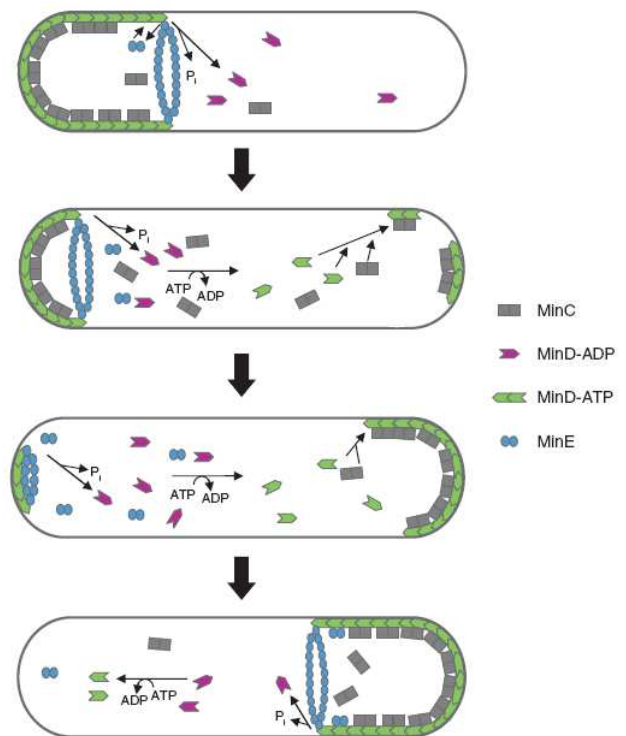
K-YFP* ne présentant plus de localisation polaire chez *Brucella abortus* (Hallez et al., 2007).

Malgré des styles de vie très éloignés, ces données suggèrent que *Brucella abortus* dispose d'un mécanisme analogue au système à deux composants DivJ-PleC-DivK décrit chez *C. crescentus* (Matroule et al., 2004).

**Box 3 : FtsZ et le système Min**

FtsZ est un homologue de la tubuline impliqué dans la cytokinèse chez les bactéries (Vaughan et al, 2004). FtsZ va ainsi polymériser au futur site de septation pour former l'anneau Z et recruter d'autres partenaires tel que MurG, une translocase impliquée dans la formation du peptidoglycan (PG) (Vanheijenoort, 2007). La position du futur site de septation, c'est-à-dire de l'anneau Z, est cruciale pour former correctement les deux cellules filles. Un mécanisme, le Système Min, permettant l'inhibition de la formation de l'anneau Z près des pôles a été identifié chez *E. coli*. Le système Min est composé de trois protéines, MinC, MinD et MinE (Lutkenhaus, 2007) (**Figure** ci-contre). MinC est un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ oscillant d'un pôle à l'autre dans la cellule, guidé par MinD (Raskin and de Boer, 1999).

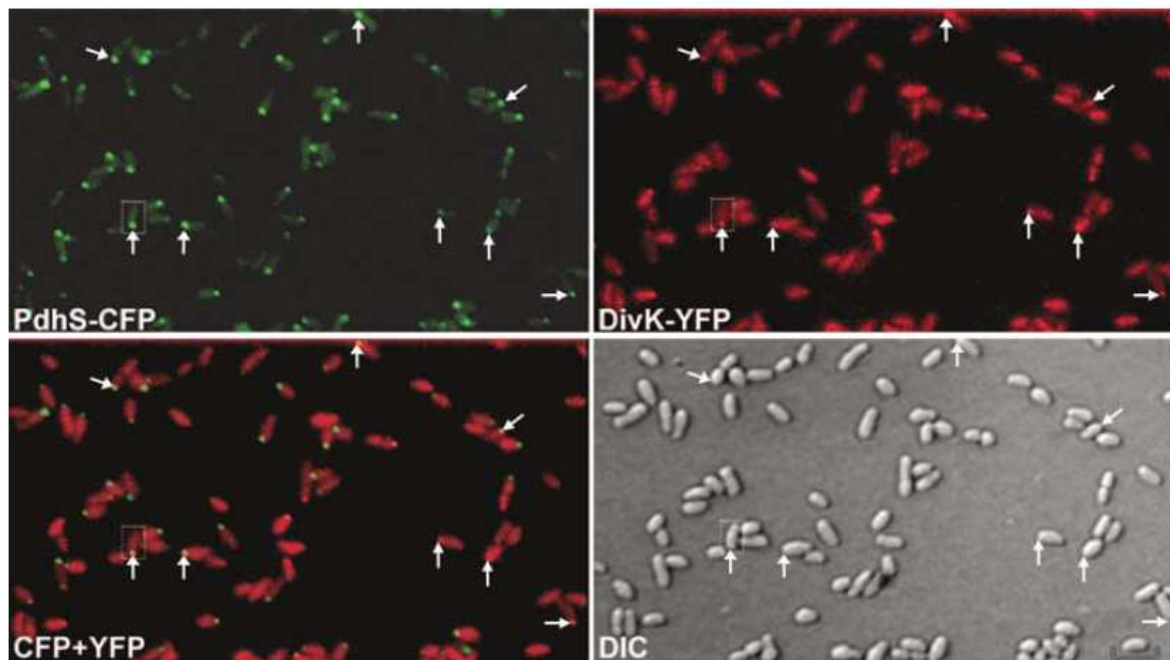
Dans la cellule, les complexe MinCD se lient à la membrane. Cette liaison induit le recrutement d'autre sous unité MinD associé à MinC. MinE, quant-à-lui peut se lier à MinD et stimuler son activité ATPase ce qui cause le relargage de MinD du pôle (**Figure** ci-contre). Dans le cytoplasme, l'ADP de MinD va être échangé par nouvel ATP et la protéine va pouvoir polymériser à l'autre pôle, reformant de complexe MinCD jusqu'à l'arrivée de MinE (Dajkovic and Lutkenhaus, 2006). Le résultat de cette oscillation implique que le mécanisme d'inhibition de la formation de l'anneau Z est la plupart du temps localisé aux pôles laissant une région centrale libre où FtsZ peut polymériser (**Figure** ci-contre) (Lutkenhaus, 2007).



Néanmoins, contrairement au modèle établi chez *Caulobacter crescentus*, une fusion DivJ-YFP ne présente pas un pattern de localisation au vieux pôle chez *B. abortus*. Une fusion PleC-YFP localise quant à elle, soit à l'endroit de septation dans la cellule prédivisionnelle, soit au nouveau pôle après cytokinèse, soit aux deux (Hallez et al., 2007). De plus, dans une souche *B. abortus*  $\Delta divJ$  ou  $\Delta pleC$ , DivK-YFP localise toujours au pôle indiquant que, ni DivJ, ni PleC ne semble réguler la localisation de DivK chez *B. abortus*.

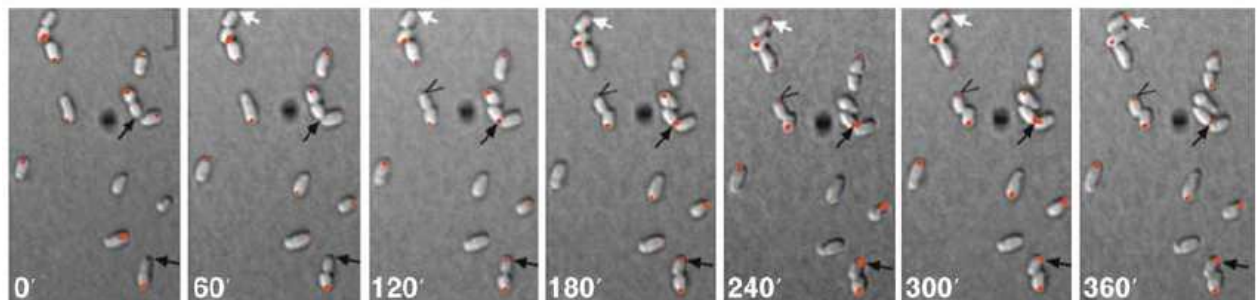
Ces « écarts de conduite » par rapport au modèle présenté chez *Caulobacter crescentus* suggèrent qu'une autre HK inconnue est responsable de la localisation de DivK chez *Brucella abortus* (Hallez et al., 2007; Matroule et al., 2004).

De plus, différentes observations indiquent que la régulation impliquant CtrA contrôle les mêmes processus cellulaires chez *C. crescentus* et chez *B. abortus* (Bellefontaine et al., 2002; Domian et al., 1997) mais, dans certains cas, via des cibles différentes. Par exemple, chez *B. abortus*, CtrA régule l'initiation et la position correcte du septum en agissant sur le contrôle de l'expression de *minC* (**Box 3**) qui lui inhibe FtsZ. Chez *C. crescentus*, par contre, l'opéron *min* n'est pas présent et CtrA réprime directement la transcription de *ftsZ* (Domian et al., 1997). Dans les deux cas, la protéolyse de CtrA permet l'initiation de la division et la mise en place de l'anneau Z.



**Figure 12 :** Localisation de PdhS-CFP et de DivK-YFP chez *B. abortus*.

PdhS et DivK ont été respectivement fusionnés à la CFP et à l'YFP. DivK colocalise avec PdhS à un pôle de la cellule chez *B. abortus* (scale bar, 2 $\mu$ m) (Hallez et al, 2007).



**Figure 13 :** Localisation dynamique de PdhS-CFP au cours du cycle cellulaire chez *B. abortus*.

Expérience en time-lapse visant à observer la localisation dynamique de la fusion PdhS-YFP au cours du cycle cellulaire chez *B. abortus*. Une image à été prise toutes les 60 minutes. PdhS-YFP localise au vieux pôle de la grande cellule. Entre une et deux heures après la cytokinèse, la fluorescence apparait au nouveau vieux pôle de la petite cellule (Hallez et al, 2007). Ces observations ont permis d'établir un modèle de régulation du cycle cellulaire chez *B. abortus* (**Figure 13**).

▪ **Ping-Pong moléculaire chez *Brucella abortus*, une partie à trois** (Hallez et al., 2007)

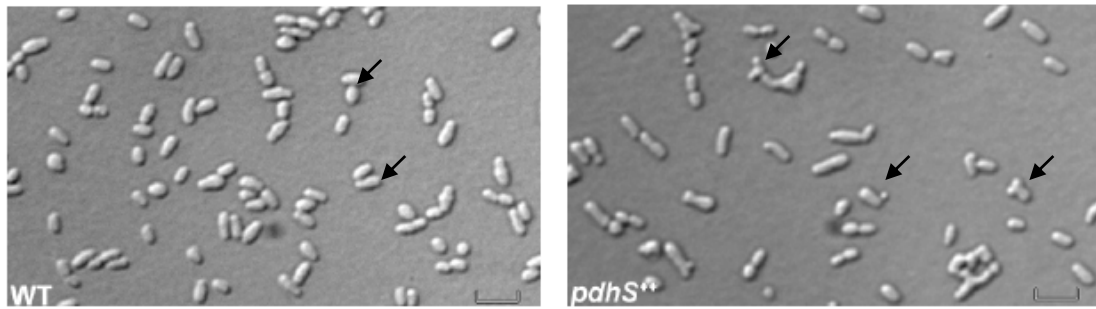
Dans la recherche d'homologues de *pleC* et de *divJ* dans le génome de *Brucella abortus*, un nouveau partenaire potentiel au réseau de régulation DivJ-PleC-DivK a été identifié. Nommé *pdhS*, pour « *PleC-DivJ-Homolog-Sensor* », ce gène, codant pour une histidine kinase de 1035 aa, présente un pourcentage d'identité élevé avec *ccpleC* (36%) et *ccdivJ* (39 %) (**Figure 11**). Des homologues de *pdhS* ont aussi été identifiés chez *M. loti*, *S. meliloti* et *A. tumefaciens*.

Un test double hybride en levure a montré une interaction entre PdhS et  $_{Ba}DivK$ , tout comme  $_{Ba}PleC$  et  $_{Ba}DivJ$ . De plus, la surexpression de *pdhS* chez *B. abortus* conduit à l'apparition d'aberrations morphologiques, en particulier, des cellules branchées et des minicells (**Figure 14**). Ce phénotype est similaire à celui d'une souche *B. abortus* surexprimant  $_{Ba}divK$ ,  $_{Ba}pleC$  ou  $_{Ba}divJ$ . Ces liens entre PdhS et les différents régulateurs de cycle cellulaire suggèrent que, chez *B. abortus* PdhS participe au mécanisme de régulation du cycle cellulaire analogue à celui décrit chez *C. crescentus* impliquant DivJ, PleC et DivK.

De plus, différentes observations font de PdhS un candidat idéal pour le recrutement et la phosphorylation de DivK chez *B. abortus*:

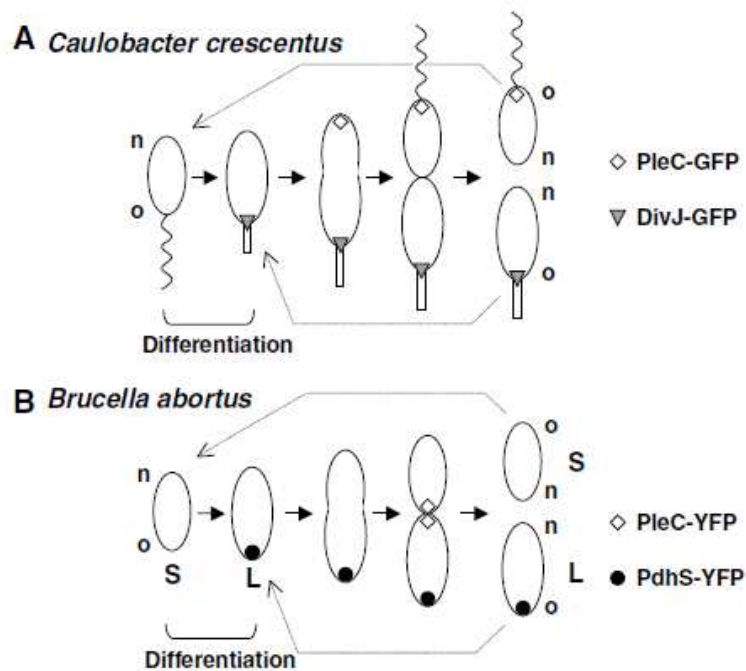
- PdhS et DivK, respectivement fusionnés à la CFP et à l'YFP, colocalisent à un pôle chez *B. abortus*. (**Figure 12**)
- Tout comme pour *divK*, le seul moyen qui a permis la délétion de *pdhS* au locus est d'apporter une copie du gène sur un plasmide indiquant que *pdhS* est essentiel dans les conditions testées chez *B. abortus*.
- Des expériences de time lapse ont pu mettre en exergue la localisation spatio-temporelle de la fusion PdhS-CFP (**Figure 13**). PdhS-CFP s'accumule au niveau du pôle de la grande cellule qui a pu être défini comme étant le vieux pôle. En effet, environ une heure après la division, PdhS-CFP apparaît au nouveau vieux pôle de la cellule fille qui n'a pas reçu le pôle marqué par PdhS lors de la division précédente. Cette observation suggère que la petite cellule doit subir une étape de différenciation permettant de générer une grande cellule et pendant laquelle PdhS apparaît au vieux pôle. La cellule peut ensuite entamer une nouvelle division cellulaire.

Ces données suggèrent donc que PdhS constitue l'HK responsable de la phosphorylation et, de cette manière, de la localisation de DivK chez *Brucella abortus*. Un modèle similaire à celui établi pour *C. crescentus* peut dès lors être présenté (**Figure 15**). Dans ce modèle, PdhS occupe une place centrale dans la régulation du cycle cellulaire. PdhS localise au vieux pôle tandis que PleC localise à l'endroit de septation. PleC pourrait jouer le rôle de phosphatase de DivK et participer ainsi à la mise en place de l'équilibre permettant l'oscillation de DivK et DivK~P dans la cellule prédivisionnelle. Néanmoins, aucune donnée ne nous indique actuellement que  $_{Ba}PleC$  est une phosphatase de DivK à part l'hétéro-complémentation d'un mutant  $\Delta pleC$  chez *C. crescentus* (Hallez et al., 2007). Comme chez *C. crescentus*, la petite cellule devrait subir un processus de différenciation impliquant la localisation de PdhS au vieux pôle afin d'initier un nouveau cycle cellulaire. Ce modèle n'exclut pas un rôle possible de DivJ dans le contrôle de DivK dans certaines conditions.



**Figure 14 :** Observation de l'effet de surexpression de *pdhS* chez *B. abortus*.

Comparaison du phénotype d'une souche *B. abortus* sauvage avec une souche surexprimant *pdhS*. Les flèches, à gauche, présentent des cellules au phénotype sauvage tandis qu'à droite elles indiquent des cellules AM, une cellule branchée et une minicell. La surexpression de *pdhS* produit des aberrations morphologiques (AM) (Hallez et al, 2007).



**Figure 15 :** Modèles de localisation des différents acteurs impliqués dans la localisation de DivK au cours du cycle cellulaire chez *C. crescentus* et *B. abortus*.

Chez *Brucella abortus*, PdhS est responsable de la localisation de DivK dépendante de son état de phosphorylation au cours du cycle cellulaire. Contrairement au modèle établi pour *C. crescentus*, DivJ ne localise pas au vieux pôle chez *Brucella abortus* et PleC localise au septum ou au nouveau pôle et pourrait jouer le rôle de phosphatase du RR DivK (Hallez et al, 2007).

## ***PdhS, une HK atypique :***

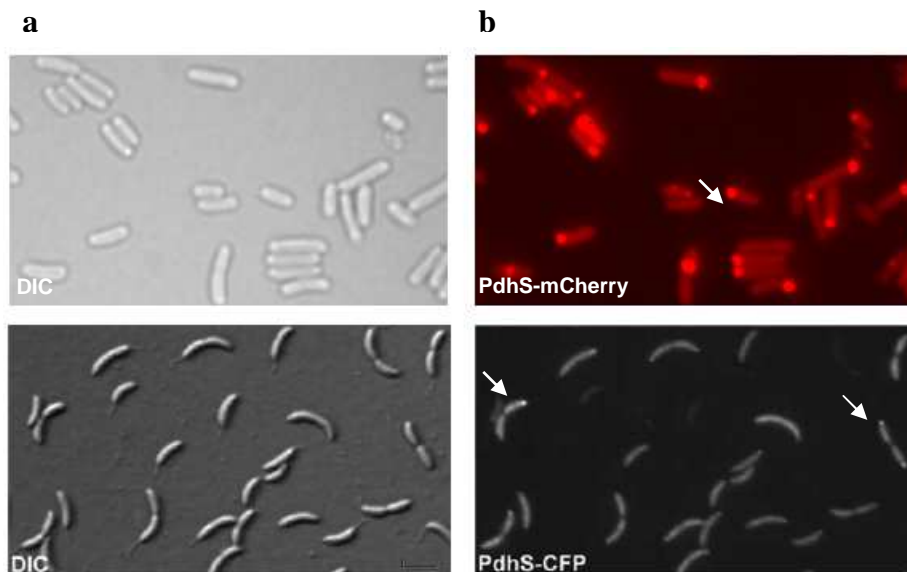
PdhS est une HK de taille relativement importante, comptant 1035 résidus avec l'histidine phosphorylable en position 805. La longueur de cette HK est atypique. A titre de comparaison, DivJ et PleC comptent respectivement 435 et 783 résidus (Hallez et al., 2007). De plus, dans la séquence de PdhS, aucun domaine transmembranaire n'a pu être prédit alors que la majorité des HK bactériennes sont membranaires (Laub and Goulian, 2007). Ainsi, sur les 22 HK prédites de *B. abortus*, 18 contiennent des segments transmembranaires prédits (Hallez et al., 2007). Cette particularité permet de classer PdhS dans la catégorie des HK cytoplasmiques (**Box 1**). Néanmoins, la localisation polaire de PdhS indique la présence d'un mécanisme inconnu permettant le recrutement au vieux pôle de l'HK. Cette structure d'ancrage semble relativement bien conservée puisque l'insertion d'un plasmide contenant la séquence de PdhS fusionnée à un fluorochrome permet la localisation polaire de la protéine chez *C. crescentus* et, dans certaines conditions particulières chez *E. coli*, deux bactéries sans homologue de la protéine (Hallez et al., 2007) ; Charles Van der Henst, thèse en cours). (**Figure 16**) La localisation polaire de PdhS chez la gamma-protéobactérie est surprenante car *E. coli* est connue pour se reproduire par division morphologiquement symétrique. Il est possible que le recrutement polaire de PdhS chez la gamma-protéobactérie soit lié à un autre mécanisme qu'à la structure d'ancrage conservée parmi les alpha-protéobactéries.

Le gène *pdhS* présente 39% d'identité avec *ccdivJ* et 36% avec *ccpleC*. Cette conservation se retrouve en réalité en grande partie dans le domaine de transduction du signal de ces protéines, au niveau des domaines HK (correspondant au résidu 800 à 1035 chez PdhS) (**Figure 11**). Le faible taux de conservation entre les domaines senseurs des HK n'est pas un phénomène étonnant au sein des HK. En effet, ce sont les RR et les domaines de transduction du signal des HK qui sont essentiels à la fonction des systèmes à deux composants d'où leur taux de conservation élevé. Par contre, les domaines senseurs présentent une tolérance de mutations plus élevée pouvant conduire à l'émergence de domaines pouvant sentir de nouveaux stimuli. PleC semble cependant présenter une plus grande zone d'homologie avec PdhS mettant en évidence la présence d'un domaine PAS (résidus 657 à 782) chez PdhS (Hallez et al., 2007). Une région de près de 650 aa reste néanmoins sans fonction prédite au sein du domaine senseur de PdhS.

Les domaines PAS sont des domaines protéiques que l'on retrouve au sein de protéines senseurs impliquées dans la perception de signaux externes, très variés, à la cellule, tels que l'intensité lumineuse, le potentiel redox, la concentration en O<sub>2</sub> ainsi que différents ligands (Taylor and Zhulin, 1999).

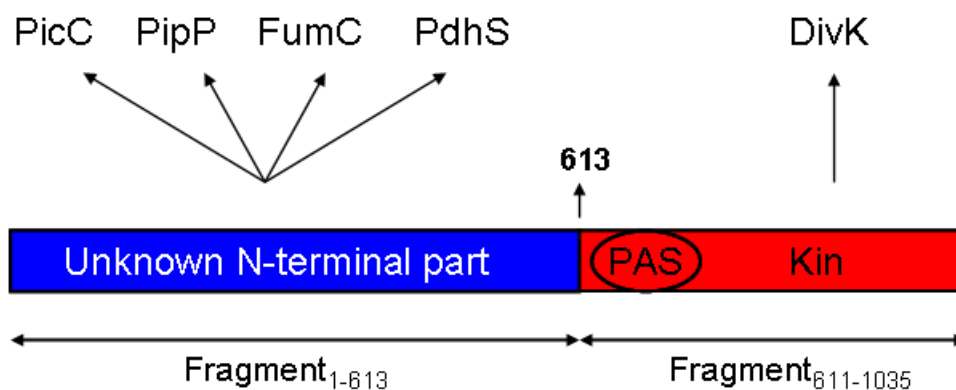
Des domaines PAS ont été identifiés dans des protéines appartenant aux trois règnes du vivant, bactéries, Archeae et eucaryotes mais ils semblent plus répandus chez les procaryotes où des protéines contenant jusqu'à six domaines PAS ont été identifiées (Schlafli et al., 2009).





**Figure 16** : Localisation des fusions PdhS-mCherry et PdhS-CFP chez *E. coli* et chez *C. crescentus*

(a) La fusion PdhS-mCherry localise majoritairement au pôle chez *E. coli*.  
 (b) La fusion PdhS-CFP localise au pôle pédonculé chez *C. crescentus*.  
 (scale bar, 2µm) (Hallez et al, 2007 ; Charles Van der Henst, thèse en cours)



**Figure 17** : Résumé des domaines prédits et des interactions connues de PdhS.

Schéma représentant l'ensemble des données connues sur le rôle des différentes régions de PdhS. Les régions en rouge représentent les domaines identifiés dans la partie C-terminale, correspondant au fragment<sub>611-1035</sub>. La région en bleu, c'est à dire le fragment<sub>1-613</sub>, correspond à la région de plus de 600 résidus ne présentant aucun domaine prédit. Un test double hybride en levure a pu mettre en évidence différents partenaire potentiel interagissant soit avec le fragment<sub>1-613</sub> ou le fragment<sub>611-1035</sub>. De plus, les 613 premiers résidus contiennent l'information nécessaire permettant la localisation au vieux pôle de PdhS (Hallez et al, 2007 ; Johann Mignolet, données non publiées)

## ▪ Premier défrichage autour de PdhS :

Pour mieux comprendre le rôle de PdhS, un premier découpage de l'HK a déjà été effectué, séparant les 613 premiers résidus (fragment<sub>1-613</sub>) du domaine PAS et du domaine HK (fragment<sub>611-1035</sub>) (Hallez et al., 2007). Fusionné à la GFP, le fragment<sub>1-613</sub> présente une localisation polaire chez *B. abortus* et chez *C. crescentus*. Ainsi les 613 premiers résidus contiennent l'information nécessaire à la localisation polaire de PdhS indiquant également que la fonction kinase n'est pas indispensable à la localisation de la protéine.

## ▪ PdhS et ses collaborateurs:

Etant donné la longueur inhabituellement grande du domaine senseur de PdhS, un test de double hybride en levure, en vue d'identifier différents interactants potentiels de PdhS a été entrepris (Johann Mignolet, données non publiées). Le test a pu mettre en évidence l'interaction déjà rapportée entre DivK et le fragment<sub>611-1035</sub>, c'est à dire le fragment comportant le domaine HK et le domaine PAS (Hallez et al., 2007). Le test montra également que PdhS était capable d'interagir avec lui-même via le fragment<sub>1-613</sub>. Trois nouveaux interactants potentiels ont également pu être révélés, tous les trois interagissent aussi avec le fragment<sub>1-613</sub> de l'HK (Johann Mignolet, données non publiées). Deux sont des protéines hypothétiques, annotées PicC et PipP, qui n'ont pas de fonction connue, le troisième est FumC, une fumarase (**Figure 17**).

PicC, pour « *PdhS Interactant Coiled-Coils* », est une petite protéine hypothétique de 130 aa possédant un domaine coiled-coils sur toute sa séquence, sans orthologue chez *C. crescentus*. Les domaines coiled-coils sont des régions protéiques impliquées dans les interactions protéine-protéine.

PipP, pour « *PdhS Interactant Partially Polar* », contient 233 résidus et n'est pas essentielle chez *B. abortus* mais fusionnée à l'YFP, elle présente une localisation partielle au vieux pôle.

FumC, une fumarase de classe II (**Box 3**), est une enzyme de 463 résidus catalysant l'interconversion du fumarate en malate au niveau du cycle de Krebs. Une fusion FumC-YFP colocalise avec une fusion PdhS-CFP au vieux pôle chez *Brucella abortus* indiquant un possible recrutement de la fumarase par PdhS.

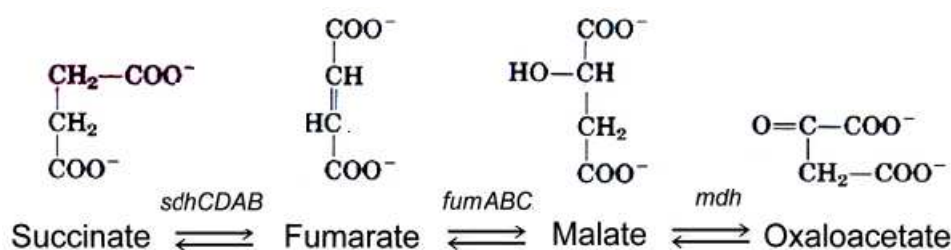
Ni FumC, ni PipP ne contiennent des segments transmembranaires et la localisation de PdhS-YFP ne semble pas perturbée dans une souche mutante  $\Delta$ fumC ou  $\Delta$ pipP (Johann Mignolet, données non publiées; Charles Van der Henst, mémoire 2007). PdhS semble donc induire le recrutement de ses partenaires et non l'inverse, le mécanisme d'ancrage de l'HK restant à l'heure actuelle un mystère. Néanmoins, la découverte d'une fumarase comme interactant potentiel suggère un lien entre la division asymétrique et le métabolisme (Johann Mignolet, données non publiées).

Comme résumé dans la figure ci-jointe (**Figure 17**), PdhS est donc une HK sans segment transmembranaire prédit, localisée au vieux pôle chez *B. abortus*. Elle dispose d'un domaine senseur exceptionnellement long dans lequel un unique domaine PAS a pu être identifié par homologie. PdhS, via son fragment<sub>611-1035</sub>, permet le recrutement de DivK au pôle et interagit, via son fragment<sub>1-613</sub> avec lui-même, PicC, PipP et FumC. Malgré ces différents résultats, le fragment N-terminal de près de 650 résidus, correspondant au domaine senseur reste encore « Terra Incognita » et peu de choses sont connues à propos de son rôle dans la localisation et son impact sur l'activité de PdhS.

**Box 4 : Les Fumarases**

Les fumarases sont des enzymes catalysant la conversion du fumarate en malate au niveau du cycle de Krebs (voir figure ci-contre adaptée de Park and Gunsalus, 1995). Trois gènes codant des fumarases, *fumA*, *fumB* et *fumC*, ont été identifiés dans le génome d'*Escherichia coli*. Suivant la présence ou non de centre Fer-Soufre, on peut les répartir en deux catégories (Park and Gunsalus, 1995). Les gènes *fumA* et *fumB* sont homologues et encodent des protéines possédant un centre 4Fe-4S. Elles appartiennent aux fumarases de classe I. Les radicaux superoxydes  $O_2^-$ , peuvent lier un atome de fer, déstabilisant dans son ensemble le centre Fer-Soufre indispensable à l'activité enzymatique de ces fumarases (Flint et al 2003).

Contrairement à FumA et FumB, FumC est une fumarase de classe II. Elle n'a pas besoin d'atome de fer pour son activité ce qui lui confère donc une résistance à l'oxydation et à une déplétion en fer (Park and Gunsalus, 1995). L'activité totale des fumarases de classe I atteint son maximum à 1% d' $O_2$  tandis que celle de FumC atteint son maximum à une concentration de 15% d' $O_2$  dans le milieu. FumC pourrait dès lors servir de fumarase de secours lorsque la bactérie est en condition trop oxydante pour permettre l'activité de FumA et de FumB (Tseng 2000).



Le génome de *Brucella abortus* contient un gène codant une fumarase de classe I, *fumA* et un codant une fumarase de classe deux, *fumC*. Aucun homologue proche de *fumB* n'a été identifié. Une souche délétée  $\Delta f_{umA}$  et une  $\Delta f_{umC}$  sont viables tandis qu'un double mutant  $\Delta f_{umA}\Delta f_{umC}$  semble létal (Johann Mignolet, unpublished data). Cette observation suggère que FumA et FumC partagent une activité fumarase indispensable à la survie de *Brucella abortus*.

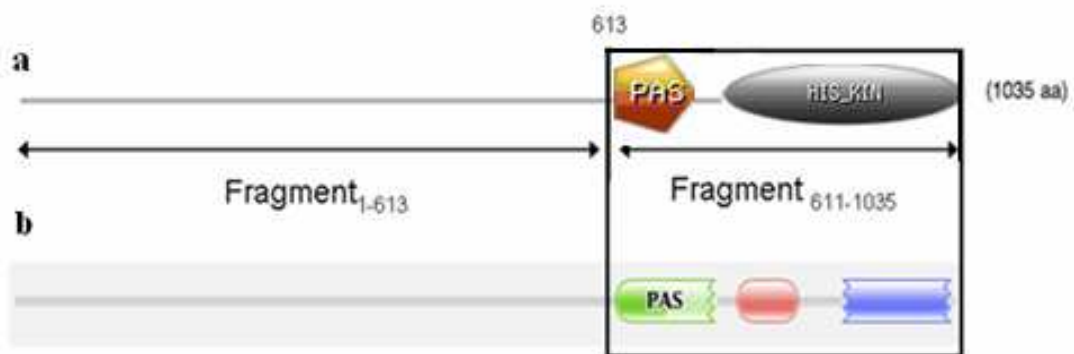
## **Objectifs du mémoire :**

### **Caractérisation de PdhS, une histidine kinase essentielle localisée au pôle chez *Brucella abortus* par une approche de « délimitation de fragments fonctionnels»**

Ce mémoire vise à déterminer d'une part le fragment minimum de la protéine permettant la localisation polaire de PdhS via l'utilisation de protéine fluorescente et d'autre part de définir les différentes régions impliquées dans les interactions avec les partenaires connus de PdhS et ce via un test en double hybride en levure. Pour ce faire, une méthode de « délimitation de fragments» a été appliquée en vue de générer une banque de fragments de la protéine les plus stables possible. Ce découpage nous permettrait ainsi de mieux définir le(s) rôle(s) des différentes régions, en particulier du domaine senseur, au sein de la protéine.



# **Résultats et Discussions**



**Figure 17** : Prédiction de Domaine au sein de PdhS chez *Brucella abortus*

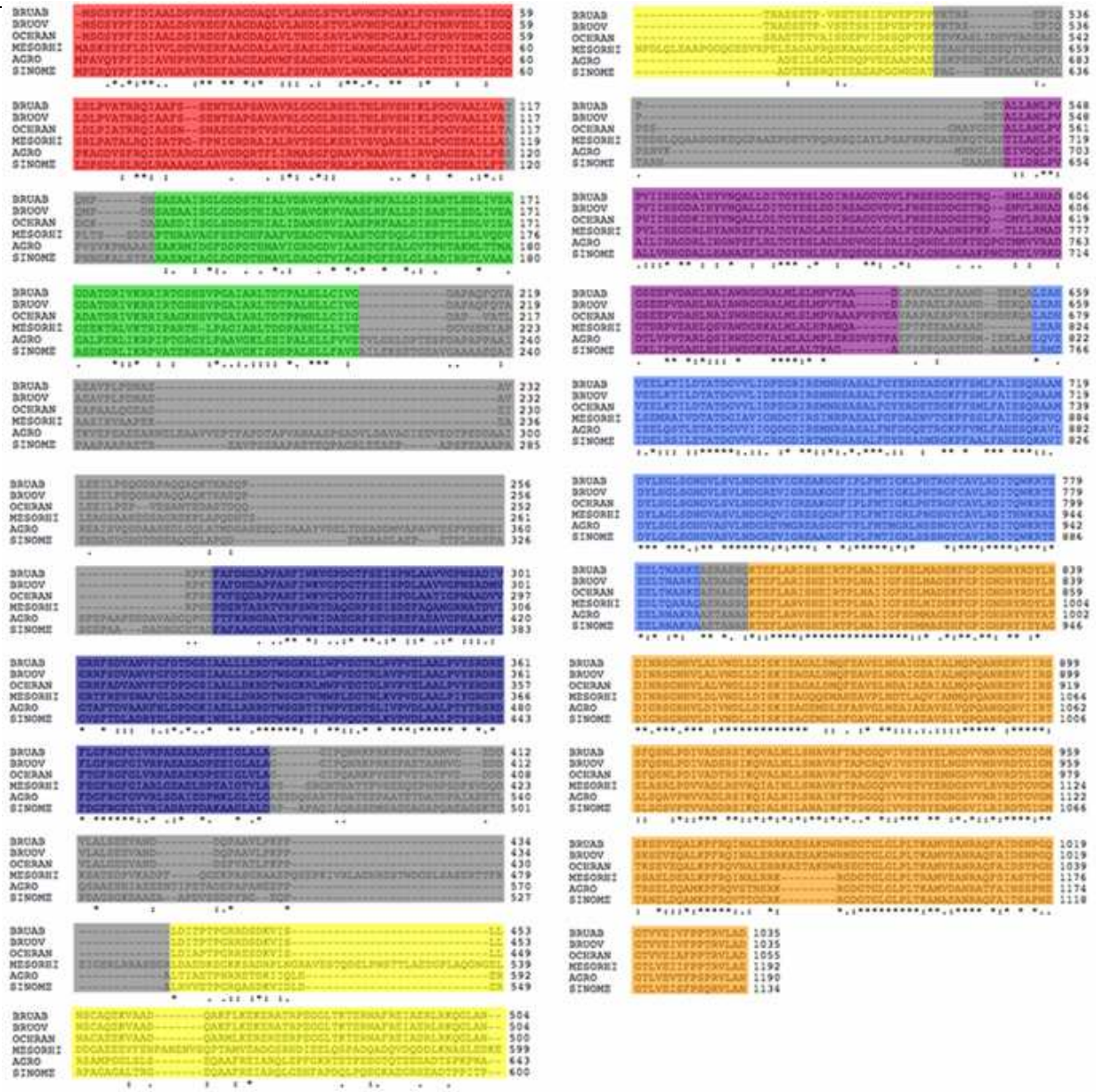
(a) La séquence protéique de PdhS chez *Brucella abortus* a été analysée via PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) pour identifier des domaines potentiels. Un domaine Pas a été identifié des résidus 659 à 772 et un domaine HK des résidus 802 à 1031 avec résidus histidine phosphorylable en position 805 (His\_805). (b) Une prédiction identique, effectuée sur pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), a mis en évidence les mêmes domaines. Un domaine Pas des aa 661 à 785 (E-value de  $10^{-08}$ ) et un domaine HK contenant la fonction HK (résidus 795 à 864, E-value de  $10^{-20}$ ) et l'activité HATPase (résidus 911 à 1028, E-value de  $10^{-18}$ ). Toute la partie N-terminale de PdhS ne présente pas de domaines prédits avec une E-value suffisante.

## Résultats et discussions

Afin de définir les régions minimales pour la localisation et pour l'interaction avec des partenaires connus, nous avons tronqué PdhS à partir de son extrémité amino-terminale et de son extrémité carboxy-terminale. Une banque de fragments couvrant l'entièreté de la séquence protéique a ainsi été créée. Nous avons ensuite fusionné chacun de ces fragments d'une part à un fluorochrome pour tester sa localisation chez *B. abortus*, d'autre part à un domaine de transactivation (*domaine AD*) pour un test double hybride en levure.

L'organisation des résultats reflète cette démarche. D'abord, nous détaillerons la technique de « conserved fragments délimitation » nous ayant permis d'obtenir la banque de fragments de PdhS ainsi que la stratégie choisie pour la construction des nombreux vecteurs nécessaires à nos tests de localisation et d'interaction. Ensuite, nous présenterons les différents résultats obtenus concernant la localisation des fragments de PdhS fusionnés à l'YFP chez *B. abortus*. Nous aborderons également les effets engendrés par l'expression de ces fragments tronqués de *pdhS* fusionnés à l'*yfp* sur la division et la croissance de *B. abortus*. Enfin, nous consacrerons la dernière partie aux résultats du test double hybride en levure entre les fragments de PdhS et cinq interactants connus afin de déterminer le domaine d'interaction minimum avec chaque partenaire. Finalement, les différents résultats seront analysés et discutés. Des recoupements entre les données de localisation et d'interaction seront également établis dans la discussion.





**Figure 18** : Délimitation des différents fragments conservés identifiés dans PdhS

Sur base d'alignement de séquence multiple entre PdhS et ses homologues (ClustalW2) chez d'autres  $\alpha$ -protéobactéries, nous avons identifiés 7 régions conservées (en couleur) séparées les unes des autres par des régions variables (en gris) Nous avons donc définis sept fragments au sein de PdhS. Deux correspondent à des domaines prédits sur les bases de données (PAS et Kin). Les cinq autres sont des régions conservées entourées de régions variables (F1 à F5). Chacune de ces régions conservées peut correspondre à un ou plusieurs domaines structuraux. Les régions variables peuvent être considérées comme des linkers. Les \* correspondent à des résidus conservé chez tous les homologues de PdhS alignés tandis que les : indiquent un résidus majoritairement conservé entre les espèces.

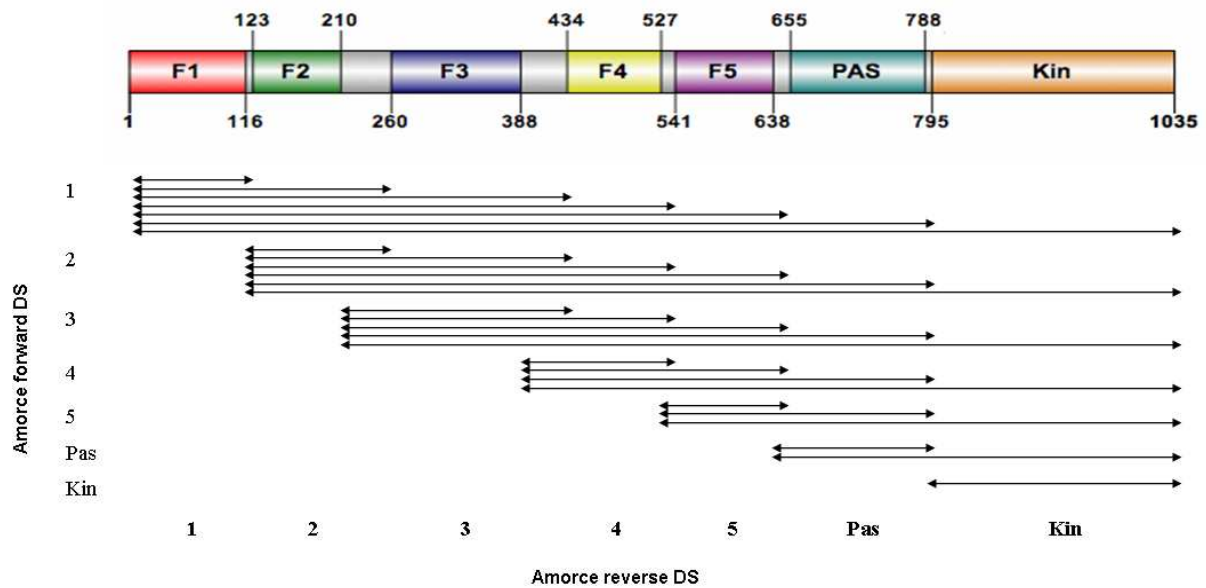
## Partie I : Approche de « délimitation de fragments conservés » : générer une banque de protéines tronquées de PdhS

### ▪ Délimitation des différents fragments conservés au sein de *pdhS*

PdhS est une histidine kinase (HK) de 1035 résidus dont 655, à partir de l'extrémité N-terminale, n'appartiennent à aucun domaine prédit de fonction connue. Afin de déterminer la méthode pour tronquer la protéine, nous avons d'abord procédé à une recherche de domaines prédits à partir de la séquence protéique de PdhS. Sur base de différents programmes comme Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>) et CDD (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), seuls les deux domaines déjà connus furent identifiés (**Figure 17**), le domaine HK du résidu 802 à 1031 et le domaine PAS, des acides aminés 659 à 772 laissant toujours une région de 655 aa vierge de prédiction.

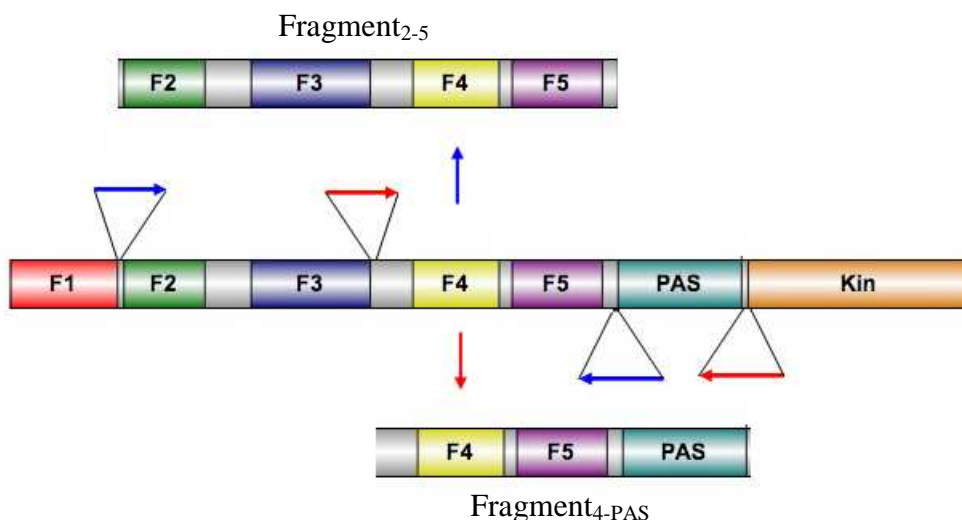
Afin de définir des régions permettant de fragmenter PdhS dans sa partie N-terminale sans prédiction, nous avons appliqué une approche de « conserved fragments delimitation », basée sur des alignements de séquence entre PdhS et ses homologues proches identifiés chez d'autres  $\alpha$ -protéobactéries.

Notre hypothèse est que ces alignements de séquences permettraient la mise en évidence de certaines régions plus conservées que d'autres au sein des séquences comparées. Cette conservation indique une pression de sélection subie par ces régions illustrant ainsi leur importance dans les processus biologiques. Ces régions conservées pourraient dès lors correspondre à des domaines potentiels de PdhS nous permettant de définir le nombre de fragments tronqués à générer. Sur base du programme ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), des alignements de séquences multiples furent donc réalisés entre différents homologues de PdhS, d'abord au sein du genre *Brucella*, ensuite entre différents homologues chez différentes  $\alpha$ -protéobactéries. Les deux alignements, présentant des résultats similaires furent regroupés en un alignement plus général représenté ci-contre (**Figure 18**). Les deux premières séquences protéiques proviennent d'homologues de PdhS de bactérie du genre *Brucella* (respectivement *B. abortus* et *B. suis*) et les 4 autres, d'homologues présents chez diverses  $\alpha$ -protéobactéries (*Ochrobactrum anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti*). Ces analyses révélèrent la présence de 5 régions conservées en plus du domaine HK et du domaine PAS au sein de *pdhS* (**Figure 18**). La taille de ces régions conservées, séparées l'une de l'autre par des séquences très variables, va d'une centaine d'acides aminés à 250 résidus, correspondant à la taille moyenne des domaines au sein des protéines (Wetlaufer and Ristow, 1973). L'absence de tolérance de mutation indique que la séquence est importante pour permettre le repliement correct de la région. Notre hypothèse est donc que ces séquences protéiques conservées pourraient dès lors correspondre à des domaines structuraux potentiels (Wodak and Janin, 1981). Nous avons défini un domaine structural comme un fragment protéique pouvant se replier correctement indépendamment du reste de la protéine. Les régions variables seraient, quant à elles, des *linkers* reliant les différents domaines structuraux de la protéine entre eux. Ces régions variables pourraient néanmoins correspondre à des boucles exposées au solvant, reliant deux parties d'un même domaine structural. Néanmoins, un simple alignement de séquence ne nous permet pas de discriminer ces deux possibilités.



**Figure 19** : Matrice de délétion pour la fragmentation de PdhS

Basée sur l'association de chaque primer forward avec chaque reverse, une matrice de délétion à été générée pour faciliter la fragmentation. Chaque ligne correspond à une amorce forward associée aux différentes amorces reverse. A l'inverse, chaque colonne correspond à une amorce reverse associées aux différentes amorces forward. On obtient donc une matrice de 28 fragments. La taille des différents domaines structuraux étant connue (notée ici en acide aminé), il est facile de déduire la taille de chaque fragment en jetant un coup d'œil à la matrice.



**Figure 20** : schéma illustrant les PCR permettant de générer la banque de fragments de protéines tronquées

En Bleu, les amorces génèrent le fragment <sub>2-5</sub> tandis qu'en rouge les amorces amplifient le fragment<sub>4-PAS</sub>. Les différentes amorces s'hybrident dans les régions variables flanquant les domaines structuraux potentiels.

Des études de diffraction de cristaux de PdhS purifiée, suivie de la résolution de la structure tridimensionnelle permettraient de lever cette ambiguïté. PdhS fut donc délimité en 7 fragments, cinq correspondants à des régions conservées par les alignements de séquences et deux à des domaines prédits dans des bases de données. Il est important de noter que chaque fragment peut contenir un voire plusieurs domaines structuraux. De plus, il est possible que deux fragments adjacents correspondent en réalité à un seul domaine structural, la région variable étant dans ce cas une boucle et non un *linker*. (**Figure 18**).

Selon notre hypothèse, les régions variables correspondent à des *linkers*. Néanmoins, un rôle de ces *linkers* dans la stabilisation des régions conservées les jouxtant n'est pas exclu. Afin d'optimiser les chances de repliement correct de nos différents fragments, nous avons décidé d'intégrer à chacun de nos 7 fragments définis, les *linkers* qui les flanquent. Par souci de facilité, nous proposons comme nomenclature de nommer nos sept différents fragments (F) à partir de l'extrémité terminale, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>PAS</sub> et F<sub>Kin</sub> (les deux derniers correspondant aux domaines prédits) (**Figure 18**).

### ▪ Génération d'une banque de fragments de PdhS

Afin de produire des fragments de PdhS tronqués à partir de l'extrémité N-terminale et/ou de l'extrémité C-terminale, nous avons eu recours à la PCR. Pour chacun des sept fragments délimités dans la protéine, une amorce *forward* et une amorce *reverse* s'hybrident dans les *linkers* les jouxtant furent synthétisées (voir **matériels et méthodes**). Ces amorces furent conçues pour rendre notre banque de fragments compatible avec le système Gateway® (Hartley et al 2000) Une température d'hybridation de 53 °C fut établie pour permettre l'association de chaque amorce *forward* avec chaque amorce *reverse* en PCR. A chaque amorce *forward*, un codon start ATG fut ajouté pour permettre la traduction de notre fragment. L'amorce *forward* du F<sub>1</sub> et l'amorce *reverse* du F<sub>Kin</sub> ne s'hybrident pas dans des régions *linkers* (puisque'il n'y en a pas pour ces domaines) mais directement dans leur domaine structural correspondant. Un codon start était déjà présent dans la séquence de la *forward* F<sub>1</sub> et le codon stop de l'amorce *reverse* F<sub>Kin</sub> a été supprimé pour permettre l'expression des fusions en C-terminal du F<sub>Kin</sub>.

Sur base de ces amorces, une matrice de délétion fut établie pour définir les différents fragments tronqués (**Figure 19 et 20**). Chaque ligne de la matrice associe une amorce *forward* avec une amorce *reverse* tandis que chaque colonne associe une amorce *reverse* avec une *forward*. Ces combinaisons permettent de produire, par amplification PCR, une banque de 28 fragments de *pdhS* allant de 370 pb à 3200 pb. La taille de chacun des sept fragments définis étant connue, la longueur de chaque combinaison d'amorces à amplifier peut rapidement être établie en regardant la matrice. Nous proposons de nommer chaque fragment généré en fonction de ses amorces *forward* et *reverse* ayant permis son amplification. Par exemple, le fragment<sub>2-5</sub> (F<sub>2-5</sub>), amplifié par les amorces *forward* F<sub>2</sub> et *reverse* F<sub>5</sub>, correspond à la région allant du fragment 2 au fragment 5 inclus, (F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub>) tandis que le fragment 1 (F<sub>1</sub>), amorce *forward* et *reverse* F<sub>1</sub>, ne contient que le fragment 1, son annotation n'est donc pas modifiée (**Figure 19 et 20**).

L'enzyme utilisée pour les PCR est la Phusion™ (Biocompare®) pour son activité « *proof reading* » permettant de minimiser l'apparition de mutations (1/10000) par rapport à d'autres enzymes comme la *Taq* polymérase (1/1000) (voir **matériels et méthodes**).



Les fragments amplifiés furent ensuite vérifiés par migration sur gel d'agarose et discriminés en fonction de leur taille. Sur les 28 fragments théoriques, 25 ont pu être amplifiés spécifiquement, les fragments 1-PAS ( $F_{1-PAS}$ ), 2-4 ( $F_{2-4}$ ) et 5-Kin ( $F_{5-Kin}$ ) étant manquant.

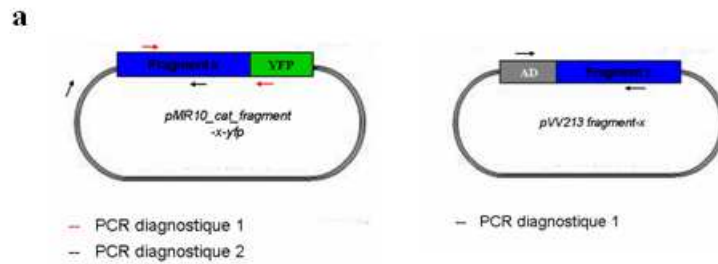
### ▪ Construction des vecteurs nécessaires pour les tests de localisation et d'interactions

Pour tester l'impact des différentes régions conservées sur la localisation de PdhS chez *B. abortus*, chacun des fragments amplifiés va être fusionné à l'*yfp* au sein d'un plasmide pMR10\_cat\_GW\_yfp. Le pMR10 est un plasmide réplcatif à faible nombre de copies chez *B. abortus* ce qui permet, en général, d'éviter des artefacts de visualisation que peut entraîner la surexpression d'une séquence codante fusionnée à un fluorochrome.

L'interaction des différents fragments avec les 5 partenaires connus de PdhS va être mise en évidence via un test de double hybride en levure. Les 5 interactants connus furent fusionnés au *domaine BD* (domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p) tandis que les fragments furent insérés dans un pVV223 permettant la fusion avec le *domaine AD* (le domaine transactivateur du facteur de transcription Gal4p, permettant le recrutement de la polymérase) ainsi que l'expression et la sélection en levure (voir **matériels et méthodes**). Deux jeux complets de 25 vecteurs doivent donc être générés. Etant donné le nombre de vecteurs à construire et les variations de séquences des 25 fragments, amplifiés par PCR, le système Gateway® a été préféré à une méthode plus classique de restriction-ligation. En effet, il aurait été fastidieux de définir des enzymes de restriction compatible pour l'ensemble des fragments constituant notre banque. La technique Gateway® permet l'insertion de séquences d'intérêt dans différents vecteurs désignés via des réactions BP et LR de recombinaison site spécifique. Les 25 fragments amplifiés, flanqués des sites de recombinaison *attB1* et *attB2*, ont donc d'abord été insérés par réaction BP dans un vecteur d'entrée, un pDONR223. Une fois dans le vecteur d'entrée, les fragments furent transférés par réaction LR dans les deux vecteurs de destination, le pMR10\_cat\_GW\_yfp et le pVV223.

L'utilisation d'une fusion YFP en C-terminal pour tester la localisation de nos fragments chez *B. abortus* n'est pas un choix anodin. La fusion avec un fluorochrome à l'une des extrémités d'une protéine peut parfois occasionner un mauvais repliement de la protéine chimérique, voire perturber la localisation ou la fonction de la protéine pouvant aller jusqu'à générer des défauts morphologiques dans le cas de protéines essentielles. Néanmoins, une fusion C-terminal avec ce fluorochrome a déjà permis d'étudier la localisation de PdhS, sans l'observation de défauts morphologiques, et même d'un fragment de la protéine chez *B. abortus* (Hallez et al., 2007). L'utilisation d'une construction semblable nous permet donc de minimiser les possibilités d'effets délétères et de mauvais repliement de nos fragments chimériques à étudier.

Dans ce même ordre d'idée, l'ajout du *domaine AD* à l'extrémité N-terminale de nos fragments via leur insertion dans le pVV213 semble être la construction minimisant les risques de mauvais repliements des protéines chimériques. En effet, des fusions semblables, et stables, avec PdhS et le fragment<sub>1-613</sub> ont déjà été réalisées au sein du laboratoire (Hallez et al., 2007);. De plus, la fusion avec le domaine AD permet de diminuer le risque de faux positifs par rapport à une fusion fragment-domaine BD.



**b**

	pMR10_cat_fragment-x-yfp		pVV213_fragment-x	
	PCR diagnostique 1	PCR diagnostique 2	PCR diagnostique 1	Restriction
1	X	X	X	
1-2			X	
1-3	X	X	XX	X
1-4	X	X	X	
1-5	X	X	XX	X
1-Kin	X		X	X
2	X	X		
2-3			XX	X
2-5	X	X	XX	X
2-PAS	X	X	X	X
2-Kin	X			
3				
3-4	X	X	X	
3-5	X	X	XX	X
3-PAS			X	
3-Kin	X	X	XX	X
4	X	X	X	
4-5	X	X	X	
4-PAS				
4-Kin	X	X	XX	X
5	X	X		
5-PAS	X	X	X	
PAS	X	X	XX	X
PAS-Kin	X	X	XX	X
Kin	X	X	X	

**Figure 21** : PCR diagnostiques et restrictions permettant de mettre en évidence nos constructions correctes.

(a) amorces utilisées pour les PCR diagnostique des pMR10 et des pVV213.

(b) Tableau illustrant les fragments vérifié par PCR et/ou par restriction. Deux PCR diagnostiques furent utilisées pour vérifier nos vecteurs pour les pMR10\_cat\_fragments-x-yfp. Les X dans le tableau indiquent les fragments présentant une PCR diagnostique positive. Seuls les plasmides positifs pour les deux PCR furent testés pour la localisation des fusions. Dans le cas des pVV213, une PCR et une restriction diagnostique permettait de vérifier nos constructions. Quand nous avons travaillé en pool, les vecteurs ne furent plus vérifiés que par PCR. Les XX illustrent les fragments vérifiés clonalement et en pool.

En effet, il est peu probable qu'un des fragments de PdhS acquière une activité de liaison à l'ADN permettant ainsi l'activation des gènes rapporteurs chez la levure. Les cinq interactants connus de PdhS ont, quant-à-eux, déjà été testés au sein du laboratoire comme n'étant pas autoactivateurs en fusion avec le domaine BD (Johann Mignolet, données non publiées).

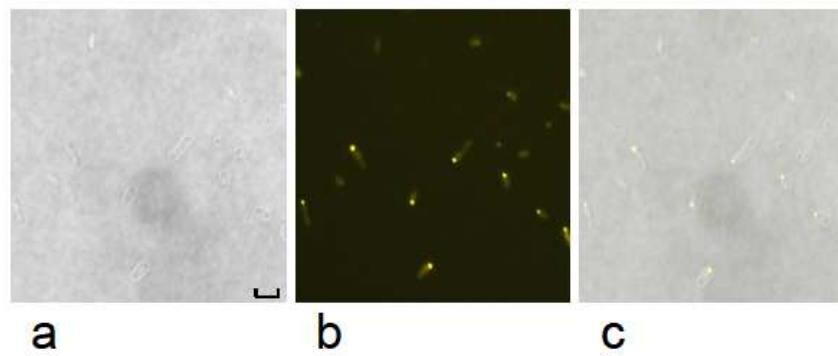
### ▪ Vérification des constructions d'expression

Toutes nos constructions ont été vérifiées par PCR sur colonie. Dans le cas des pVV213, une PCR détectant la présence de la fusion *AD-fragment* ( $F_x$ -*AD*) était réalisée. Une fois, la PCR positive, une vérification par profil de restriction fut réalisée. Pour les constructions en pMR, deux PCR diagnostiques furent effectuées. La première vérifiait la présence de la fusion *fragment-yfp* ( $F_x$ -*yfp*). La deuxième PCR détectait la présence du fragment sur le plasmide (**Figure 21**).

Les constructions furent d'abord vérifiées clonalement c'est-à-dire qu'après réaction LR et transformation des bactéries, la vérification des constructions par PCR et/ou restriction s'effectuait à partir des clones indépendants. La fusion *fragment<sub>1-5</sub>-YFP* et 11 autres fusions avec le *domaine AD* furent obtenues de cette manière. Ensuite, les PCR diagnostiques furent effectuées en *pool*, c'est-à-dire sur un ensemble de clones mélangés. Une PCR diagnostique positive n'exclut donc pas la présence d'une proportion de mauvaises constructions dans nos cultures.

Sur les 25 des 28 fragments de départ, 19 ont été correctement fusionnés à l'YFP et testés pour leur localisation chez *B. abortus* et chez *C. crescentus*. Vingt fragments ont été fusionnés au *domaine AD* et ont été soumis au test double hybride en levure contre les cinq interactants connus de PdhS.





**Figure 22** : Visualisation de la localisation de la fusion protéique Fragment<sub>1-5</sub>-YFP dans une souche *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*

(a) Micrographie en DIC. (b) Micrographie en épifluorescence. (c) Images superposées. Des foci fluorescents polaires sont observés dans la plupart des cellules. Les images ont été prises à partir d'une culture à DO<sub>600</sub> de 0,5. Barre d'échelle, 2µm

## ***Partie II : Recherche du fragment minimum suffisant pour la localisation (FML) polaire de PdhS***

### **▪ Le fragment 1-5 chez *Brucella abortus*: confirmation et surprise**

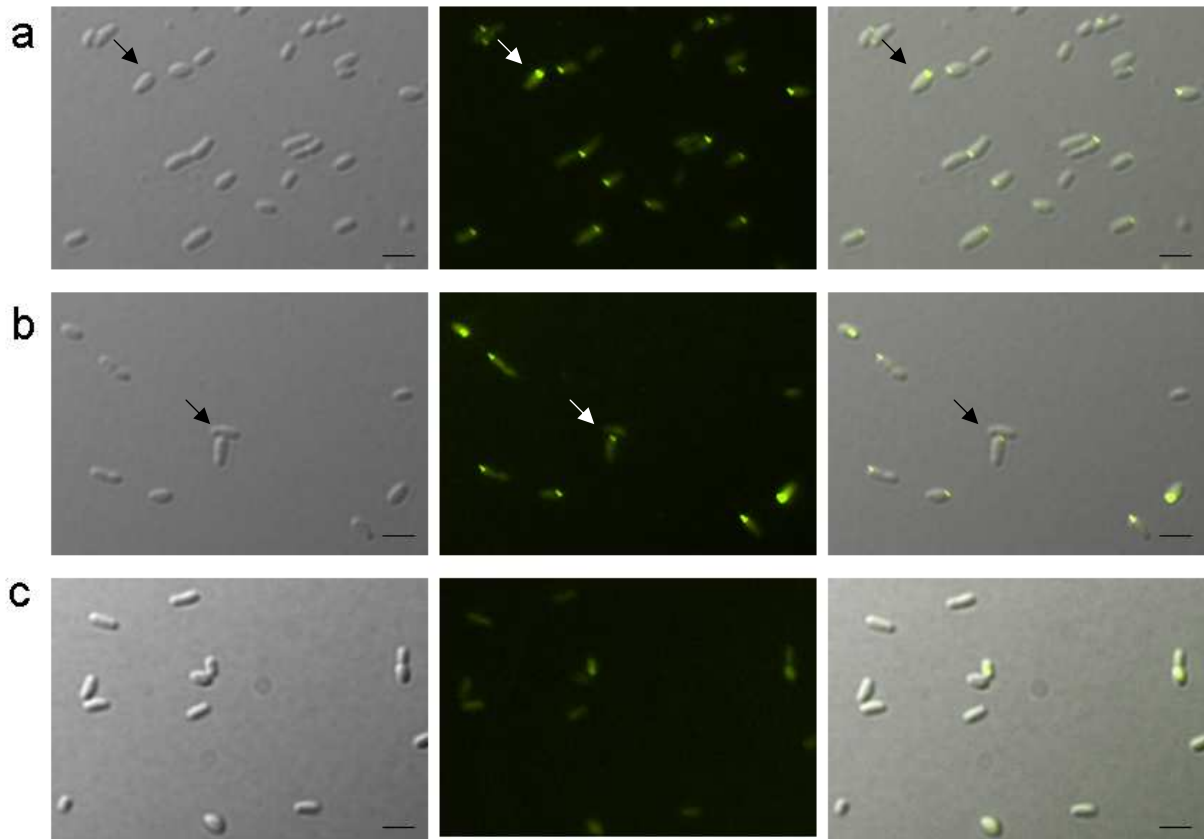
Dans notre quête du fragment minimum capable de localiser au pôle chez *B. abortus*, nous nous sommes d'abord intéressés au fragment<sub>1-5</sub> fusionné à l'YFP. La localisation de ce fragment au pôle de *B. abortus* permettrait de valider notre approche de « conserved fragment delimitation ». En effet, long de 655 résidus à partir de l'extrémité N-terminale, le fragment<sub>1-5</sub> (F<sub>1-5</sub>) correspond au fragment<sub>1-613</sub> de PdhS dont la localisation polaire a été mise en évidence précédemment au sein du laboratoire (Hallez et al., 2007). Le plasmide pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp fut donc introduit par conjugaison dans une souche *B. abortus* 544 (voir **matériels et méthodes**). Des précultures liquides furent ensemencées avec des clones poussant sur milieu sélectif sur boîte de Petri. La veille de l'observation, une culture liquide fut lancée à partir de chaque préculture. Le jour de l'observation, un échantillon de la culture à une DO<sub>600</sub> de 0,5, fut déposé sur *agarose pad* et observé au microscope (voir **matériels et méthodes**). Cette expérience fut reproduite avec trois clones indépendants c'est-à-dire trois colonies isolées sur milieu sélectif sur boîte de Petri après conjugaison.

Des foci fluorescents sont observés au pôle dans plus de 68 % des cellules observées (n= 845), suggérant que le F<sub>1-5</sub> fusionné à l'YFP localise au pôle dans une souche *B. abortus* pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp (**Figure 22**). Cette observation nous permet donc de valider notre approche. En plus de la localisation polaire, la souche présente de nombreux défauts morphologiques qui seront décrits et discutés ultérieurement.

### **▪ Localisation des Fragments de PdhS chez *Brucella abortus***

Sur les 25 fragments amplifiés par PCR, 18 ont pu être testés pour leur localisation polaire chez *B. abortus*. Les six restants n'ont pas pu être fusionnés à l'YFP. C'est le cas du F<sub>1-Kin</sub> (PdhS complet), F<sub>2-Kin</sub>, F<sub>1-2</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>3-PAS</sub> et F<sub>4-PAS</sub>. Les 18 plasmides pMR10\_cat\_fragment-x-yfp furent introduits séparément dans la souche *B. abortus* 544 par conjugaison. Des précultures à partir de clones indépendants poussant sur milieu sélectif sur boîte de Petri furent inoculées. La veille de l'observation, des cultures liquides furent lancées à partir des différentes précultures. Les observations au microscope se sont effectuées sur *agarose pad* à une DO<sub>600</sub> de 0,5.

Puisque le fragment<sub>1-5</sub> a déjà été identifié pour localiser au vieux pôle chez *B. abortus* (Hallez et al., 2007), nous nous sommes d'abord intéressés aux fragments tronqués, coté N-terminal ou C-terminal, d'une partie des fragments composant le F<sub>1-5</sub>.



**Figure 23** : Visualisations des fusions fragments (1-4/1-3/1)-YFP dans les souches *Brucella abortus* 544 *pMR10 cat fragment x-yfp* correspondantes

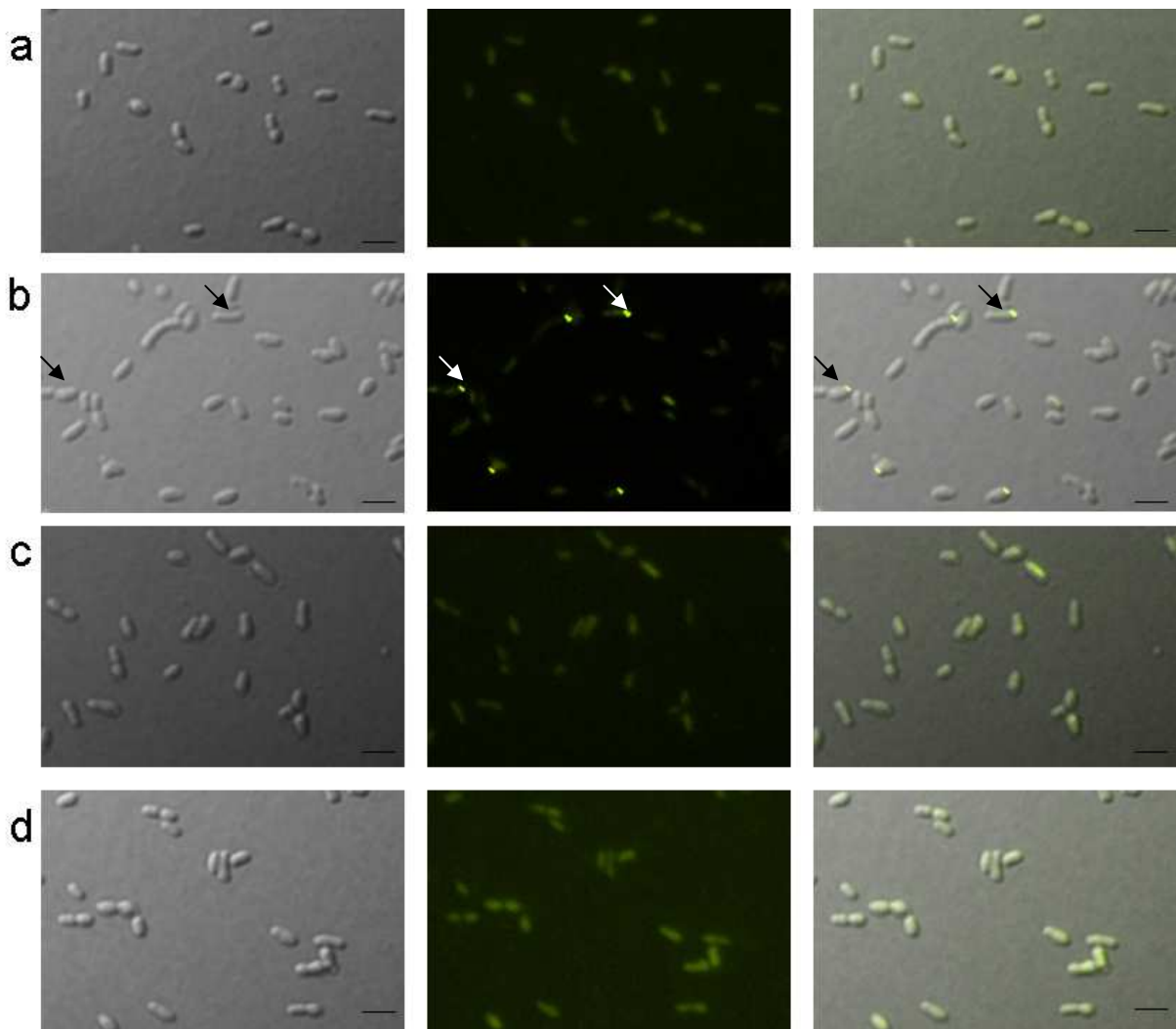
De gauche à droite, micrographie en DIC, épifluorescence et images superposées. Pattern de localisation des (a) fragment<sub>1-4</sub>-YFP, (b) fragment<sub>1-3</sub>-YFP et (c) fragment<sub>1</sub>-YFP. Observations effectuées à DO<sub>600</sub> de 0,5. Barre d'échelle, 2µm

Les flèches indiquent les cellules présentant des foci fluorescents polaire. Aucun foci polaire n'a été obs

Localisation des Fragments 1-4, 1-3 et 1 fusionnés à l'YFP chez *Brucella abortus*

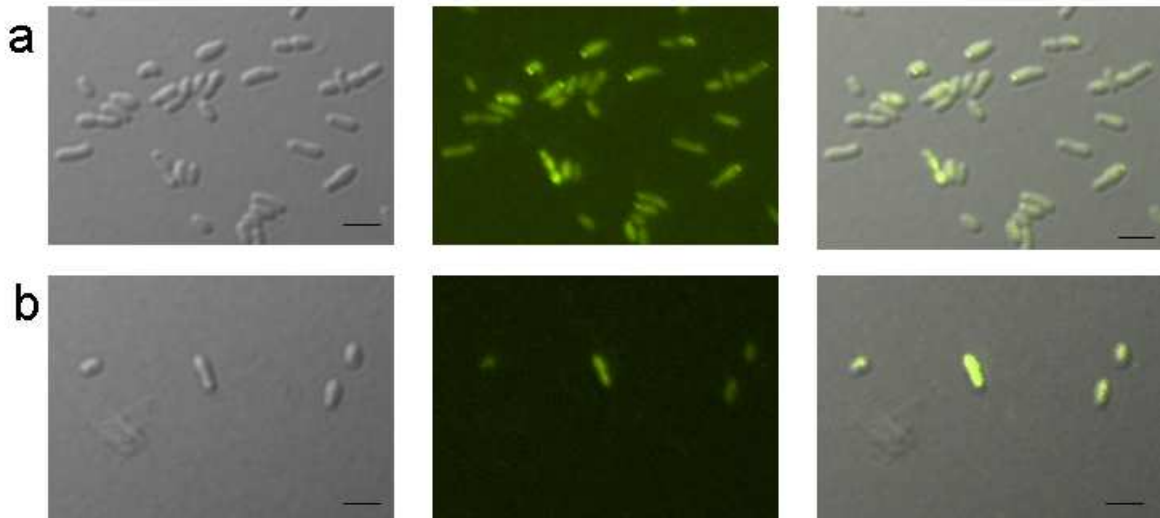
Les fragments tronqués du côté C-terminal à partir du F-5 furent étudiés en premier lieu, c'est-à-dire les F<sub>1-4</sub>, F<sub>1-3</sub> et F<sub>1</sub>, la fusion fragment<sub>1-2</sub>-YFP n'ayant pas pu être produite (**Figure 23**).

Des foci fluorescents polaires sont observés dans les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-4</sub>-yfp* (65% des cellules avec n= 873) et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-3</sub>-yfp* (64% des cellules avec n= 304) suggérant que ces fusions localisent au pôle de la cellule. Par contre, aucun focus fluorescent polaire n'a été observé dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1</sub>-YFP* (n= 458). Ces observations seront analysées dans la partie **Discussion** de ce travail.



**Figure 24** : Visualisations des fusions fragments (2-5/3-5/4-5/5)-YFP dans les souches *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment x-yfp* correspondantes.

De gauche à droite, micrographie en DIC, épifluorescence et images superposées. Pattern de localisation des (a) fragment<sub>2-5</sub>-YFP, (b) fragment<sub>3-5</sub>-YFP, (c) fragment<sub>4-5</sub>-YFP et (d) fragment<sub>5</sub>-YFP dans leur souche respective. Observations effectuées à DO<sub>600</sub> de 0,5. Barre d'échelle, 2µm. Seule la souche *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment<sub>3-5</sub>-yfp* présente des foci fluorescents polaires nets, comme indiqué par les flèches. De rare foci fluorescent polaire diffus ont pu être observé dans le cas du fragment<sub>2-5</sub> (1% des cellules).



**Figure 25:** Visualisations des fusions  $F_{2-PAS}$ -YFP et  $F_{5-PAS}$ -YFP dans les souches *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment x-yfp* correspondantes.

De gauche à droite, micrographie en DIC, épifluorescence et images superposées. Pattern de localisation des (a)  $F_{2-PAS}$ -YFP, (b)  $F_{5-PAS}$ -YFP. La souche exprimant le *fragment<sub>2-PAS</sub>-yfp* présente des foci fluorescents polaires tandis que la souche *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment<sub>5-PAS</sub>-yfp* illustre un pattern d'absence de localisation aussi observé pour d'autres fragments (voir texte). Observations effectuées à  $DO_{600}$  de 0,5. Barre d'échelle, 2 $\mu$ m

### **Localisation des fragments 2-5, 3-5, 4-5 et 5 fusionnés à l'YFP chez *Brucella abortus***

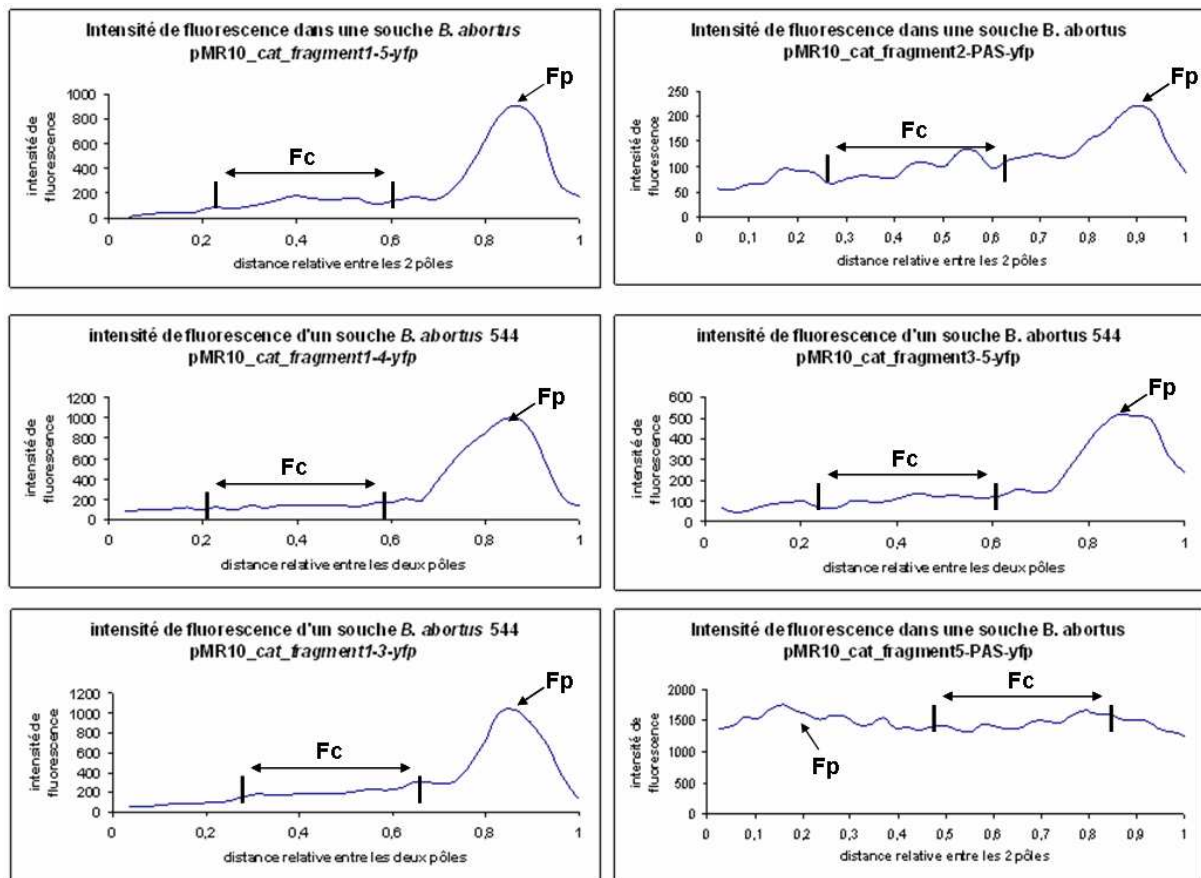
Nous nous sommes ensuite intéressés aux protéines tronquées, à partir du côté N-terminal, des domaines structuraux présents dans le fragment<sub>1-5</sub>, c'est-à-dire les fragments F<sub>2-5</sub>, F<sub>3-5</sub>, F<sub>4-5</sub> et F-5 (**Figure 24**).

Des foci fluorescents polaires furent uniquement observés dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment3-5-yfp* (8,6% des cellules avec n= 722), suggérant une localisation au pôle de cette fusion. Toutes les autres souches ne présentent aucun focus fluorescent à l'exception de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment2-5-yfp* pour laquelle de très rares cellules, moins de 1% (n= 742) présentent des foci fluorescents polaires. De plus une variation dans l'intensité des foci polaires fut observée, la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment3-5-yfp* présentant une intensité lumineuse plus faible par rapport aux autres souches présentant une localisation polaire (voir partie intensité de fluorescence plus bas). Ces différentes données seront également débattues dans la partie **Discussion**.

### **Autres localisations**

En dehors de ces fragments raccourcis sur base du fragment<sub>1-5</sub>, les autres fragments furent finalement testés pour leur localisation chez *B. abortus*. Seule une autre souche, la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment2-PAS-yfp* (17% des cellules avec n= 788), présente des foci fluorescents au pôle suggérant une localisation polaire de la fusion fragment<sub>2-PAS</sub>-YFP. Néanmoins, cette souche présente un niveau basal de fluorescence relativement élevé par rapport aux autres souches présentant un pattern de localisation (**Figure 25**).

Dans le cas des fragments F<sub>2-3</sub>, F-1, F<sub>2-5</sub>, F<sub>3-4</sub>, F<sub>3-Kin</sub>, F<sub>4-5</sub>, F<sub>4-Kin</sub>, F-4, F<sub>5-PAS</sub>, F-5, F-Kin, F<sub>PAS-Kin</sub>, F-PAS, fusionné à l'YFP aucun focus fluorescent polaire ne fut observé dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment-x-yfp*, environ 350 cellules furent observées pour chacune des souches. Le pattern de fluorescence de l'YFP de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment5-PAS-yfp* présenté dans la **Figure 25**, illustre le profil de fluorescence des souches ne présentant pas de focus fluorescent. Les différents résultats de localisations seront développés plus loin.



	<b>F<sub>1-5</sub>-YFP</b>	<b>F<sub>1-4</sub>-YFP</b>	<b>F<sub>1-3</sub>-YFP</b>	<b>F<sub>2-PAS</sub>-YFP</b>	<b>F<sub>3-5</sub>-YFP</b>	<b>F<sub>5-PAS</sub>-YFP</b>
Fp moyen	1025,4	924,3	690	287,1	406,3	1725,5
Fc moyen	84,2	82,7	79,8	102,4	67	1545
<b>Fp/Fc</b>	11,5	11	9,4	2,8	5,9	1,1

**Figure 26** : variation de l'intensité fluorescente dans les différentes souches *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment x-yfp* présentant des foci polaires.

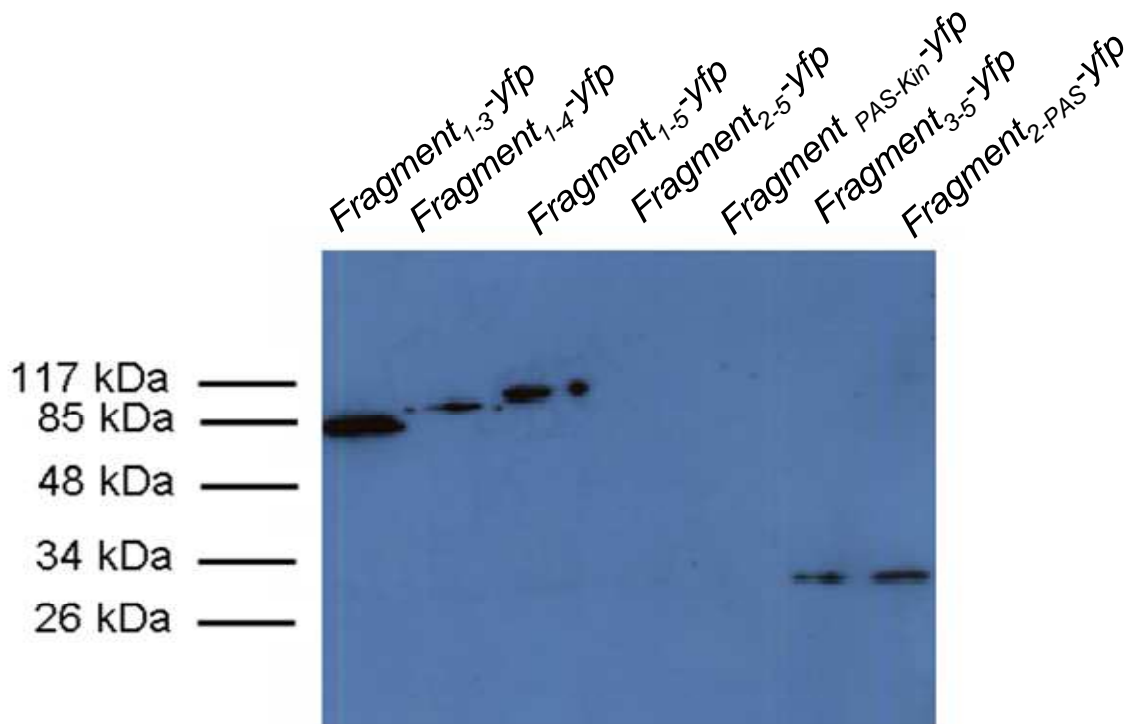
Pour les différents fragments présentant un profil de localisation polaire, l'intensité fluorescente fut mesurée en unité relative, à travers la cellule. La distance 1 correspond au pôle présentant la localisation tandis que 0 correspond au pôle opposé. Les différents fragments localisant présentent un profil de fluorescence comparable malgré les échelles différentes. Le fragment 5-PAS-YFP illustre un profil d'absence de localisation polaire et sert de référence, dans ce cas, l'orientation de la cellule 0 → 1 est arbitraire.

Le tableau résume les différentes mesures pour chaque souche et la valeur **Fp/Fc**.

**Variation de l'intensité de fluorescence :**

Une variation de l'intensité du signal fluorescent a été observée entre les différentes souches présentant des foci polaires ( $F_{1-5}$ ,  $F_{1-4}$ ,  $F_{1-3}$ ,  $F_{3-5}$  et  $F_{2-PAS}$ ). Afin de déterminer si ces variations n'étaient pas des artefacts visuels et pouvaient refléter un processus biologique, nous avons décidé de quantifier ces observations. Pour chacune des cinq souches *B. abortus* 544 présentant des foci fluorescents, une droite hypothétique fut tracée à travers les cellules reliant un pôle à l'autre. L'intensité de fluorescence fut mesurée le long de cette droite et rapportée sur un graphique (**Figure 26**). A ces valeurs fut soustraite l'intensité moyenne observée en dehors des cellules, permettant de supprimer le bruit résultant de l'autofluorescence du milieu. Pour chaque cellule étudiée, Fp fut défini comme le pic de fluorescence maximal observé dans la cellule. Fc fut défini comme étant la fluorescence basale présente dans le reste de la cellule. Il fut calculé en prenant la valeur moyenne de cinq intensités de fluorescences mesurées le long de la droite, partout ailleurs qu'au pic Fp. Le rapport Fp/Fc fut calculé pour chaque cellule (**Figure 26**). Une moyenne des Fp/Fc calculés fut réalisée pour chaque souche présentant des foci polaires. Ce rapport nous permet de comparer l'intensité de fluorescence entre les souches en éliminant l'effet résultant du nombre variable de copies de *pMR10\_cat\_fragment-x-yfp* dans les cellules. Ainsi, les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-4</sub>-yfp* et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-3</sub>-yfp* présentent un Fp/Fc semblable, respectivement 11,49; 10,96 ; 9,41 (**Figure 26**). Ces rapports reflètent une localisation importante au sein des cellules. Par contre, le rapport Fp/Fc est nettement inférieur pour une souche exprimant le *F<sub>3-5</sub>-yfp* (5,95) ou le *F<sub>2-PAS</sub>-yfp* (2,06). Le rapport Fp/Fc fut également établi pour la souche *pMR10\_cat\_fragment<sub>5-PAS</sub>-yfp* qui ne présente pas un profil de localisation. Ce rapport, de 1,1, illustre bien une absence de foci fluorescent polaire dans le cas du  $F_{5-PAS}$ -YFP. On peut également remarquer que le Fc de cette souche est nettement supérieur à celui des cellules présentant une localisation. Ce fragment fusionné à l'YFP ne présentant pas un profil de localisation chez *B. abortus*, il est normal d'observer un niveau de fluorescence basale plus élevé partout dans la cellule puisqu'il n'y a pas de recrutement au pôle. Ces résultats seront analysés dans la partie **Discussion** du mémoire.





**Figure 27** : western blot à partir des différentes souches *Brucella abortus* 544 présentant un pattern de localisation polaire

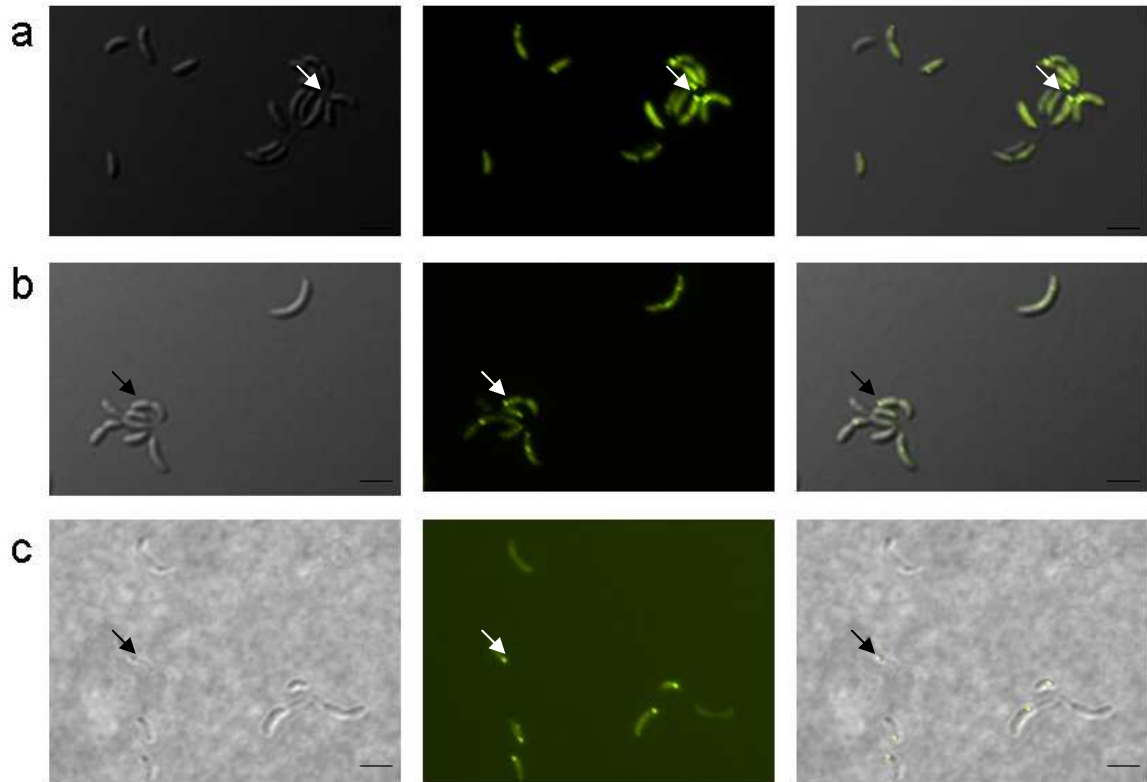
Un western blot sur les fragments présentant des profils de localisation polaire dans leur souche correspondante avec un anticorps dirigé contre L'YFP a été réalisé. Les bandes des puits des F<sub>1-3</sub>, F<sub>1-4</sub> et F<sub>1-5</sub> fusionnés à l'YFP correspondent à la taille attendue. Par contre, dans le puits du F<sub>3-5</sub>-YFP, F<sub>2-PAS</sub>-YFP, des bandes correspondant à la taille de l'YFP seul ont été observé.

### **Stabilité des fusions protéiques**

L'absence de foci fluorescents polaires dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment-x-yfp* n'indique pas nécessairement que le fragment en question n'est pas impliqué dans la localisation de PdhS. Différentes explications peuvent être avancées pour justifier une absence de localisation comme un mauvais repliement ou une instabilité de la protéine de fusion. Pour mettre en avant la stabilité de nos fusions dans les souches *B. abortus* 544 présentant des foci polaires, un western blot fut réalisé (voir **matériels et méthodes**). Les extraits protéiques utilisés pour le western blot furent observés à partir de cultures de *B. abortus* présentant une  $DO_{600}$  de 1,0. Des cultures liquides furent inoculées à partir de clones observés en fluorescence. L'anticorps primaire utilisé pour l'étape de révélation est un anticorps dirigé contre l'YFP, permettant l'observation de nos fusions protéiques stables. L'anticorps secondaire est couplé à la peroxidase permettant la révélation.

Les fragments présentant une localisation polaire ont été soumis prioritairement à un western blot (**Figure 27**). Toutes les bandes correspondant aux fusions de nos fragments avec l'YFP ne sont pas visibles. Néanmoins, une bande est présente dans chaque piste correspondant aux fragments  $F_{1-3}$ ,  $F_{1-4}$  et  $F_{1-5}$  fusionné à l'YFP. Sur base des marqueurs de poids moléculaires, ces bandes correspondent à la taille attendue pour chacune des fusions fragment-YFP. Ces résultats préliminaires confirment donc partiellement certaines de nos constructions et mettent en évidence la production de protéines chimériques stables. Dans les puits correspondant au  $fragment_{3-5}$ -YFP et au  $fragment_{2-PAS}$ -YFP des bandes de la taille de l'YFP seule sont visibles suggérant une instabilité et/ou une protéolyse de ces fragments. Les données de western blot, en étroite relation avec les variations d'intensités fluorescences seront évoquées plus loin dans la **Discussion**.

Nous avons donc pu mettre en évidence la localisation polaire du  $F_{1-3}$ ,  $F_{1-4}$ ,  $F_{1-5}$  fusionnés à l'YFP et une localisation partielle du  $F_{2-PAS}$ -YFP et  $F_{3-5}$ -YFP chez *B. abortus*. La localisation polaire du  $fragment_{2-5}$  reste à confirmer étant donné le faible pourcentage de cellules présentant des foci polaires. Un western blot a permis de détecter la présence des fusions  $F_{1-3}$ -YFP,  $F_{1-4}$ -YFP,  $F_{1-5}$ -YFP et a mis en évidence la présence de l'YFP seule pour les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment\_{3-5-yfp}* et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment\_{2-PAS-yfp}*. Ces données, en lien direct avec la variation de l'intensité des foci polaires fluorescents entre les différentes souches, seront débattues plus en détail dans la partie **Discussion** du travail.



**Figure 28** : Visualisations des fusions fragments (1-5/1-4/1-3)-YFP dans leur souche *Caulobacter crescentus* CB15N pMR10 cat fragment x-yfp.

De gauche à droite, micrographie en DIC, épifluorescence et images superposées. Pattern de localisation des (a) fragment<sub>1-5</sub>-YFP, (b) fragment<sub>1-4</sub>-YFP, (c) fragment<sub>1-3</sub>-YFP dans leur souche correspondante. Des foci fluorescents sont visibles au pôle pédonculé indiquant un recrutement au vieux pôle chez *C. crescentus*. Les flèches indiquent les foci fluorescents polaire au sein des cellules. Observations effectuées à DO<sub>600</sub> de 0,5. Barre d'échelle, 2µm

### ▪ Localisation chez *Caulobacter crescentus*

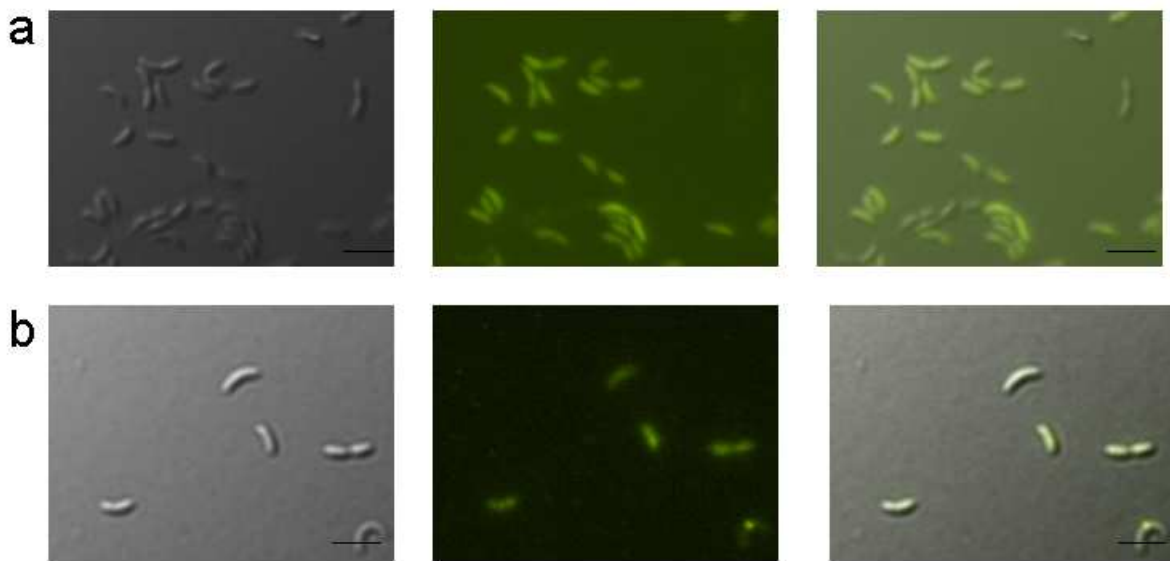
L'implication de différents fragments dans la localisation de PdhS a donc pu être mise en évidence chez *B. abortus*. Néanmoins, PdhS étant essentiel chez cette bactérie, cette étude ne nous permet pas de différencier les fragments impliqués dans le recrutement par le PdhS endogène, des fragments directement liés à la localisation polaires de la protéine. En effet, une localisation polaire d'une fusion dans une souche  $\Delta pdhS$  serait indicative d'une localisation indépendante d'un recrutement par les PdhS endogènes. Ainsi, l'expression des différents fragments fusionnés à l'YFP chez une bactérie comme *C. crescentus*, dépourvue d'homologue proche de PdhS mais possédant les acteurs impliqués dans la régulation de CtrA, pourrait nous apporter des informations supplémentaires sur la caractérisation du fragment minimum nécessaire à la localisation polaire de PdhS (cfr **introduction**). De plus, une localisation au pôle pédonculé de PdhS et du fragment<sub>1-613</sub> fusionné à l'YFP a déjà été mise en évidence chez *C. crescentus* (Hallez et al., 2007).

Les 19 plasmides pMR10\_cat\_fragment-x-yfp furent donc introduits dans une souche *Caulobacter crescentus* CB15N par conjugaison. Ensuite, comme pour *B. abortus*, des précultures liquides furent inoculées à partir de trois clones indépendants de chaque souche de *C. crescentus* CB15N transformée poussant sur milieu sélectif sur boîte de Petri. La veille de l'observation, des cultures liquides furent lancées à partir des précultures. Les observations au microscope se sont effectuées sur *agarose pad* à une DO<sub>600</sub> de 0,5. L'expérience a été répétée trois fois.

Les souches *Caulobacter crescentus* CB15N pMR10\_cat\_fragment<sub>(1-3/1-4/1-5)</sub>-yfp présentent des foci polaires suggérant donc que ces fusions localisent au pôle chez *Caulobacter crescentus* (**Figure 28**). Dans la plupart des cellules, les foci fluorescents localisent uniquement au pôle pédonculé mais une localisation simultanée aux deux pôles a également été observée dans beaucoup de cellules prédivisionnelles de la souche exprimant le fragment<sub>1-5</sub>.

Le F<sub>2-PAS</sub>-YFP et F<sub>3-5</sub>-YFP, localisant chez *B. abortus*, ne présentent aucun focus fluorescent polaire, tout comme les fusions F<sub>2-3</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2-5</sub>, F<sub>3-4</sub>, F<sub>3-5</sub>, F<sub>3-Kin</sub>, F<sub>4-5</sub>, F<sub>4-Kin</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5-PAS</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>Kin</sub>, F<sub>PAS-Kin</sub> et F<sub>PAS</sub>-YFP chez *C. crescentus*. Ces souches présentaient un pattern de fluorescence similaire à celui de *C. crescentus* CB15N pMR10\_cat\_fragment<sub>5-PAS</sub>-yfp illustré ci-contre (**Figure 29**).

Le tableau ci-dessous résume les observations concernant la localisation chez *C. crescentus* (**Table 1**). Les différentes données de localisation seront discutées et recoupées plus loin, dans la **Discussion**.



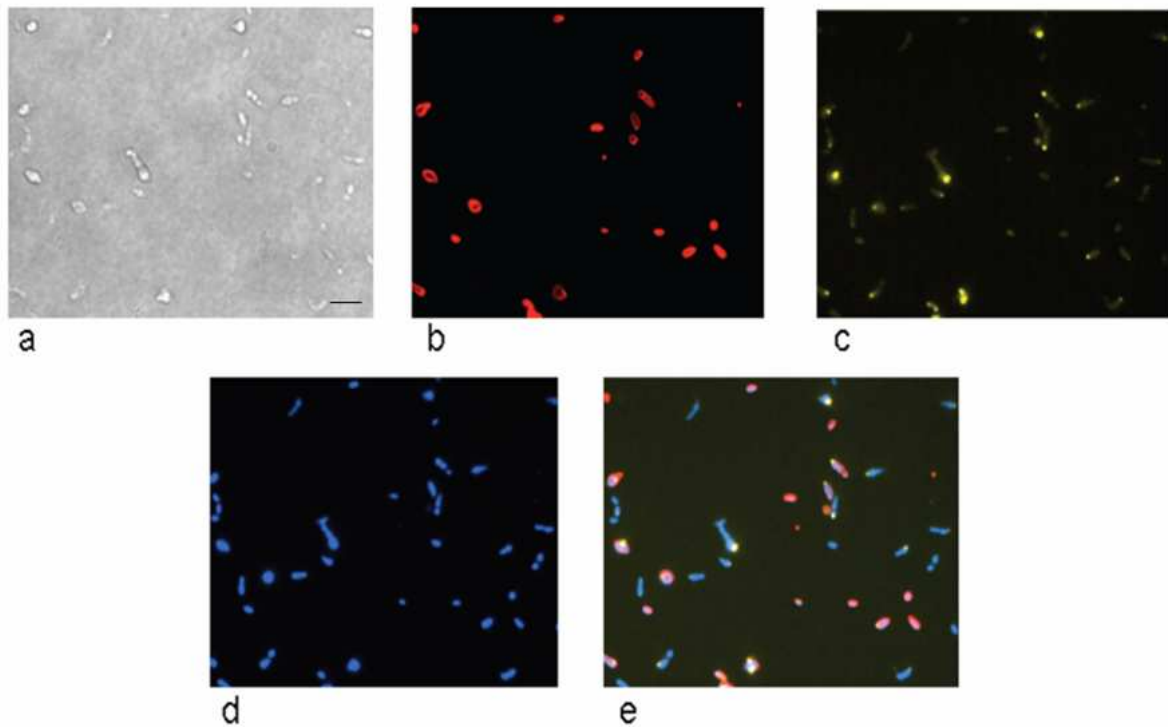
**Figure 29** : Visualisations des fusions fragments (2-PAS/5-PAS)-YFP dans leur souche *Caulobacter crescentus* CB15N *pMR10 cat fragment x-yfp*.

De gauche à droite, micrographie en DIC, épifluorescence et images superposées. Pattern de localisation des (a) fragment<sub>2-PAS</sub>-YFP, (b) fragment<sub>5-PAS</sub>-YFP dans leur souche respective. Le pattern de localisation de la souche *Caulobacter crescentus* CB15N *pMR10\_cat\_fragment5-PAS-yfp* illustre un pattern d'absence de localisation polaire aussi observé pour d'autres fragments (voir texte). Observations effectuées à  $DO_{600}$  de 0,5. Barre d'échelle, 2 $\mu$ m.

	Foci polaire chez <i>B.</i> <i>abortus</i>	Foci polaire chez <i>C.</i> <i>crenscentus</i>	Détection en western blot chez <i>B. abortus</i>	Intensité des foci fluorescents chez <i>B. abortus</i>	Présence d'AM chez <i>B. abortus</i>
F <sub>1-5</sub>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	+++	<b>X</b>
F <sub>1-4</sub>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	+++	
F <sub>1-3</sub>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	+++	
F <sub>2-5</sub>	?			?	?
F <sub>2-PAS</sub>	<b>X</b>		-	+	
F <sub>3-5</sub>	<b>X</b>		-	++	<b>X</b>

**Table 1** : Tableau résumant les observations des fragments fusionnés à l'YFP présentant une localisation chez *B. abortus* et chez *C. crescentus*.

Ce tableau résume les différents résultats en rapport avec la localisation des différents fragments fusionnés à l'YFP. Les X signifient une observation positive c'est-à-dire, la présence de foci polaire en fluorescence, une bande à la taille attendue en western blot ou l'observation de cellules AM. Les - indiquent l'observation d'une bande en western blot ne correspondant pas à la taille prévue. Les + représentent l'intensité de fluorescence des foci polaires (illustré par le rapport Fp/Fc) observés chez *B. abortus* (+++ = Fp/Fc de l'ordre de 10, ++ de l'ordre de 5, + = Fp/Fc au environ de 2). Les données obtenues pour le F<sub>2-5</sub>, illustrées par un ?, ne nous permettent pas de déduire une localisation polaire du fragment fusionné à l'YFP ou la présence de cellules AM dans cette souche.



**Figure 30** : Marquages mettant en évidence les phénotypes d'aberrations morphologique de la souche *Brucella abortus* 544 *pMR10 cat fragment<sub>1-5</sub>-yfp*.

L'expression du *fragment<sub>1-5</sub>-yfp* perturbe la régulation du cycle cellulaire. (a) micrographie en DIC, (b) marquage DAPI, (c) marquage au FM4-64® et (d) images superposées. Observations effectuées à DO<sub>600</sub> de 0,5. Barre d'échelle, 2µm

### **Partie III : Impact des fragments de *PdhS* sur la morphologie et le cycle cellulaire de *Brucella abortus*.**

#### **▪ Morphologies aberrantes dans une souche *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp***

En plus des foci fluorescents polaires, une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* présente d'importants défauts morphologiques par rapport à une souche sauvage (**Figure 30**). De plus, une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_pdhS-yfp* ne présente pas de telles aberrations morphologiques (AM). Par contre le phénotype d'une souche *B. abortus* 544 *pBB\_pdhS*, surexprimant *pdhS* est très similaire à celui de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, chez laquelle près de 35% des cellules (n=1262) souffrent de défauts morphologiques. Différents marquages en fluorescence ont donc été effectués pour caractériser ces aberrations morphologiques (AM) (**Figure 30 et 31**).

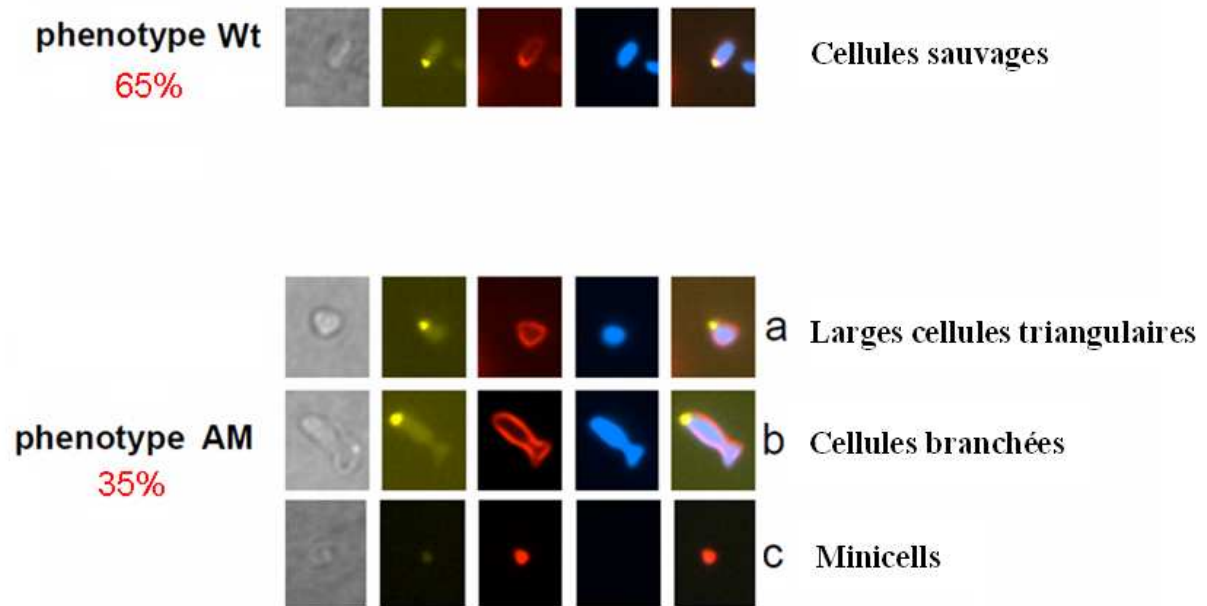
Tout d'abord, des foci polaires fluorescents ont été observés dans la plupart des cellules (67 % n= 452) AM suggérant la localisation polaire dans la plupart de ces cellules, à l'exception des minicells ne présentant aucun focus fluorescent. Ensuite, un marquage DAPI, révélant l'ADN fut réalisé afin de mettre en évidence la répartition du matériel génétique dans les cellules (Kubista et al., 1987). L'ADN semble réparti de manière uniforme dans toutes les cellules sauf dans les minicells qui sont non marquées par le DAPI. Cette absence de marquage suggère que ces cellules AM ne contiennent pas de matériel génétique. Enfin nous avons réalisé un marquage au FM4-64®, afin de définir la morphologie exacte de ces cellules AM (Molecular Probes™, Invitrogen). Ce composé lipophile semble s'insérer en membrane externe où il devient fluorescent (Sharp and Pogliano, 1999). Ce fluorochrome semble marquer plus faiblement, voire pas du tout, les cellules AM. De plus, en membrane, l'intensité de la fluorescence est inégale, des foci fluorescents apparaissant parfois localement (**Figure 30 et 31**).

Sur base de ces marquages, à côté des cellules présentant un phénotype sauvage, différentes classes de phénotypes d'altérations morphologiques furent définies (**Figure 31**) :

- Les cellules branchées, présentant d'un côté un dédoublement polaire.
- Les cellules gonflées et triangulaires.
- Les « minicells » correspondant à des petites cellules de moins de 0,5µm. Elles ne contiennent pas d'ADN et ne présentent jamais de signaux de foci fluorescents.

Parmi ces 35% de cellules AM (n=1262), les phénotypes les plus caractéristiques sont les minicells (17% des cellules AM) et les cellules branchées (9 %). De plus, dans une souche *B. abortus* 544 sauvage ou portant le *pMR10\_cat\_PdhS-YFP*, aucune minicell n'est observée et les cellules branchées représentent moins de 1% des cellules (n= 732). Néanmoins, le phénotype d'aberrations morphologiques de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* est très similaire à celui d'une souche *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS* qui présente une proportion similaire de cellules branchées et de minicells.



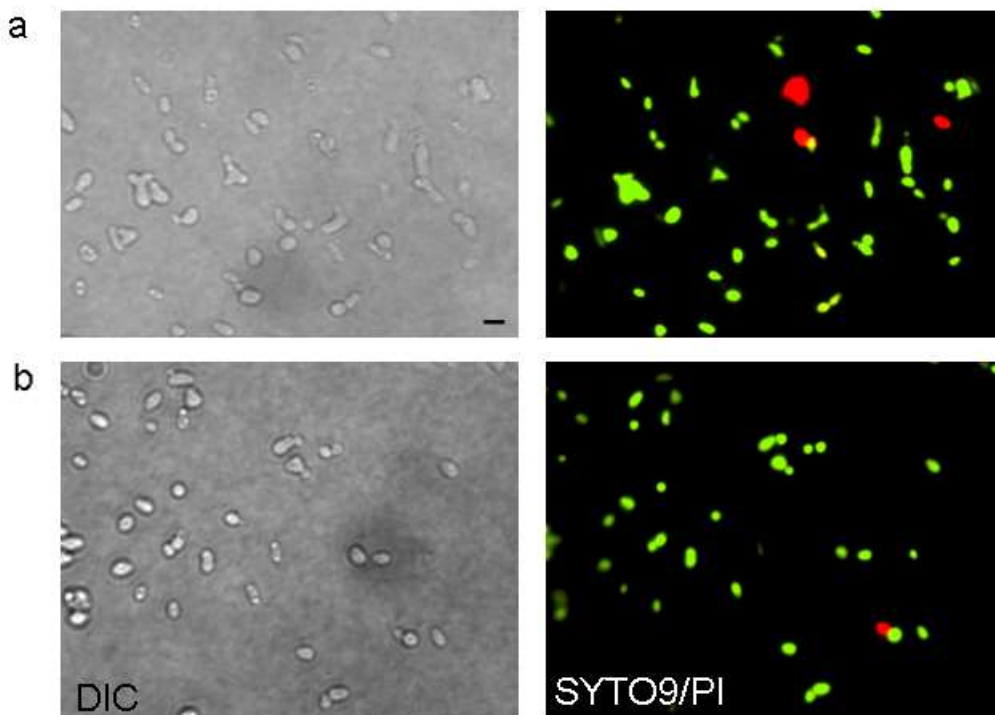


**Figure 31** : Caractérisation des phénotypes d'AM dans la souche *Brucella abortus* 544 *pMR10 cat fragment1-5-yfp*.

Sur base du phénotype WT nous avons défini 4 catégories de cellules AM : **(a)** les cellules sphériques et triangulaires, **(b)** les cellules branchées et **(c)** les minicells. Pour chaque catégorie, le phénotype a été caractérisé via différents marquage (de droite à gauche : DIC, localisation de la fusion fragment1-5-YFP, marquage au FM4-64®, Marquage DAPI® et images superposées)

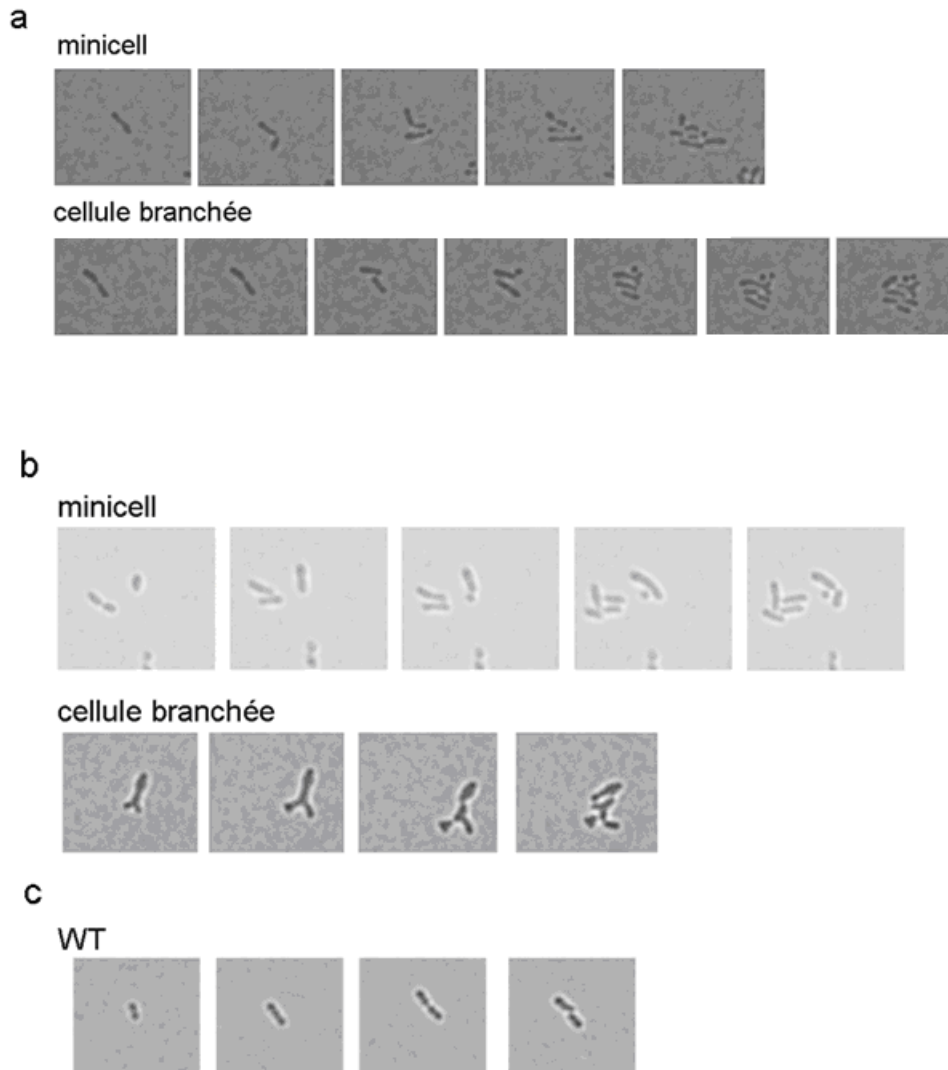
Afin de mettre en évidence un lien éventuel entre la morphologie aberrante et la viabilité cellulaire dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, un test Live/Dead® a été réalisé (Molecular Probes™, Invitrogen). Ce test utilise les propriétés différentes de deux composés marquant l'ADN, l'iodure de propidium (PI) et le SYTO 9®. En effet, dans une population bactérienne, le SYTO 9®, émettant dans le vert, marque l'ADN de toutes les cellules tandis que le PI, émettant dans le rouge, ne pénètre et ne s'intercale que dans l'ADN des cellules avec des dommages membranaires, c'est-à-dire les cellules mortes. Dans ces cellules, une compétition entre les deux marqueurs va induire une diminution de l'intensité du marquage fluorescent vert en faveur du PI. Ce marquage différentiel permet ainsi de distinguer les cellules vivantes (en vert) des cellules mortes (en rouge) (**Figure 32**).

La plupart des cellules sont marquées uniquement au SYTO 9® dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment 1-5-yfp* suggérant que les cellules AM sont toujours vivantes. Les minicells ne furent marquées par aucun des deux agents intercalant confirmant les données du DAPI suggérant l'absence d'ADN dans ces cellules. Le pourcentage de cellules mortes, moins de 1%, dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* (n= 375), est similaire à une souche *B. abortus* 544 sauvage (n= 228).



**Figure 32** : Visualisation d'un test Live/Dead® sur les souches *Brucella abortus* 544 *pMR10 cat fragment<sub>1-5</sub>-yfp*.et *Brucella abortus* 544 sauvage.

(a) souche exprimant le *fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, (b) Souche sauvage. Le SYTO 9® marque l'ADN de toutes les cellules en vert. L'iodure de propidium marque uniquement les cellules mortes en rouge. Observations effectuées à  $DO_{600}$  de 0,5. Scale bar, 2 $\mu$ m.



**Figure 33** : Observations times-lapse des souches *B. abortus* 544 *pMR10 cat fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et *B. abortus* 544 WT.

Nous avons effectué des observations en times lapse afin de mettre en évidence un cycle d'apparition des cellules AM. **(a)** *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS*. **(b)** *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* et **(c)** *B. abortus* 544 WT. Le phénotype de la souche de surexpression de *pdhS* et celui de la souche exprimant le *F<sub>1-5</sub>-yfp* est identique.

Les minicells peuvent apparaître à partir d'une cellule au phénotype sauvage mais aussi à partir d'une cellule branchée.

Une cellule branchée est générée à partir d'une cellule sauvage et le dédoublement de pôle ainsi que la croissance de ces deux pôles sont simultanées. Une cellule branchée se divise en trois endroits générant quatre cellules. Trois des quatre cellules semblent pouvoir toujours croître et se diviser tandis que la cellule centrale semble avoir perdu ces capacités.

## ▪ Cycle d'apparition des cellules AM

Le test Live/Dead® marquant la plupart des cellules AM comme vivantes, leur apparition ne semble donc pas conduire irrévocablement à la mort de la bactérie. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les cellules AM s'inscrivaient dans un cycle cellulaire altéré du à la surexpression du *fragment<sub>1-5</sub>-yfp*. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de *time-lapse* (voir **matériels et méthodes**) furent réalisées sur différentes souches :

- *B. abortus* 544 sauvage,
- *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*,
- *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS*.

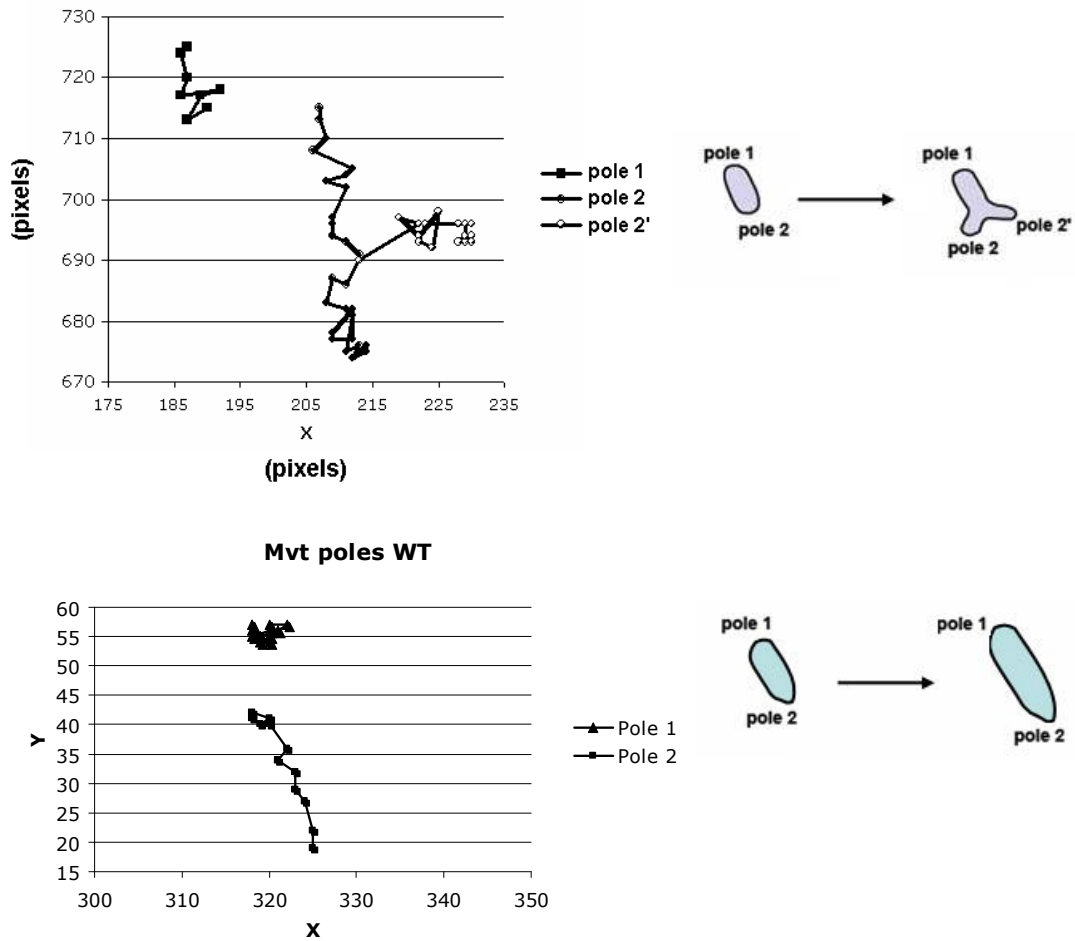
Un *time-lapse* consiste à observer au microscope des bactéries séparées en croissance, permettant de voir une ou plusieurs divisions cellulaires. Une préculture liquide des différentes souches a été inoculée à partir d'un clone isolé poussant sur boîte de Petri. Le matin de l'expérience, une culture a été lancée à partir de la préculture. Un échantillon de la culture bactérienne à  $DO_{600}$  de 0,5 est déposé sur un *agarose pad* spécial pour *time-lapse* (voir **matériels et méthodes**) permettant l'observation et la croissance de la bactérie. Une photo a été prise toutes les dix minutes pendant vingt heures. Pour chacune des trois souches, l'expérience a été répétée trois fois à partir de clones indépendants.

Les expériences de *time-lapse* ont pu mettre en évidence un cycle dans l'apparition des cellules AM. Les minicells apparaissent de différentes façons :

- Dans une cellule branchée, une minicell peut être formée à partir de n'importe quel pôle mais la plupart du temps, ces divisions ont lieu du côté du pôle dédoublé.
- Des minicells peuvent aussi être générées à partir de cellules présentant un phénotype sauvage (**Figure 33**).

Une cellule branchée dérive généralement d'une cellule au phénotype sauvage. Elle commence par croître normalement, puis le dédoublement de pôle apparaît. Ces deux pôles croissent toujours simultanément, tandis que le pôle opposé ne présente pas de croissance visible. Malheureusement, nous avons été incapables de tester la localisation dynamique des différents fragments fusionnés à l'YFP au cours du cycle cellulaire. En effet, une fois soumises à la fluorescence, les souches s'arrêtent de croître. Néanmoins, les images en fluorescence obtenues par simple observation des souches à une  $DO_{600}$  de 0,5 nous ont permis de visualiser les différents états cellulaires indépendamment du cycle. Ainsi, les foci fluorescents polaires dans les cellules branchées d'une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* (**Figure 31**) se retrouvent, la plupart du temps, à la base du Y des cellules branchées (86%, n= 42) et très rarement dans une des deux ramifications suggérant que le vieux pôle, où localise PdhS, ne subit pas de dédoublement (**Figure 33**).

Une cellule branchée se divise généralement en trois, une fois au niveau de la base du Y, et deux autres fois, simultanément, dans chacune des ramifications. Suivant le placement de l'endroit de septation, il semble que, dans une cellule branchée, les différentes divisions peuvent générer des cellules vivantes ou des minicells. Néanmoins, dans tous les cas observés, la cellule centrale à l'aspect triangulaire, résultant de ces trois divisions, n'entre jamais dans un nouveau cycle cellulaire.



**Figure 34:** Graphique représentant la position des deux pôles dans une cellule en croissance exprimant le fragment1-5-YFP.

La position de chaque pôle a été définie en X et Y pendant une expérience de Time-lapse. Les deux pôles de la cellule ont été numéroté 1 et 2, le pôle 2 se dupliquant donnant naissance aux pôles 2 et 2'. Une mesure à été prise toutes les 10 minutes pendant 20h. La position est notée en pixels.

### ▪ Fragment minimum d'altération morphologique (FMAM) :

Une fois les phénotypes de cellules AM de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* caractérisés, nous nous sommes demandés si d'autres fragments fusionnés à l'YFP, présentant des foci polaires induisaient l'apparition de phénotypes aberrants. Ces observations nous permettraient ainsi de mettre en évidence le fragment minimum responsable de l'altération de la division cellulaire de *B. abortus*.

De façon intéressante, les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-4</sub>-yfp* et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-3</sub>-yfp* ne présentent pas d'aberration morphologique. Par contre, des cellules branchées et des minicells ont pu être observées dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>3-5</sub>-yfp* (**Figure 32**). Des cellules AM ont également pu être observées dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>2-PAS</sub>-yfp* mais dans une moindre mesure. Des comptages sur la fréquence d'apparition des cellules AM dans ces souches n'ont pas été réalisés étant donné la méthode, en *pool*, utilisée pour obtenir ces vecteurs. En effet, les différents comptages des cellules AM ne refléteraient pas la proportion réelle de ces cellules dans une population clonale (voir **Discussion**).

### ▪ Stimulation de croissance et croissance polaire

Les expériences de *time-lapse* nous ont permis d'observer la croissance et la division des souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et *B. abortus* 544 sauvage. Ces observations nous ont permis de mettre en évidence un cycle d'apparition des cellules AM.

De plus, en regardant différentes cellules AM au cours des expériences *time-lapse*, il semble qu'un des deux pôles reste statique au cours de la croissance cellulaire tandis que l'autre se déplace, s'éloignant du premier (voir **CD time-lapse**).

Ainsi, en mesurant la position sur les axes X et Y de chacun des pôles de cellules branchées au cours du temps et de la croissance de la bactérie, on a pu mettre en évidence un déplacement asymétrique des deux pôles. De plus, ce phénomène a pu également être observé dans les différentes souches testées en *time-lapse* (*B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et *B. abortus* 544 sauvage) (**Figure 34**). Dans les cellules branchées, le pôle en mouvement semble être systématiquement le pôle dédoublé tandis que le pôle statique correspond au vieux pôle où localise PdhS-YFP.



## ***Partie IV : Test d'interaction par un double hybride en levure.***

### ▪ **Principe du test d'interaction double hybride en levure**

La technique de double hybride se base sur le découpage du facteur de transcription Gal4p en deux parties, le domaine de liaison à l'ADN (*domaine BD*) reconnaissant des sites spécifiques dans le promoteur *GALI* et le domaine de transactivation (*domaine AD*) permettant le recrutement de la polymérase et donc l'initiation de la transcription (Walhout and Vidal, 2001). Chacun de ces domaines va être fusionné à nos candidats dont on souhaite tester l'interaction (fragment-AD/interactant-BD). Si interaction il y a, le facteur de transcription Gal4p reformé va activer la transcription d'un gène rapporteur. Les gènes rapporteurs utilisés dans ce test double hybride sont tels que l'activation peut être détectée par sélection (voir **matériels et méthodes**):

- *HIS3* code pour l'imidazole-glycérol-phosphate déshydratase participant à la biosynthèse de l'histidine. L'activation du gène confère donc à la levure la capacité de croître sur milieu déplété en histidine (sélection positive). Du 3AT, un inhibiteur compétitif de l'enzyme, est ajouté au milieu afin de limiter la biosynthèse de l'histidine résultant de la transcription basale de *HIS3*.
- *URA3* code pour l'orotidine-5-phosphate décarboxylase, une enzyme indispensable à la biosynthèse de l'uracile. La sélection s'effectue donc sur un milieu déplété en uracile.

La réalisation d'un test double hybride en levure nécessite la construction d'un plasmide « appât » codant la protéine d'intérêt fusionnée au domaine BD (plasmide pVV212) et d'un plasmide « proie » codant la fusion du domaine AD (plasmide pVV213) avec l'interactant potentiel. Nos fragments de PdhS ont donc été introduits dans le pVV213 et les partenaires de PdhS connus (DivK, PdhS, FumC, PipP et PicC) dans le pVV212. Une fois construit, les pVV213 furent introduits dans une souche d'un type conjugatif, MAT $\alpha$  (MaV203) et les pVV212 dans l'autre type conjugatif, MATa (MaV103) (voir **matériels et méthode**). Au sein du laboratoire, nous disposons déjà des constructions en pVV212 (Johann Mignolet, données non publiées et Delphine Dotreppe, mémoire 2006). Les différentes constructions sont sélectionnées via des marqueurs d'auxotrophie portés par les plasmides.

### ▪ **Mise en évidence des fragments minimum d'interaction (FMI) avec les 5 partenaires connus de PdhS**

Les différents fragments de PdhS, fusionnés au *domaine AD* furent donc testés en double hybride chez la levure contre les cinq interactants connus de PdhS, à savoir DivK, PdhS, FumC, PicC, PipP, chacun fusionné au domaine BD. Un test double hybride en levure réalisé avant ce mémoire avait pu mettre en évidence les différentes interactions entre les cinq partenaires connus et le fragment<sub>1-613</sub> et le fragment<sub>611-1035</sub> (cfr **introduction**) (Hallez et al., 2007).





Ces deux fragments furent introduits dans notre test pour être utilisés comme contrôle positif et négatif d'interaction. Deux tests d'interaction différents furent réalisés :

- Tout d'abord un double hybride en levure entre les 11 fragments fusionnés au *domaine AD* obtenu clonalement. Ce test fut mis en évidence par le gène rapporteur *URA3*. Il a pu être réalisé deux fois.
- Un second double hybride impliquant les fragments obtenus en pool a été réalisé et les interactions furent mises en évidence via le gène rapporteur *HIS3*.

Des cultures liquides des pVV213\_AD-fragment-x et des 5 pVV212\_BD-interactants ont été lancées à partir d'un pool de clones poussant sur milieu sélectif déplété en Leucine (SC-Leu) pour les pVV213 et en tryptophane (SC-Trp) pour les pVV212. Les deux souches sont ensuite mélangées et déposées sur milieu de croissance (YPD) afin de permettre le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs (mating) (**voir matériels et méthodes**). Par réplique velours, les diploïdes obtenus sont déposés sur milieu SC-Leu-Trp (milieu déplété en leucine et en tryptophane) pour sélectionner la présence des deux plasmides. Finalement, les cultures sont transférées sur milieu SC-Leu-Trp-Ura ou -Leu-Trp-His+3AT où a lieu l'identification des interactions.

Les différentes interactions obtenues en double hybride sont décrites dans les tableaux présents à la page suivante (**table 2**). Les différents contrôles utilisés dans les différents tests, en particulier le fragment<sub>1-613</sub> et le fragment<sub>611-1035</sub>, nous ont permis d'identifier les fusions autoactivatrices comme c'est le cas pour PicC dans le test 2 (**table 2b**) ou d'identifier des interactions non pertinentes comme le Fragment<sub>1-Kin</sub> et le Fragment<sub>PAS</sub> qui sont positifs pour l'interaction avec le plasmide ne portant pas de *fragment* fusionné au *domaine AD* (plasmide  $\emptyset$ ) dans le premier test. Le tableau **2d** résume les interactions positives ressortant des différents tests effectués. Il est également important de noter que les observations ressortant de ces tests sont des données préliminaires et que ces expériences doivent encore être reproduites. (**Figure 35**)

Les tests préliminaires de double hybride en levure ont mis en avant une interaction entre DivK et le F<sub>3-Kin</sub> et le F<sub>4-Kin</sub> ce qui semble en corrélation avec les données déjà connues (Hallez et al., 2007) (cfr **introduction**). L'interaction avec le fragment<sub>PAS-Kin</sub> a également pu être observée.

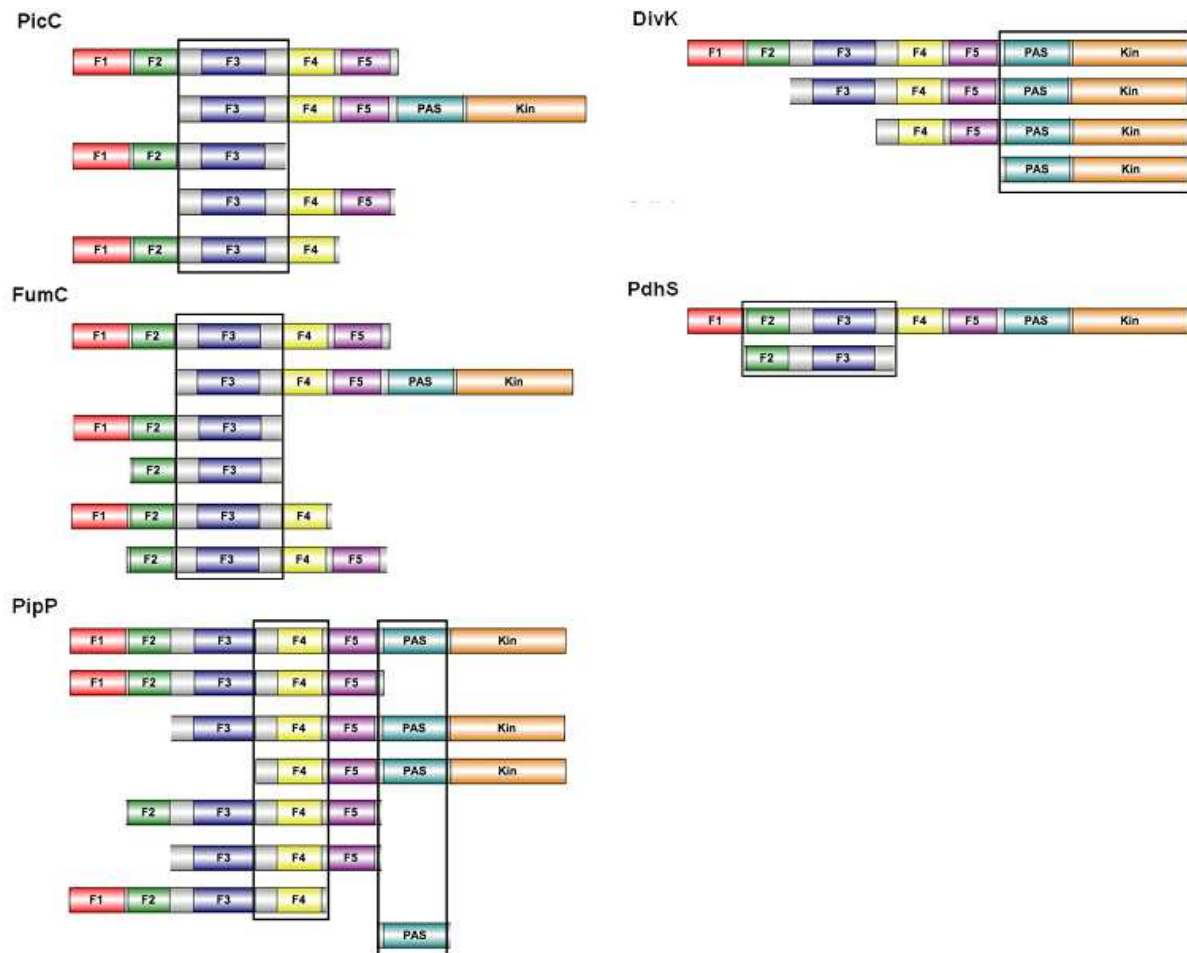
Très peu d'interactions de fragments de PdhS avec PdhS complet ont pu être mises en évidence. Seul un des tests (**table 2b**) a montré une interaction entre PdhS et le fragment<sub>2-3</sub>.

FumC présente une interaction avec les fragments F<sub>1-3</sub>, F<sub>1-5</sub>, F<sub>1-4</sub>, F<sub>3-Kin</sub> et F<sub>3-5</sub>, les deux dernières ayant été confirmées dans plusieurs des tests réalisés (**table 2d**).

PipP interagit avec de nombreux fragments dans les différents tests (**table 2d**). Les interactions avec le fragment<sub>4-Kin</sub> et le fragment<sub>3-5</sub> sont observées dans les trois tests. Dans deux, PipP semble interagir avec le F<sub>3-Kin</sub>, le F<sub>1-5</sub> et le F-PAS. Enfin certaines interactions ne sont identifiées que dans un seul test. C'est le cas pour le fragment<sub>1-4</sub> et le fragment<sub>2-5</sub> (**table 2a, b, c**).

Dans les différents tests, F<sub>3-Kin</sub>, F<sub>1-3</sub>, F<sub>3-5</sub> (dans deux tests différents), F<sub>1-5</sub> et F<sub>1-4</sub> sont positifs pour leur interaction avec PicC. Comme attendu, une interaction avec le fragment<sub>1-613</sub> est également observée (Johann Mignolet, données non publiées). Néanmoins, dans un des tests, PicC semble autoactivateur, étant positif pour toutes les interactions même le contrôle négatif (plasmide  $\emptyset$ ).

Ces résultats seront analysés dans la partie **Discussion** afin de déterminer les domaines minimaux d'interactions pour chaque partenaire.



**Figure 35** : Schéma illustrant les différents fragments interagissant en test double hybride en levure avec les partenaires connus de PdhS. Le nom de chaque partenaire est indiqué pour chaque alignement de fragments.

**a** MaV –Leu-Trp-Ura clonal

	FumC	PdhS	PipP	PicC	DivK	Plasmide Ø
1-Kin	X	X	X	X	X	X
1-5	o	o	X	o	o	o
Pas-Kin	o	o	o	o	X	X
3-Kin	X	x	X	X	X	o
4-Kin	o	o	X	o	X	o
1-3	X	o	o	X	o	o
2-3	o	o	o	o	o	o
2-5	o	o	o	o	o	o
2-Pas	o	o	o	o	o	o
3-5	x	o	X	X	o	o
Pas	X	o	X	o	o	X
Plasmide Ø	o	o	o	o	o	o

**c** MaV Pool –Leu-Trp-His+3AT 100mM

	4-Kin	1-5	1-4	3-5	Pas	Fragment 611-1035	Fragment 1-613	Plasmide Ø
PdhS	o	o	o	o	o	o	o	o
FumC	o	X	X	X	o	o	X	o
PipP	X	X	X	o	X	o	X	o
PicC	o	X	X	X	o	o	X	o
DivK	o	o	o	o	o	o	o	o

**b** -Ura-Leu-Trp clonal MaV

	PdhS	Fragment 611-1035	Fragment 1-613	Pas	3-5	2-3	2-5	2-Pas	1-3	1-5	Pas-Kin	4-Kin	3-Kin	1-Kin
PdhS	X	o	o	o	o	X	o	o	o	o	o	o	o	o
FumC	X	o	X	o	X	X	X	o	X	o	o	o	o	o
PipP	o	o	X	X	X	o	X	o	o	X	o	X	X	X
PicC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DivK	X	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	X	X

**d**

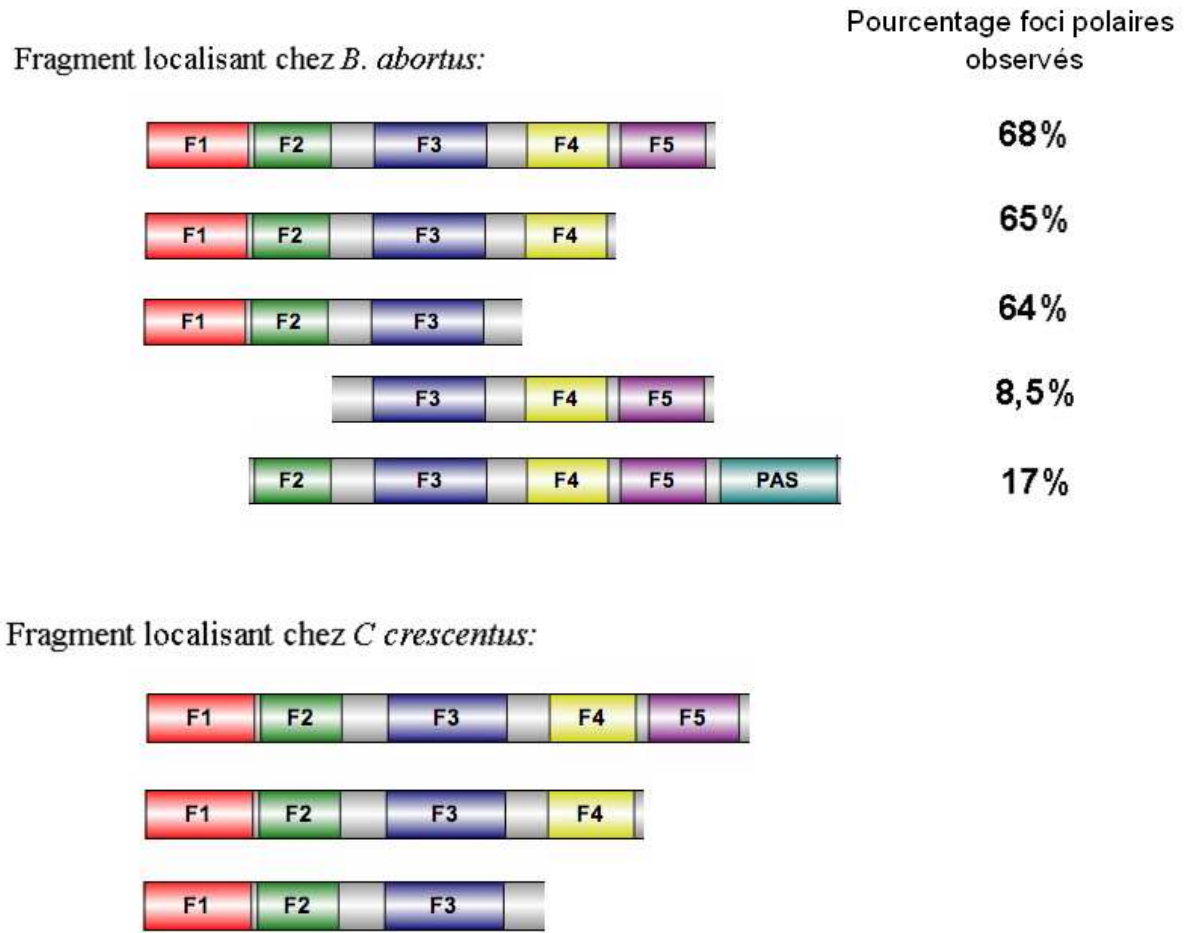
	PdhS	FumC	PipP	PicC	DivK
1-Kin			X		X
1-5		X	XXX	X	
Pas-Kin					X
3-Kin	X	X	XX	X	XX
4-Kin			XXX		X
1-3		XX		X	
2-3	X	X			
2-5		X	X		
2-Pas					
3-5		XXX	XX	XX	
Pas			XX		
1-4		X	X	X	

- Test 1 clonal -Ura  
- Test 2 clonal -Ura  
- Test 3 pool –His + 3AT 100mM

**Table 2 :** Tableaux illustrant les interactions observées lors des différents tests double hybride en levure.

Les différents tableaux illustrent les données observées lors de chacun des tests double hybride réalisés. Les X représentent une interaction positive tandis que les O illustrent une absence d’interaction. Les lignes grisées sont des interactions non analysées car elles sont considérées non pertinentes (fusions autoactivatrices ou contrôles négatifs qui sont positifs).

(a) Double hybride en levure sur milieu SC–Leu–Trp–Ura testant les interactions des fragments obtenus clonalement. (b) Deuxième test sur milieu SC–Leu–Trp–Ura des fragments obtenus clonalement. (c) Test sur milieu SC–Leu–Trp–His+3AT 100 mM des fragments obtenus en pool. (d) Tableau résumant les différentes interactions ressortant des différents tests réalisés (une couleur par test).



**Figure 36** : Schéma illustrant les différents fragments fusionnés à l'YFP présentant une localisation polaire chez *Brucella abortus* et chez *C. crescentus*

## Discussion :

Afin de définir le(s) fragment(s) minimum(s) de PdhS permettant sa localisation polaire et l'interaction avec ses 5 partenaires connus chez *B. abortus*, nous avons proposé, sur base d'alignements de séquences entre PdhS et ses homologues chez d'autres  $\alpha$ -protéobactéries, de délimiter PdhS en sept fragments. Cinq de ces fragments correspondent à des régions conservées entre les homologues de PdhS comparés (*B. abortus*, *B. suis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti*). Les deux derniers, dans la partie C-terminale de la protéine correspondent aux domaines prédits dans les bases de données (PROSITE, Pfam).

Les cinq fragments conservés, entourés de régions variables, pourraient correspondre à des domaines structuraux joutés de *linkers*. En découpant PdhS dans ces régions variables, nous maximons les possibilités de repliement correct des fragments générés. Néanmoins, un fragment pourrait correspondre à plusieurs domaines structuraux et un *linker* pourrait être en réalité une boucle au sein d'un seul domaine structural. En coupant au sein de cette boucle, nous risquons donc de déstabiliser les fragments générés. Cependant, nous avons conçu notre matrice de délétion de façon à générer des fragments de toutes tailles, couvrant l'entièreté de la séquence protéique de PdhS. Le domaine structural mal coupé se retrouverait donc correctement constitué dans de nombreux fragments de la banque de protéines tronquées. L'étude de la structure tridimensionnelle de PdhS par cristallisation de la protéine permettrait de répondre à ces questions de structure.

### ▪ **Fragment minimum de localisation chez *Brucella abortus* et chez *Caulobacter crescentus***

Comme illustré dans la figure ci-contre, différents fragments semblent présenter une localisation polaire chez *B. abortus* et *C. crescentus*. Il est important de noter qu'une absence de foci fluorescents ne signifie pas que le fragment en question n'est pas impliqué dans la localisation de PdhS dans la cellule. Il est probable que la protéine chimérique ne soit pas produite, qu'elle soit mal repliée ou encore qu'elle se fasse protéolyser. Nous nous sommes donc efforcés d'analyser uniquement les résultats positifs.

Il est important de souligner, qu'à l'exception du fragment<sub>1-5</sub>-YFP obtenu clonalement, le pourcentage de cellules présentant des foci polaires ne représente pas nécessairement la proportion réelle de fragments localisant au vieux pôle. En effet, le fait d'avoir travaillé en *pool* implique la présence dans nos cultures de constructions correctes et peut-être incorrectes. Le même problème se pose pour le dénombrement des cellules présentant des aberrations morphologiques. Afin de pouvoir définir la proportion exacte de cellules présentant des foci fluorescents polaires ou des altérations morphologiques, il serait intéressant de procéder à l'isolement de clones possédant une fusion fragment-YFP correcte (**voir conclusion et perspectives**).

Sur base des différents fragments présentant des foci fluorescents (F<sub>1-5</sub>, F<sub>1-4</sub>, F<sub>1-3</sub>, F<sub>2-PAS</sub> et F<sub>3-5</sub>), nous pouvons donc conclure que le fragment 3, seul fragment commun, semble requis pour la localisation de PdhS chez *B. abortus* (**Figure 36**).



Chez *C. crescentus*, en recoupant les données de localisation (F<sub>1-5</sub>, F<sub>1-4</sub> et F<sub>1-3</sub>), le fragment minimum permettant la localisation de PdhS au pôle est le F<sub>1-3</sub> (**Figure 36**). Le test d'interaction double hybride en levure a mis en avant des résultats préliminaires indiquant que le fragment<sub>2-3</sub> serait impliqué dans l'interaction avec PdhS. On peut donc émettre l'hypothèse que le fragment 3 permet la localisation via le recrutement du PdhS endogène chez *B. abortus* tandis que le fragment<sub>1-3</sub>, contiendrait l'information nécessaire à la localisation de PdhS. Néanmoins les données de localisation chez les deux  $\alpha$ -protéobactéries ne nous ont pas permis de dissocier clairement la fonction d'interaction PdhS-PdhS et celle de recrutement au vieux pôle.

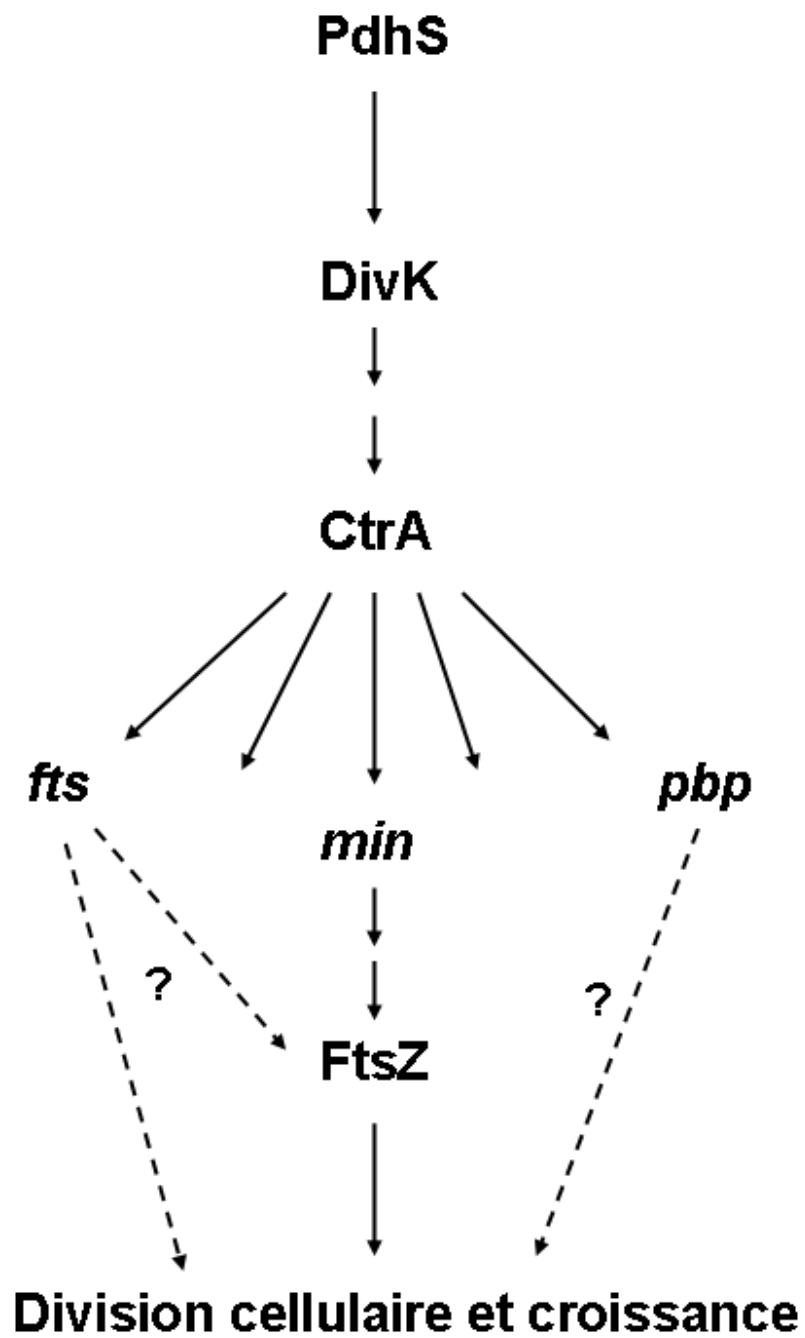
Un western blot nous a permis de mettre en évidence la stabilité et la production des fragment<sub>1-5</sub>-YFP, fragment<sub>1-4</sub>-YFP et fragment<sub>1-3</sub>-YFP chez *B. abortus* (**figure 27**). Le western blot a également révélé la présence de l'YFP seule dans les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment2-PAS-yfp* et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment3-5-yfp*. Ces données suggèrent une instabilité ou une protéolyse du F<sub>2-PAS</sub>-YFP et F<sub>3-5</sub>-YFP au sein de ces cellules. Ces observations sont en accord avec les variations d'intensité de fluorescence observée. En effet, le faible rapport Fp/Fc du F<sub>3-5</sub> et du F<sub>2-PAS</sub> pourrait s'expliquer par la présence de l'YFP seule au sein de la cellule (Fc élevé). De plus, la protéolyse empêche une grande partie des fragments produits de localiser au pôle, diminuant Fp, le pic de fluorescence au pôle. La faible intensité des foci fluorescents polaires ainsi que l'absence de détection par le western blot pourraient être dues au temps de demi-vie très court des protéines de fusion dans la cellule.

Différents facteurs peuvent expliquer la variation d'intensité de fluorescence au sein des différentes souches présentant des foci fluorescents polaires. Tout d'abord, comme décrit plus haut, la stabilité des protéines de fusion jouent un rôle prépondérant dans le pourcentage de localisation observé dans les cellules et dans les variations d'intensité fluorescente.

Un autre facteur pourrait influencer l'intensité des foci fluorescent au pôle chez *B. abortus*. En effet, nous avons émis l'hypothèse que le fragment 3 serait impliqué dans l'interaction avec PdhS tandis que le fragment<sub>1-2</sub> permettrait la localisation polaire proprement dite. On peut donc imaginer que pour une localisation optimale de la protéine, les deux mécanismes soient requis (F<sub>1-3</sub> étant le fragment minimum pour la localisation polaire chez *C. crescentus*). De cette manière, les fragments 1-3, 1-4, 1-5 présenteraient des profils de localisation « normaux » (Fp/Fc respectif de 9,41 ; 10,9 ; 11,4) tandis que l'absence du fragment<sub>1-2</sub> au sein de nos protéines tronquées se reflèteraient sur le taux de localisation polaire et sur l'intensité des foci fluorescents, comme on peut l'observer pour le fragment<sub>3-5</sub> et le fragment<sub>2-PAS</sub> (Fp/Fc de 5,9 et de 2,7). Ainsi, le pourcentage de localisation chute à 8,5% pour le fragment<sub>3-5</sub> et à 17% pour le fragment<sub>2-PAS</sub> par rapport au pourcentage supérieur à 50% observé pour les trois autres souches. Néanmoins, ces chiffres ne sont pas réellement comparables étant donné notre travail en pool. Un troisième facteur, le nombre de copies du plasmide *pMR10\_cat\_fragment-x-yfp* dans les cellules, peut également influencer l'intensité du signal fluorescent perçu.

Ainsi une cellule présentant un signal fluorescent plus intense pourrait compter un nombre plus élevé de plasmides par rapport à une cellule aux foci fluorescents plus diffus. Néanmoins, les rapports Fp/Fc tiennent compte de cette variation puisque c'est le rapport entre l'intensité du pic et l'intensité basal qui est étudiée. Le nombre de copie du plasmide d'intérêt ne doit normalement pas affecter ce rapport.





**Figure 37** Modèle hypothétique de la régulation allant de PdhS jusqu'à CtrA et FtsZ .

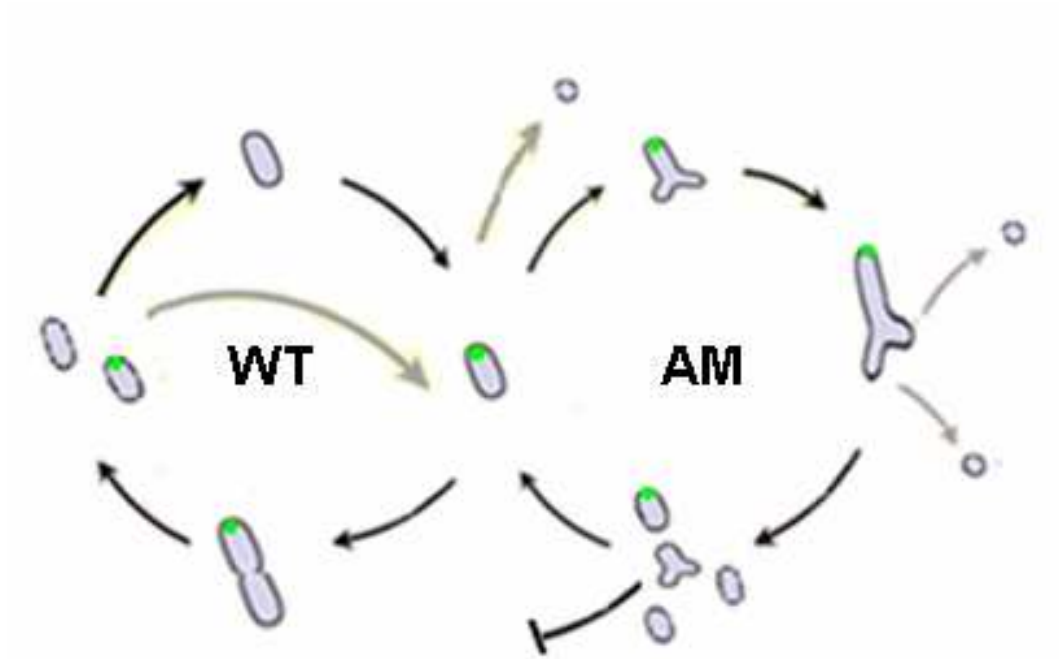
## ▪ Aberration morphologique et division cellulaire

Une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* présente des aberrations morphologiques suggérant un rôle possible de PdhS dans la régulation de la division cellulaire. Il a, en effet, été montré qu'une inhibition de la division cellulaire se traduisait par la filamentation des cellules ou par l'apparition de formes branchées (Latch and Margolin, 1997). Néanmoins, il est intéressant de remarquer l'effet de l'introduction d'un fragment protéique, ne possédant pas l'activité kinase essentielle de PdhS, sur la division cellulaire.

Comme l'a mis en évidence le test double hybride et des données précédentes (cfr **introduction**), le F<sub>1-5</sub> contient le(s) fragment(s) nécessaire(s) à l'interaction avec PdhS, nous permettant d'avancer l'hypothèse que la présence d'une protéine tronquée module l'activité des complexes formés *in vivo*. Cette hypothèse expliquerait pourquoi une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_pdhS-yfp* présente une croissance et une division normale. Par contre dans une souche *pBBR\_pdhS* (voir **matériels et méthodes**), la concentration de PdhS présent dans la cellule atteindrait un seuil qui affecterait le rôle régulateur du système à deux composants auquel appartient PdhS. La surproduction de PdhS pourrait se refléter sur la phosphorylation du régulateur de réponse DivK et ainsi sur CtrA pouvant conduire à l'apparition des cellules AM (**Figure 37**).

Comme dans beaucoup d'histidine kinases, il est possible qu'une région du domaine senseur de PdhS ait un effet régulateur sur l'activité de phosphorylation de la protéine (Mascher et al., 2006). En effet, en absence de stimuli, ce domaine pourrait bloquer la protéine dans une conformation défavorable à l'activité de l'HK comme cela a été illustré avec le Domaine PAS de l'HK FixL chez *S. meliloti* (cfr **introduction**) (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 1993). Ainsi, dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment 1-5-yfp*, l'introduction d'un fragment dépourvu de ce domaine inhibiteur ou portant ce domaine altéré au sein des complexes formés par PdhS aurait un effet activateur sur l'activité de la protéine. Cette augmentation d'activité pourrait se refléter sur DivK et ainsi sur le régulateur de réponse globale CtrA, perturbant ainsi la division cellulaire. Ces différentes hypothèses permettent également d'expliquer les phénotypes AM très similaires des souches *B. abortus* surexprimant *pdhS*, exprimant le *fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, surexprimant *divK* ou *ctrA* (**Figure 37**).

L'absence de cellules AM dans les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-4</sub>-yfp* et *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-3</sub>-yfp* et la présence de cellules branchées et de minicells dans la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>3-5</sub>-yfp* suggèrent que le F<sub>5</sub> est le fragment minimum permettant l'apparition des cellules AM illustrant son possible rôle régulateur dans le contrôle du cycle cellulaire par PdhS. Il est également possible que le F<sub>5</sub> soit mal replié au sein du F<sub>1-5</sub> et du F<sub>3-5</sub> perturbant ainsi l'organisation des complexes formés par PdhS.



**Figure 38** : Hypothèse de cycle cellulaire altéré chez les souches *Brucella abortus* 544 *pMR10 cat fragment1-5-yfp* et *Brucella abortus* 544 *pBBR pdhS*.

L'apparition des minicells semble résulter d'un « accident de division » pouvant survenir à différents moments du cycle cellulaire, et probablement dû à un mauvais positionnement de l'anneau de septation. Une cellule à phénotype sauvage peut se diviser normalement ou entrer dans un cycle AM en formant une cellule branchée. Cette cellule branchée peut à son tour produire des minicells ou se diviser, redonnant alors des cellules au phénotype sauvage. En vert, nous avons, sur base des observations en microscopie, annoté la localisation de PdhS au cours du cycle AM.

Les observations *time-lapse* de la souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* et de la souche *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS-yfp* ont permis de définir un cycle d'apparition des cellules AM. De plus, nous avons pu établir un lien entre les différentes catégories de cellules AM définies et ce cycle d'apparition (**Figure 38**). Les observations montrent que de nombreuses divisions de cellules AM donnent des cellules au phénotype sauvage permettant d'expliquer la large proportion observée de cellules aux phénotypes sauvages (65% dans une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*). Ces cellules pourraient être, en réalité, une étape présentant un phénotype sauvage dans le cycle cellulaire proposé des cellules AM.

Il semble que la génération de minicells soit un processus résultant d'un « accident de division ». Cette perturbation de la division pourrait provenir d'un mauvais positionnement de l'anneau de septation Z résultant d'une mauvaise régulation de CtrA sur FtsZ dans les souches exprimant le *fragment<sub>1-5</sub>-yfp* ou surexprimant *pdhS*. La cellule ainsi produite ne contient pas d'ADN et la cellule mère peut à nouveau rentrer en division. Les observations indiquant qu'une cellule ne génère pas deux fois de manière consécutive une minicell suggère que, par ce mécanisme, elle pourrait peut-être éjecter un surplus de matériel délétère lui permettant de récupérer pour un temps un phénotype sauvage (**Figure 38**).

Sur base des observations *time-lapses* des souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* et *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS*, un cycle dans l'apparition des cellules AM peut être avancé, cycle dans lequel les minicells sont des « accidents de division » (**Figure 38**). La localisation du *fragment<sub>1-5</sub>-YFP* peut être supposée au vieux pôle sur base des observations en fluorescence même si des expériences en *time-lapse* pouvant révéler la localisation dynamique du *fragment<sub>1-5</sub>-YFP* n'ont pas pu être réalisées.

En effet, une fois soumise à la fluorescence, une souche *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp* ne croît plus. Ce phénomène a été observé avec d'autres souches et chez d'autres bactéries. Cet arrêt de croissance peut être dû à un phénomène de phototoxicité et de photorégulation (Kennis and Crosson, 2007; Purcell and Crosson, 2008). L'exposition à la fluorescence peut induire l'oxydation de différents complexes au sein de la cellule, notamment dans les complexes de la chaîne de transport des électrons et ainsi conduire à la production de radicaux superoxydes dangereux pour la cellule. Afin d'anticiper ces problèmes, de nombreuses bactéries ont développé la capacité de détecter la lumière, notamment au moyen de domaines PAS au sein d'HK. *B. abortus*, pouvant percevoir la lumière (Kennis and Crosson, 2007), notre hypothèse est qu'elle arrêterait de croître afin d'éviter les dommages cellulaires que pourrait occasionner un stress oxydatif.

Nous avons également remarqué au cours des expériences de *time-lapse* avec les souches *B. abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, *B. abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et *B. abortus* 544 sauvage, un déplacement d'un des deux pôles pendant que l'autre reste statique tout au long de la division cellulaire. Il est cependant possible que ces observations résultent d'artéfacts dus à l'enfoncement de la bactérie dans l'*agarose pad*, empêchant un pôle de se déplacer. Néanmoins, en recoupant nos données, il semble que le pôle immobile soit systématiquement le vieux pôle où se localise PdhS. Notre première hypothèse est qu'un mécanisme au vieux pôle permet l'ancrage de la cellule sur l'*agarose pad*. Cet ancrage, lors des observations de croissance donnerait ainsi l'impression que la bactérie ne croît que par une extrémité.



Ainsi, il a été récemment mis en évidence qu'*A. tumefaciens* présentait des mécanismes d'adhésion à un pôle impliqué dans l'interaction de ce pôle avec la cellule à infecter (Tomlinson and Fuqua, 2009). Un mécanisme similaire, induisant l'attachement systématique d'un pôle précis à la cellule hôte pourrait exister chez *B. abortus*. Néanmoins, les expériences time-lapse ont montré que le pôle statique était capable de se déplacer une fois que le « pôle en croissance » atteignait un obstacle, comme une autre bactérie. Ces observations suggèrent donc qu'un mécanisme d'adhésion n'est pas responsable de ces déplacements asymétriques des pôles sur *agarose pad*.

Notre seconde hypothèse est que *B. abortus* présente une croissance unipolaire. Ainsi, l'incorporation de peptidoglycan ne s'effectuerait qu'à partir du pôle opposé à la localisation de PdhS. Utilisant PdhS comme un marqueur du vieux pôle, il semble que le pôle dédoublé soit systématiquement celui opposé à la localisation de PdhS, c'est-à-dire le pôle jeune. PdhS pourrait agir, via DivK, sur la régulation de CtrA contrôlant ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse du peptidoglycan, comme FtsZ, MurG. L'augmentation anormale de l'incorporation de peptidoglycan ou l'absence de division conduirait à un dédoublement de pôle. Il est important de noter que dans cette hypothèse, la localisation unipolaire de la machinerie de synthèse du peptidoglycan serait tout à fait indépendante de la localisation de PdhS qui agirait, via CtrA, uniquement comme stimulateur.

Dans la caractérisation des cellules AM, un marquage différentiel du FM4-64® entre et au sein des cellules a été observé en fluorescence. En effet, il semble que les cellules AM sont bien moins marquées par le FM4-64® par rapport aux cellules à phénotype sauvage. En membrane, des foci fluorescents rouges sont observés à différents endroits de la cellule indiquant un marquage différentiel du FM4-64®. De façon intéressante, dans de nombreux cas, ces foci fluorescents colocalisent au pôle avec le fragment<sub>1-5</sub>-YFP. Néanmoins, la nature des composés marqués par le FM4-64® étant inconnue, un marquage différentiel par exemple en fonction de la composition lipidique locale ou globale de la membrane ne peut être établi mais reste une hypothèse non négligeable. De plus, ces phénomènes de marquage différentiel de cellules AM ont également pu être observés chez d'autres  $\alpha$ -protéobactéries comme *S. meliloti* (Kobayashi et al., 2009).

#### ▪ **Fragment minimal d'interaction (FMI) avec les partenaires de PdhS**

Les résultats positifs des différents tests de double hybride pour chacun des domaines sont résumés ci-contre (**Figure 36**). Comme pour le test de localisation, nous n'interprétons que les données d'interaction positives, un résultat négatif ne signifiant pas nécessairement une absence d'interaction. En effet, une absence d'interaction peut notamment être due à un mauvais repliement de la protéine de fusion, à une protéolyse de celle-ci ou encore à un problème dans la translocation de la protéine chimérique dans le noyau.

La présence de faux positifs et de faux négatifs n'est pas à exclure étant donné les problèmes rencontrés pour faire pousser les souches. De plus, il est possible que certaines interactions proviennent du fait qu'une des deux fusions (probablement avec le domaine BD) soit mutée et que le domaine soit capable de recruter la machinerie de transcription.



Les données ressortant des tests double hybride en levure, sont des données préliminaires. Néanmoins, différents résultats intéressants s'en dégagent déjà, nous permettant de faire une esquisse des FMI nécessaires aux différents partenaires. En recoupant les données résumées dans la **Figure 35** ci-contre, nous avons déterminé des FMI pour chacun des partenaires connus de PdhS.

L'interaction de PdhS avec lui-même semble impliquer le fragment<sub>2-3</sub>. Néanmoins, les données obtenues pour l'interaction PdhS-PdhS sont trop lacunaires pour pouvoir conclure que seuls ces deux fragments sont requis pour l'interaction. Il est néanmoins intéressant de remarquer le lien entre le fragment responsable de l'interaction PdhS-PdhS et les fragments impliqués dans la localisation de la protéine au pôle chez *B. abortus* et chez *C. crescentus* (cfr **Discussion**).

PipP semble interagir avec PdhS via le F<sub>4</sub> (fragment 4). En effet, c'est le seul domaine structural potentiel commun aux différents fragments interagissant en double hybride avec la protéine hypothétique. Néanmoins, contrairement à des données antérieures effectuées au laboratoire (Johann Mignolet, données non publiées), une interaction entre PipP et le F<sub>PAS</sub> a été mise en évidence dans deux des trois tests double hybride en levure. Le domaine PAS pourrait dès lors constituer un second site de liaison pour la protéine hypothétique.

Pour FumC, il semble que ce soit le F<sub>3</sub> qui soit requis pour son interaction avec PdhS. Enfin, dans le cas de PicC, le F<sub>3</sub> semble également être impliqué sa liaison avec l'HK polaire.





# **Conclusion générale et Perspectives**



## Conclusion générale et perspectives

Afin de définir les fragments les plus courts permettant la localisation polaire et l'interaction de PdhS avec ses partenaires connus, nous avons délimité la séquence de PdhS en 7 régions conservées, sur base d'alignement de séquence. Ces différentes régions nous ont permis de générer une banque de fragments tronqués à partir de l'extrémité N-terminale et/ou C-terminale. Chacun de ces fragments fut fusionné à l'YFP permettant de tester leur localisation chez *B. abortus* et chez *C. crescentus*, ainsi qu'au domaine AD de Gal4p pour tester leur interaction avec les partenaires de PdhS connus, en double hybride chez la levure.

Les observations au microscope nous ont permis de mettre en évidence la localisation polaire chez *B. abortus* des fragments 1-5, 1-4, 1-3, 3-5 et 2-PAS fusionnés à l'YFP. Ces données suggèrent que le fragment 3 est requis pour la localisation polaire de PdhS chez *B. abortus*. Chez *C. crescentus*, une alpha-protéobactérie ne présentant pas d'homologue proche de PdhS, le fragment minimum permettant une localisation au pôle pédonculé, est le F<sub>1-3</sub>-YFP. Toutes ces données nous permettent d'avancer que les fragments 1 à 3 sont impliqués dans la localisation au pôle de PdhS. Au cours des expériences en fluorescence et en double hybride en levure, nous n'avons malheureusement pas pu séparer clairement la fonction d'interaction avec PdhS et de localisation polaire. Il est possible que pour une localisation optimale les deux fonctions soient requises. L'absence d'une des fonctions pourraient dès lors se refléter sur la localisation de certains de nos fragments. Ainsi, le F<sub>3-5</sub> et le F<sub>2-PAS</sub> présentent une plus faible intensité fluorescente au pôle pouvant indiquer l'absence d'une des deux fonctions permettant la localisation de PdhS.

Les données préliminaires de western blot ont mis en évidence la stabilité des fusions fragment 1-5/1-4/1-3-YFP ainsi qu'une protéolyse des fragments 2-PAS et 3-5 fusionnés à l'YFP pouvant expliquer le niveau basal de fluorescence plus élevé dans ces cellules. Un western blot sur l'ensemble des fragments fusionnés à l'YFP chez *B. abortus* et chez *C. crescentus* devrait être répété avec un contrôle de charge afin de mettre en évidence et comparer la stabilité de tous les fragments observés.

Différents fragments n'ont pu être fusionnés à l'YFP (1-Kin, 2-Kin, 1-2, 2, 1-PAS, 2-4 et 5-Kin, 3, 3-Pas et 4-Pas). Plusieurs de ces fragments pourraient apporter des données supplémentaires non négligeables afin de mettre en avant le rôle des fragments 1, 2 et 3 dans la localisation de PdhS chez *B. abortus* et chez *C. crescentus* et particulièrement déterminer si le fragment 3 seul est suffisant pour permettre la localisation.

Enfin, pour pouvoir comparer le pourcentage de cellules présentant des foci fluorescents polaires pour les F<sub>1-4</sub>, F<sub>1-3</sub>, F<sub>3-5</sub>, F<sub>2-PAS</sub> et F<sub>2-5</sub> chez *B. abortus* avec cette même proportion chez le fragment<sub>1-5</sub> travailler avec des clones isolés (et non plus des pool de clones) est indispensable. Un clone contenant une construction correcte devrait être isolé pour chaque souche. En effet, seule la fusion F<sub>1-5</sub>-YFP a été obtenue clonalement. Les nouveaux clones présentant des foci fluorescents polaires seront soumis à une PCR diagnostique pour s'assurer de la présence d'une construction correcte.

Le même problème subsiste pour l'étude des phénotypes d'aberrations morphologiques (AM). En effet, ayant travaillé en pool, le pourcentage de cellules AM dans les différentes souches ne reflètent peut-être pas l'impact réel des différents fragments sur la morphologie cellulaire.



Ainsi, obtenir une population clonale permettrait de comparer la proportion exacte de cellules AM dû à la surexpression des différents fragments avec cette même proportion de souches *B. abortus* sauvage, exprimant le *fragment<sub>1-5-yfp</sub>* ou surexprimant *pdhS*.

Le F<sub>2-5</sub> illustre ces deux phénomènes. En effet, des foci polaires ont été observés dans moins d'1% des cellules, ne nous permettant pas de conclure que le *fragment<sub>2-5</sub>* localise au pôle chez *B. abortus*. Moins de 1% de cellules AM ont également été observées dans cette même souche. Il sera donc intéressant d'isoler un clone présentant une localisation polaire et d'y vérifier la construction afin de pouvoir établir si le F<sub>2-5</sub> induit l'apparition de cellules AM et localise au pôle chez *B. abortus*.

Comme mentionné plus haut, des aberrations morphologiques furent observées chez *B. abortus* pour le F<sub>1-5</sub>-YFP et F<sub>3-5</sub>-YFP. A partir de différents marquages réalisés sur la souche exprimant le *fragment<sub>1-5-yfp</sub>*, différentes catégories de cellules AM furent définies; les minicells, ne possédant pas d'ADN, les cellules larges et triangulaires et les cellules branchées. La présence du fragment 5 dans les deux souches générant des cellules AM suggère un rôle de ce fragment dans le contrôle de la division cellulaire. L'étude de l'impact des fragments n'ayant pu être fusionnés à l'YFP et du *fragment<sub>2-5</sub>*-YFP, obtenus clonalement, sur la morphologie cellulaire permettrait d'étudier plus en profondeur le rôle du fragment 5 dans la division et la morphologie chez *B. abortus*.

Au cours du processus d'infection, une souche *B. abortus* sauvage ne se divise pas pendant les premières heures post-infection et ne commence à se répliquer qu'une fois sa niche atteinte, probablement au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, des données préliminaires (Charles Van der Henst, thèse en cours) indiquent que, dans les premières heures post-infection, la localisation de PdhS-YFP n'est pas détectée au pôle chez *B. abortus*. Ces données suggèrent un blocage de la division ou de la croissance dans les premières heures suivant l'infection ou que *B. abortus* infecte les cellules à une étape précise de son cycle cellulaire. Ainsi, il serait possible seul la petite cellule, où PdhS n'est pas localisé au pôle, soit capable d'envahir une cellule hôte. Observer la localisation des différents fragments au cours du processus infectieux, avec comme référence une souche *Brucella abortus* 544 sauvage, une souche *Brucella abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et une souche *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_pdhS-yfp* permettrait de mettre en avant un potentiel rôle de *pdhS* dans le processus d'infection

Sur base d'expériences de *time-lapse*, un cycle dans l'apparition des cellules AM a été proposé dans lequel les minicells sont des « accidents de divisions ». Dans ce modèle, une cellule au phénotype sauvage peut entrer dans un cycle cellulaire normal ou dans un cycle altéré qui produira une cellule branchée. Cette cellule branchée se divisera en trois endroits redonnant des cellules au phénotype sauvage et une cellule triangulaire qui ne semble plus se diviser. Dans les cellules branchées, le *fragment<sub>1-5</sub>* localise au vieux pôle, c'est-à-dire du côté opposé au pôle dédoublé. Notre hypothèse est que, dans les souches *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5-yfp</sub>*, et *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_pBBR\_pdhS*, PdhS, un marqueur du vieux pôle, stimule indirectement la croissance au pôle opposé, induisant le dédoublement de pôle.

De plus, en notant la position en X et Y de chacun des pôles au cours du cycle cellulaire, nous avons montré un déplacement d'un des deux pôles, pendant que l'autre reste statique. Ce phénomène a été observé dans une souche *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5-yfp</sub>*, une souche *Brucella abortus* 544 *pBBR\_pdhS* et *Brucella abortus* 544 sauvage. Les graphiques de déplacement des pôles et les observations en microscopie ont mis en évidence que le pôle statique était le vieux pôle où localise PdhS. De plus, dans les cellules branchées, il semble que le pôle dédoublé soit systématiquement celui qui se déplace et semble croître.



Nous proposons donc que *B. abortus* présente une croissance polaire, du côté du jeune pôle (opposé à PdhS). Ainsi, dans les souches *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_fragment<sub>1-5</sub>-yfp*, et *Brucella abortus* 544 *pMR10\_cat\_pBBR\_pdhS*, PdhS stimulerait indirectement la croissance au pôle opposé, induisant le dédoublement de pôle.

Afin de mettre à l'épreuve cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la localisation de la machinerie de synthèse du peptidoglycan en fusionnant un fluorochrome à différentes enzymes impliquées dans cette synthèse tels que MurG, FtsZ et différentes PBP, des protéines régulées directement ou indirectement par CtrA. MurG est une protéine liée à la membrane qui intervient dans la synthèse des sous-unités de constituants le PG (Bouhss et al., 2008). FtsZ est impliqué dans la formation de l'anneau Z et dans le recrutement d'autres partenaires impliqués dans la cytokinèse (Dajkovic and Lutkenhaus, 2006). Les PBP, pour « *Penicillin Binding Proteins* », sont des enzymes impliquées dans la formation des liaisons peptidiques entre les chaînes de peptidoglycan (Sauvage et al., 2008).

Les sites de synthèse du peptidoglycan au cours du cycle cellulaire de *B. abortus* pourrait également être mis en évidence via un marquage à la D-Cystéine et un *pulse-chase*. En effet, la D-Cystéine se substitue aux résidus D-Alanyl terminaux des chaînes peptidiques constituant le peptidoglycan (de Pedro et al., 1997) (Michaël Deghelt, thèse en cours). Les résidus D-Cystéines peuvent être reconnus par un anticorps primaire, à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à des billes d'or permettant la détection en microscopie électronique. Ce marquage permettra de mettre en évidence les zones d'incorporation du peptidoglycan (PG).

L'observation de l'incorporation du PG via la D-Cystéine et la localisation de MurG via une fusion à un fluorochrome permettrait de mettre en évidence un mode de croissance monopolaire chez *B. abortus*. La localisation de MurG dans les cellules AM permettrait également de proposer une possible stimulation de la croissance dans ces cellules (Michaël Deghelt, thèse en cours). Ce phénomène de « croissance polaire » pourrait également être observé chez d'autres alpha-protéobactéries possédant un homologue proche de PdhS, comme *Sinorhizobium meliloti*.

Différents fragments minimums d'interaction avec les cinq interactants de PdhS ont pu être définis via des expériences préliminaires de double hybride. Le fragment 3 semble requis pour l'interaction avec PicC et FumC. Le fragment minimum permettant l'interaction avec PdhS est le fragment<sub>2-3</sub>. PipP semble interagir avec PdhS via le fragment 4 et le domaine PAS, tandis que DivK interagit avec le fragment<sub>PAS-Kin</sub>.

Les difficultés rencontrées pendant la réalisation des tests double hybride font de ces résultats des données préliminaires. En effet, les problèmes au niveau de l'agar et les concentrations de 3AT à définir nous ont empêché de réaliser et d'analyser une grande partie des tests. De plus, en comparant le nombre d'interactions observées en test clonal par rapport au test en pool, il paraît judicieux de travailler clonalement plutôt qu'en pool. Un western blot sur les fragments en fusion avec le domaine AD obtenus clonalement permettrait aussi d'étudier la stabilité des protéines de fusion et ainsi de mettre en évidence certains faux négatifs des tests double hybride en levure.

Pour confirmer les différentes interactions, on pourrait également tester la colocalisation de certains fragments avec les interactants connus fusionnés à différents fluorochromes. Par exemple, observer le pattern de fluorescence chez *C. crescentus* entre le fragment<sub>1-3</sub>-YFP et FumC-mCherry. Ce test ne peut en effet s'effectuer chez *B. abortus* étant donné l'expression endogène de *pdhS*.





Ainsi, via les données de localisation et d'interaction, nous avons pu établir un rôle putatif pour différents fragments définis parmi les 655 résidus N-terminaux sans fonction connues de PdhS. Les fragments 1, 2 et 3 interviennent dans la localisation polaire de PdhS, le 3 dans l'interaction avec PdhS, PicC et FumC, le 4 et le PAS dans l'interaction avec PipP et le fragment 5 semble impliqué dans la régulation de la division cellulaire.

*In fine*, il serait intéressant de tester les fragments d'intérêt permettant la délétion de *pdhS* au locus ou ceux permettant de restaurer un phénotype sauvage à température restrictive dans les souches *B. abortus* 544 *pdhS* thermosensibles. Ces expériences nous permettraient de mettre en avant le(s) fragment(s) possédant la ou les fonctions essentielles de PdhS.

Enfin, la phosphorylation de DivK par PdhS pourrait être testée *in vitro*, afin de mettre en évidence clairement que PdhS est une kinase possible de ce RR. L'activité kinase des différents fragments délétés par l'extrémité N-terminale (1-Kin, 2-Kin, 3-Kin, 4-Kin, 5-Kin, PAS-Kin et Kin) pourraient également être testés mettant ainsi en évidence leur stabilité et leur activité par rapport à PdhS complet, servant de référence. Différents signaux intra ou extracellulaire peuvent moduler l'activité des HK en interagissant avec leur domaines senseur. L'HK FixL, par exemple, peut via son domaine PAS, sentir le niveau d'O<sub>2</sub> dans l'environnement (Taylor and Zhulin, 1999). Une fois en présence d'O<sub>2</sub>, via un groupement hème, le domaine PAS va induire un changement de conformation et inhiber l'activité kinase de FixL. De façon intéressante, le domaine PAS de PdhS présente 21% d'identités avec le domaine PAS de FixL, un pourcentage similaire au domaine PAS de l'homologue de PdhS chez *S. meliloti*, connus pour posséder également un groupement hème. Il serait donc probable que le domaine PAS de PdhS soit impliqué dans la perception du taux d'O<sub>2</sub>.

L'activité des différents fragments et de PdhS pourrait être mesurée dans différentes conditions, comme par exemple en fonction du pH, de la concentration en malate, fumarate ou en oxygène, afin de testés différents signaux pouvant être reconnus par les fragments du domaine senseur de PdhS. Ainsi nous pourrions identifier les différents stimuli et leur site de reconnaissance au sein du domaine senseur, influençant de cette manière l'activité de l'HK.

Après avoir généré et testé l'interaction et la localisation d'une banque de fragments de PdhS tronqués par l'extrémité N-terminale et/ou C-terminale, il serait intéressant de générer des protéines tronquées d'un seul fragment au sein de la protéine. Par exemple, tester l'apparition de cellules AM dans une souche *B. abortus* produisant PdhS – 5 (PdhS délété du fragment 5) afin de mettre en avant son rôle dans la régulation du cycle cellulaire ou d'observer la colocalisation de FumC et PdhS–3 (PdhS délété du fragment 3) fusionnés à différents fluorochromes. Ces constructions permettraient d'étudier plus en profondeur le rôle de chaque fragment délimité au sein de PdhS.



# **Matériels et méthodes**



## Matériels et méthodes :

### *Souches et plasmides*

#### ▪ Souches

##### **Escherichia coli DH10B**

Cette souche est utilisée pour l'amplification d'un plasmide d'intérêt. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne (électroporation).

Génotype : *F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZAM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D (ara, leu)7697 galU galK l- rpsL nupG*. (GibcoBRL(Invitrogen))

##### **Escherichia coli S17-1λpir**

Cette souche possède le plasmide RP4 intégré dans son génome, lui permettant de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert. De plus, elle est résistante à la streptomycine, à la septinomycine et au triméthoprim.

Génotype : *recA thi pro hsdR- M+ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7* lysogénisé avec le phage  $\lambda$ pir.

##### **Escherichia coli DB3.1**

Cette souche résistante à la toxine CcdB grâce à un allèle *gyrA462* est utilisée pour l'amplification de plasmide contenant la cassette gateway™.

Génotype : *F- gyrA462 endA-D(sr1-recA) mcrB mrr hsd20(rB-,mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL l- leu mtl1*. (Invitrogen)

##### **Brucella abortus 544**

La souche utilisée pour ce travail est *Brucella abortus* biovar 544, rendue résistante à l'acide nalidixique (NalR) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur.

##### **Caulobacter crescentus CB15N** (Evinger and Agabian, 1977)

La souche utilisée pour ce travail est *C. crescentus* CB15N.

##### **Saccharomyces cerevisiae** (Walhout and Vidal, 2001)

Les deux souches, MaV103 et MaV203, utilisées sont isogéniques à l'exception de leur type sexuel. La première est MAT $\alpha$ , et la seconde est MAT $\alpha$ , ce qui permet des expériences de mating utilisant ces deux souches. MaV103 et MaV203 partagent le même génotype pour les caractéristiques double-hybride (*leu2-3, 112 trp-901 his3Δ200 ade2-1 gal4Δ gal80Δ SPAL10 ::URA3 GAL1 ::lacZ GAL1 ::HIS3@LYS2 can1R cyh2R*).



## ▪ Plasmides

### **pDonR223**

Ce plasmide commercialisé par Invitrogen life Technologie est conçu pour le clonage en système Gateway™ (GW) de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *attP1* et *attP2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la spectinomycine et une origine de répllication (pUC ori) fonctionnelle chez *E. coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt bordé des sites *attB1* et *attB2*. Le produit de recombinaison est alors appelé vecteur d'entrée.

### **pVV212** (Van Mullem et al., 2003)

Ce vecteur est dérivé du pGBT9 (Bartel et al., 1993) dans lequel a été inséré une cassette de clonage Gateway™. Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et deux origines de répllication ; l'une fonctionnelle chez *Escherichia coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2 $\mu$ ). La séquence codant le domaine de liaison à l'ADN (domaine BD) du facteur de transcription Gal4 en amont de la cassette Gateway permettra la fusion traductionnelle avec un gène d'intérêt. Afin de le sélectionner en levure, le pVV212 possède un marqueur d'auxotrophie codant TRP1, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du tryptophane. Il est sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'alcool déshydrogénase 1 (Pdh1).

### **pVV213** (Van Mullem et al., 2003)

Ce vecteur est dérivé du pACTII dans lequel a été inséré une cassette de clonage Gateway™. Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et deux origines de répllication ; l'une fonctionnelle chez *Escherichia coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2 $\mu$ ). La séquence codant le domaine de transactivation (domaine AD) du facteur de transcription Gal4 en amont de la cassette GW permettra la fusion traductionnelle avec un gène d'intérêt. Afin de le sélectionner en levure, le pVV213 possède un marqueur d'auxotrophie codant LEU2, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la leucine. Il est sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'alcool déshydrogénase 1 (Pdh1).

### **pMR10\_cat GW yfp (pRH005)** (Hallez et al, 2007a)

Ce plasmide est dérivé du pMR10\_cat (Robertson et al., 1999), auquel a été rajouté, à proximité du promoteur Plac, des sites *attR1* et *attR2* de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol. Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur d'entrée via une réaction LR. *In fine*, nous obtenons, sous le contrôle du promoteur Plac, une fusion traductionnelle entre la protéine d'intérêt et une molécule fluorescente (YFP).

Le pMR10\_cat est un plasmide répliatif chez *Brucella* spp. et *E. coli* à faible nombre de copies (origine RK2oriV), possédant un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol ainsi qu'une origine de transfert (oriT).





## **Milieu de culture, Tampons et solutions :**

Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 121°C sous une pression de 20 bars. Le milieu est refroidi à environ 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

### ▪ Milieux riches pour *E. coli* : milieu Luria Bertani (LB)

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Bacto peptone	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

### ▪ Milieux riches pour *B. abortus* : milieu 2YT

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

### ▪ Milieu Riche pour *Saccharomyces cerevisiae* : milieu YPD

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Bacto peptone 2%	20 g	20 g
Glucose	20 g	20 g
Yeast extract 1%	10 g	10 g
Agar	-	25 g

### ▪ Milieu minimum pour *Saccharomyces cerevisiae* : milieu SC

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Glucose	20 g	20 g
Yeast Nitrogen Base w/o amino acid	6,75 g	6,75 g
Agar	-	25 g

Les milieux de sélection sont réalisés dans le milieu SC les acides aminés à raison de 3gr /l pour chaque aa.



▪ **Milieu pour *Caulobacter crescentus* : milieu PYE**

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Bactopeptone	2 g	2 g
Yeast extract	1 g	1 g
Agar	-	15 g
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	1mM
CaCl <sub>2</sub>	0,5mM	0,5mM

▪ **Tampons et solutions**

**Fabrication du gel d'agarose**

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur (10x)	Tampon TAE 50x
Solution de 2mg/ml H <sub>2</sub> O (0.2%)	glycérol 50% EDTA 100mM SDS 1% Bleu de bromophénol ou méthyl orange (0.25%)	Tris-HCl pH 8,0 40m EDTA 50mM Acide acétique glacial 57,1ml/litre

**Tampon PBS 20x**

Pour un litre d'eau désionisée			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2mM	4 g/l	KCl 2,7 mM 4 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	22,98 g/l		NaCl 137 mM 160 g/l

**Tampon TE**

Tris-HCL pH 8,0 10 mM	EDTA 1mM
-----------------------	----------

**Solution d'acetate de lithium (LiAc) 10x**

Porter 10,2gr de LiAc à un volume de 100ml avec de l'eau désionisée, ensuite autoclaver

**Poly éthylène glycol (PEG) 40%**

Porter 40 gr de PEG 4000 à un volume de 100ml avec de l'eau désionisée. Ensuite, stériliser au moyen d'un filtre de 0,45µm (Millipore).

**Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M**

Porter 42,04gr de 3AT à un volume de 250 ml avec de l'eau désionisée, stériliser au moyen d'un filtre de 0,22µm(Millipore) et conserver à 4°C.

**Antibiotiques**

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Spectinomycine	Spect	H <sub>2</sub> O	100mg/ml

Les antibiotiques sont filtrés stérilement avec un filtre 0,22 µm de porosité avant d'aliquoter et de diluer 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
Amorce F1	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGTCAG</b> GATCATACCCCTTCA	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTAGCTGTTATCGG</b> GCATTTGTGTT
Amorce F2	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGGCAA</b> CACAAATGCCCGATAACA	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTAGGTTTTCGGCC</b> TGGGCTGTTC
Amorce F3	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGGGCG</b> ACGCCCCAGCCAGTT	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTATGGCGGTTTCG</b> GCAGAACGG
Amorce F4	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGGCCG</b> GCGGTATTCCGCAAAA	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTACGCGGTTTCGT</b> CCGGCTGGA
Amorce F5	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGCCCG</b> TAAAACACGCTCCGAA	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTACGCCTGCTTTT</b> CCTCATCATTG
Amorce FPAS	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGCTCC</b> CCGCCCCGGCCGA ACT	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTACTGGTTGGAGG</b> CGCGCTCGG
Amorce FKin	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAA</b> <b>AAAGCAGGCTCGATGGAGG</b> CCGAGCGCGCCTCAA	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGA</b> <b>AAGCTGGGTAGTCAGCCAGA</b> ACGCGGGTTG

**Table 3** : Séquence des amorces *forward* et *reverse* utilisées pour générer notre banque de séquences tronquées de *pdhS*.

En gras, les sites *attB1* et *attB2* permettant l'insertion dans le vecteur d'entrée. En souligné, le codon *start* ajouté aux amorces *forwards*

**Valap**

Le valap est utilisé pour cercler les lames couvre-objets pour l'observation au microscope de *B. abortus*. Cette méthode permet d'éviter la contamination de l'environnement par *B. abortus* lors des observations.

Vaseline	1/3 de volume	Lanoline	1/3 de volume	Paraffine	1/3 de volume
----------	---------------	----------	---------------	-----------	---------------

**Techniques relatives à l'utilisation d'ADN**▪ **PCR (Polymerase Chain reaction)**

Cette technique est utilisée pour amplifier un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Les séquences bordant le fragment d'intérêt doivent être connues afin de concevoir des amorces oligonucléotidiques qui leur sont complémentaires. La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools, la Phusion de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. La *Taq* polymérase, vu le taux relativement élevé de mutations introduites, est utilisée dans les cas de PCR diagnostiques alors qu'une enzyme « proofreading » (pHusion) est utilisée dans les cas de clonage Gateway®. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété de 25 à 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

**Mix**

Réactifs	Quantité
Tampon 5X <sub>Taq</sub> , 10X <sub>HF</sub> correspondant à l'enzyme	10 µl ou 5 µl
Mix dNTP's (10 mM pour chaque)	1 µl
Amorce 1 (20 µM)	1 µl
Amorce 2 (20 µM)	1 µl
Taq polymérase ou pHusion	0,2 µl
Matrice d'ADN	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à <b>50 µl</b>

**Programme**

Dénaturation de 10 minutes à 98°C.

25 à 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :

1. 30 secondes à 98°C pour dénaturer.
2. 30 secondes à X°C pour hybrider où X = Tm-10°C
3. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kb) du fragment à amplifier.

Elongation finale de 10 minutes à 72°C.

En bonne approximation, la température d'hybridation (Tm) des amorces égale le double de la somme des bases G et C additionné de la somme des bases A et T. En bref, la  $T_m = 2(G+C) + (A+T)$ . Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et les ajouts de séquence bordante en 5'. Remarquons que l'ADN plasmidique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 98°C.



## ▪ **Électrophorèse en gel d'agarose**

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Comme marqueur de taille, nous utilisons l'HyperLadder de Biorun. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

### **Fabrication du gel**

- Dissoudre par chauffage Y g d'agarose dans Z ml de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose (dans notre cas 1%).
- Ajouter 5 µl de BrEth pour 80 µl de gel d'agarose (6µl pour 120 µl).
- Une fois que la température du flacon atteint ~60°C, couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
- Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur et charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 µl/puits).

## ▪ **Purification sur colonne**

Pour les purifications d'ADN linéaire notamment après PCR, nous avons utilisé le kit MSB Spin PCRapace d'Invitrogen. Ce protocole est prévu pour purifier et concentrer des fragments d'ADN simple ou double brin (de 80 pb à 30 kb).

## ▪ **Extraction d'ADN plasmidique : mini/midipréparation de plasmide**

Lancer une culture de 5/100 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s). Suivre les instructions du kit Nucleospin® (Macherey-Nagel). Ce protocole est employé pour purifier environ 20 µg d'ADN plasmidique.





## ▪ Clonage Gateway®

Le système Gateway™ est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage  $\lambda$  dans le génome d'*Escherichia coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage  $\lambda$  et dans le génome bactérien. Cette réaction génère un génome phagien intégré compris entre les sites *attR* et *attL* néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément englobées sous le terme BP clonase. Cette intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites *attR* et *attL*. Cette réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément englobées sous le terme LR clonase. Ce système a été adapté pour permettre des clonages faciles en laboratoire. Les composants du système de recombinaison du phage  $\lambda$  ont été modifiés afin d'obtenir des paires de sites à spécificités distinctes et d'améliorer l'efficacité du système. Une différence d'une paire de base suffit à donner la spécificité. Ainsi, les sites *attB1* ne recombinent qu'avec les sites *attP1* et de la même façon, *attB2* avec *attP2*, *attL1* avec *attR1* et *attL2* avec *attR2*. En pratique, ce système nécessite plusieurs étapes.

Dans un premier temps, la séquence codante (*CDS*) d'un gène est amplifiée au moyen d'une paire d'amorces dont l'extrémité 3' s'hybride sur la séquence d'intérêt et dont l'extrémité 5' contient, pour l'une, le site de recombinaison GW™ *attB1*, pour l'autre, le site *attB2*. Les produits PCR ainsi obtenus sont constitués, outre les sites *attB1* et *attB2* aux extrémités, d'une séquence débutant exactement à l'ATG (correspondant au codon d'initiation de traduction AUG d'une protéine) et continuant sur toute la *cds* jusqu'au pénultième codon, excluant ainsi le codon STOP.

La seconde étape consiste à réaliser une réaction BP des produits PCR en présence d'un vecteur donneur contenant les séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* bordant le gène de résistance au chloramphénicol *cat* et le gène de toxicité *ccdB*. La protéine CcdB interfère avec l'ADN gyrase d'*E. coli*, inhibant ainsi la croissance de souches bactériennes « *ccdB* sensibles ». L'ADN gyrase de bactéries « *ccdB* résistantes » n'est pas affectée par CcdB. La réaction est catalysée par le « mix BP clonase » qui contient Int et IHF.

Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le produit PCR (*attB1-cds-attB2*), le produit de recombinaison *attR1-ccdB-attR2*, le vecteur donneur *attP1-ccdB-attP2* et le vecteur d'entrée constitué de la *cds* flanquée des sites *attL1* et *attL2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant (c'est-à-dire dont la cassette contenant le gène *ccdB* a été remplacée par le produit PCR) seront capables de se multiplier. De plus, l'antibiotique, pour lequel le vecteur donneur code la résistance, est ajouté au milieu et permet ainsi la sélection des bactéries contenant un plasmide. Les vecteurs d'entrée sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique. Les vecteurs d'entrée obtenus peuvent servir par la suite, pour le clonage en divers vecteurs d'expression.



Ensuite, il ne reste plus qu'à effectuer une réaction LR qui permet la recombinaison d'un vecteur d'entrée contenant les sites *attL1* et *attL2* avec un vecteur de destination contenant les sites *attR1* et *attR2*, pour générer un vecteur d'expression contenant les sites *attB1* et *attB2*. La réaction est catalysée par le mix « LR clonase », contenant Int, IHF et Xis. Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le vecteur d'entrée *attL1-cds-attL2*, le vecteur de destination *attR1-ccdB-attR2*, le produit de réaction *attP1-ccdB-attP2* et le vecteur d'expression *attB1-cds-attB2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant seront capables de se multiplier. Les bactéries contenant un plasmide peuvent être sélectionnées par l'ajout de l'antibiotique pour lequel le vecteur de destination code la résistance. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique.

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR223	3 µl de vecteur d'entrée
3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt	3 µl de vecteur de destination
2 µl de tampon de dilution BP	2 µl de tampon de dilution LR
1 µl d'enzyme clonase BP	1 µl d'enzyme clonase LR
2 µl d'H <sub>2</sub> O distillée	1,2 µl d'H <sub>2</sub> O distillée
Incubation à 25°C <i>overnight</i>	Incubation à 25°C <i>overnight</i> .

## Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

### ▪ Transformation bactérienne : choc thermique

De manière générale, la transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

- Placer 100 µl de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes dans un eppendorf sur glace.
- Une fois les bactéries décongelées, ajouté 5 µl du plasmide.
- Laisser sur glace pendant 45 minutes.
- Choc thermique pendant 2 minutes dans un bain-marie à 42°C.
- Ajouter 1 ml de milieu LB liquide.
- Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C.
- Étaler 100 µl sur un milieu sélectif approprié et laisser pousser sur la nuit à 37°C.
- Centrifuger le reste pendant 5 minutes à 5000 rpm puis resuspendre le culot dans environ 150 µl.
- Étaler le tout sur milieu sélectif approprié et laisser pousser sur la nuit à 37°C.

À un même volume de cellules chimiocompétentes utilisées est ajouté un volume d'eau équivalent au volume de plasmide ajouté. La démarche suivie pour la transformation est identique à celle exposée précédemment. Ce contrôle permet de s'assurer que les cuvettes sont bien stériles, que les cellules ne sont pas contaminées, qu'il n'y a pas d'ADN dans les cuvettes et que les milieux sélectifs sur lesquels sont étalées les bactéries sont sélectifs.



### ▪ Conjugaison bactérienne (*B. abortus*, *C. crescentus*)

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert vers une bactérie receveuse (*B. abortus* ou *C. crescentus*). La souche donneuse (*E. coli* S 17) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif. Le protocole est identique que ce soit des souches *B. abortus* ou des *C. crescentus*.

- Lancer en culture, la veille, les souches de *B. abortus* et d'*E. coli* S17-1.
- Mettre 1 ml de phase stationnaire de bactéries à transformer (ici *B. abortus*) dans un tube eppendorf.
- A ce tube eppendorf, ajouter 50 µl de cellules *E. coli* S17-1 contenant le plasmide d'intérêt.
- Centrifuger les tubes eppendorf pendant 1 minute à 7000 rpm.
- Enlever le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu 2YT.
- Centrifuger pendant 1 minute à 7000 rpm.
- Enlever le surnageant en y laissant une petite quantité de liquide sur le culot (environ 50 µl).
- Resuspendre le culot avec le liquide restant et spoter la préparation sur des petites boîtes de milieu 2YT.
- Incuber pendant 4 heures à 37°C (plasmides réplicatifs) ou à température ambiante toute la nuit (plasmides intégratifs).
- Après incubation, étaler les cellules sur milieu sélectif 2YT avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixic. Pour un plasmide réplicatif, stier sur les boîtes. Pour un plasmide intégratif, resuspendre les bactéries dans 300 µl de 2YT et étaler sur 3 boîtes avec l'antibiotique approprié et de l'acide nalidixique.
- Incuber pendant 3 à 4 jours à 37°C.

Les bactéries donneuses *E. coli* S17-1 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal<sup>R</sup>) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17-1 donneuses.



## Techniques relatives aux protéines

### ▪ Analyse par western blot

#### **Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) permet de séparer des protéines sur le seul critère de leur poids moléculaire. Un puits est réservé au marqueur de poids moléculaire (P.M.). Nous avons utilisé le Bio Rad Low Range qui contient des protéines dont les P.M. vont d'approximativement 18kDa à 110 kDa. La durée de migration (40 mA, 300V) est fonction du pourcentage du gel en acrylamide et du poids de la protéine d'intérêt ainsi que des différentes protéines du marqueur. Le bleu de bromophénol du tampon de dénaturation permet de suivre la migration.

#### **Transfert sur membrane de nitrocellulose**

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est assuré par électroblot semidry. Une différence de potentiel (14 V, 3mA par cm<sup>2</sup> de membrane de nitrocellulose) appliquée perpendiculairement au gel de polyacrylamide, entre celui-ci et une membrane de nitrocellulose permet le transfert des protéines chargées négativement sur la membrane, qui devient une réplique parfaite du gel. La vitesse de transfert des protéines est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

#### **Immunodétection**

Cette technique de révélation permet de détecter spécifiquement la protéine d'intérêt en utilisant un anticorps primaire dirigé contre un épitope de celle-ci ou un tag qui lui est fusionné. Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, les sites susceptibles de lier celui-ci de façon non spécifique sont saturés en incubant la membrane *overnight* à 4°C avec une solution de PBS 1X-Tween 0,05%-Lait en poudre 5%.

- La membrane est incubée une heure sous agitation en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 1%.
- Elle est lavée cinq fois trois minutes avec du PBS 1X-Tween 0,05%.
- Elle est incubée sous agitation en présence d'un anticorps secondaire dilué dans du PBS1X-Tween 0,05%- Lait en poudre 1%. Il reconnaît le fragment constant de l'anticorps primaire et permet de révéler la présence de la protéine, grâce à la peroxydase qui lui est conjuguée. Cette enzyme catalyse en effet l'oxydation du luminol, une réaction produisant de la lumière.
- Avant révélation, la membrane est de nouveau lavée cinq fois trois minutes avec du PBS 1X-Tween 0,05%.

<b>Anticorps primaire (Molecular Probes Invitrogen) Dilution</b>	Anti-YFP 1 : 2000
<b>Anticorps secondaire</b>	Anti-souris 1 :5000





**Révélation**

La révélation se déroule en chambre noire. La face de la membrane ayant fixé les protéines est recouverte par la solution de révélation. On expose la membrane à un film autoradiographique pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal.

L'activité maximale de la peroxydase est atteinte 1 à 5 minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps. Le film est plongé dans un bain de révélateur destiné à faire apparaître les bandes, puis dans la solution de fixation avant d'être rincé à l'eau de ville et de sécher à l'air libre.

**Techniques relatives à l'utilisation des levures**

- **Principe du double Hybride**

En guise de rappel, le principe du double-hybride en levure se base sur l'observation suivante : un facteur de transcription fonctionnel consiste en deux domaines séparables, un domaine de liaison à l'ADN (BD, binding domain) et un domaine de transactivation (AD, activating domain). Dans le système double-hybride, ces deux domaines sont physiquement séparés et sont chacun fusionnés à une protéine d'intérêt (X et Y, respectivement). L'interaction physique entre BD-X et AD-Y peut reconstituer dans l'espace une structure protéique semblable à un facteur de transcription d'un gène rapporteur, lequel est soumis à une régulation grâce aux sites de liaison à l'ADN de BD placé en amont. Nous utilisons les BD et AD du facteur de transcription Gal4p de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression de BD-X et AD-Y est sous le contrôle d'un variant relativement faible du promoteur *ADHI*. Trois gènes rapporteurs, *GAL1::HIS3*, *GAL1::lacZ* et *SPAL10::URA3*, sont intégrés dans le génome des souches de levure utilisées (MaV103 et MaV203). Ils contiennent des sites de liaison pour Gal4p dans leurs promoteurs. En général, une interaction en double-hybride est jugée positive quand l'expression d'au moins deux gènes rapporteurs est activée et quand le candidat positif en double-hybride est négatif lors d'un test d'auto-activation (c'est-à-dire de simple-hybride). La réalisation d'un test double-hybride nécessite la construction d'une protéine hybride « appât » codant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (BD) et l'ORF d'intérêt X, ainsi que la construction en parallèle d'une protéine hybride « proie » codant le domaine d'activation de Gal4p (AD) fusionnée elle-même à l'ORF d'intérêt Y. Ces plasmides sont transformés dans deux souches de levures haploïdes de type conjugatif différent possédant les gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur cible du BD. Ces deux plasmides sont porteurs de marqueurs d'auxotrophie différents pour permettre la sélection des transformants sur un milieu sélectif. Le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs d'intérêt se fait par « spotting ». Il suffit de déposer une goutte (spot) de la première souche et ensuite, lorsque celle-ci est sèche, de déposer par-dessus une goutte de la seconde souche. La présence des deux plasmides dans une seule souche est sélectionnée chez une levure, grâce à sa capacité à croître sur un milieu nécessitant l'expression des marqueurs d'auxotrophie des deux plasmides.



### Contrôle du double-hybride en levure

Les six contrôles utilisés sont :

- vecteurs AD et BD sans insert (contrôle négatif)
- expression d'une interaction relativement faible (entre BD-Rb et AD-E2F)
- expression d'une interaction relativement forte (entre BD-Fos et AD-Jun)
- Gal4p complet+ vecteur AD sans insert
- Expression d'une interaction relativement forte (entre BD-DP et AD-E2F)
- Contrôle pour le test cycloheximide (non réalisé dans cette étude)

### ▪ Transformation levure

Il s'agit de faire entrer un plasmide dans des cellules de levures rendues auparavant compétentes grâce à l'acétate de lithium et au polyéthylène glycol.

- La veille, lancer la levure Mav203 en culture dans 5mL dans YPD. Incuber à 30°C.
- Inoculer 50mL de YPD avec ~2mL de la culture pour avoir une DO de ~0,4. Incuber à 30 °c jusqu'à obtention d'une DO 0,7 0,8
- Centrifuger à 4000rpm pendant 5 à 10'
- Vider le surnageant et resuspendre dans 25mL d'eau dionisée stérile
- Centrifuger à 4000rpm pendant 10'
- Vider le surnageant et resuspendre dans 1mL d'eau de LiAc 100mM
- Transvaser dans un eppendorf et centrifuger 1' à 13000rpm
- Vider le surnageant et resuspendre dans 400µL LiAc 100mM.
- Aliquoter par 50µL (en fonction du nombre de transformation à effectuer)
- Dénaturer l'ADN de sperme de Saumon (10mg/mL) 5' à 100°C et puis mettre sur glace.
- Centrifuger les aliquots 1' à 14000rpm et enlever le surnageant à la pipette
- Ajouter dans l'ordre sur le culot de cellules :
  - 240µL de PEG 50%
  - 36µL de LiAc 1M
  - 10µL de ssDNA 10mg/mL
  - X mL de plasmide (~4µg)
  - Ajuster à 360 µL avec de l'eau désionisée stérile
- Vortexer vigoureusement et incuber 30' à 30°C
- Réaliser un choc thermique dans un bain à 42°C pendant 30'
- Centrifuger 1' à 14000 rpm et enlever le surnageant
- Resuspendre chaque culot dans 200µL d'eau désionisée stérile
- Etaler 50 à 150µL sur boîte contenant un milieu sélectif et incuber 3 jours à 30°C



## Techniques relative à la microscopie

### ▪ Appareillage

Le microscope employé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER. L'huile d'immersion de type DF utilisée, nous est fournie par la société Cargille et a un indice de réfraction ( $n_D$ ) de 1,5150 +/- 0,0002.

### ▪ Préparation d'échantillons pour la microscopie

#### Agarose pad :

1. Préparer une solution de PBS 1X et d'Agarose 1% dans un erlen.
2. Chauffer au micro-onde afin de dissoudre l'agarose.
3. Déposer 700  $\mu$ l sur une lame de microscope et recouvrir ensuite d'une seconde lame.
4. Laisser solidifier puis mettre les agarose pads dans une chambre humide pour empêcher qu'ils sèchent.

#### Lorsque les agarose pads sont prêts :

1. Détacher doucement les deux lames.
2. Déposer 1  $\mu$ l de culture à  $DO_{600}$  égale à 0.5.
3. Recouvrir d'une lame porte objet.
4. Découper, à l'aide d'un scalpel, l'agarose non recouvert par la lame porte objet.
5. Sceller le tout avec une solution de VALAP.
6. Observation sous le microscope

#### Agarose pad pour time-lapse pour *B. abortus*

LB agar Miller	0,75 gr
Yeast extract	0,5 gr
Bacto peptone	0.5 gr
Agar	0,2 gr
H2O bidistillée	50 $\mu$ l

Auto-claver maximum 15min la première fois. Conserver à 4°C, Passer au micro-onde afin de dissoudre l'agarose à chaque nouvelle utilisation

### ▪ Molécules fluorescentes

Nom	$\lambda$ excitation en nm	$\lambda$ émission en nm	Révélation
DAPI	358	461	dsADN
SYTO9	480	500	ADN (toutes les cellules)
FM4-64	558	734	Constituants membranaires
PI	490	635	ADN (cellules mortes)
YFP	480	535	Protéine, chimérique ou non



# **Bibliographie**





## Bibliographie

- Ausmees, N., and Jacobs-Wagner, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annual review of microbiology* 57, 225-247.
- Barnett, M.J., Hung, D.Y., Reisenauer, A., Shapiro, L., and Long, S.R. (2001). A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 183, 3204-3210.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 14, 920-924.
- Batut, J., Andersson, S.G., and O'Callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nature reviews* 2, 933-945.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2002). Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Molecular microbiology* 43, 945-960.
- Boschioli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current opinion in microbiology* 4, 58-64.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS microbiology reviews* 32, 208-233.
- Bowers, L.M., Shapland, E.B., and Ryan, K.R. (2008). Who's in charge here? Regulating cell cycle regulators. *Current opinion in microbiology* 11, 547-552.
- Brassinga, A.K., Siam, R., McSween, W., Winkler, H., Wood, D., and Marczynski, G.T. (2002). Conserved response regulator CtrA and IHF binding sites in the alpha-proteobacteria *Caulobacter crescentus* and *Rickettsia prowazekii* chromosomal replication origins. *Journal of bacteriology* 184, 5789-5799.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Research in microbiology* 157, 93-98.
- Chien, P., Perchuk, B.S., Laub, M.T., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2007). Direct and adaptor-mediated substrate recognition by an essential AAA+ protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6590-6595.
- Dajkovic, A., and Lutkenhaus, J. (2006). Z ring as executor of bacterial cell division. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 11, 140-151.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Holtje, J.V., and Schwarz, H. (1997). Murein segregation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 179, 2823-2834.
- Domian, I.J., Quon, K.C., and Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90, 415-424.
- Eckfeldt, C.E., Mendenhall, E.M., Flynn, C.M., Wang, T.F., Pickart, M.A., Grindle, S.M., Ekker, S.C., and Verfaillie, C.M. (2005). Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS biology* 3, e254.
- Errington, J. (1996). Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Trends Genet* 12, 31-34.
- Evinger, M., and Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of bacteriology* 132, 294-301.



- Foster, G., Jahans, K.L., Reid, R.J., and Ross, H.M. (1996). Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *The Veterinary record* 138, 583-586.
- Gilles-Gonzalez, M.A., and Gonzalez, G. (1993). Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *The Journal of biological chemistry* 268, 16293-16297.
- Godfroid, J., and Kasbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary microbiology* 90, 135-145.
- Gonczy, P., and Rose, L.S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, 1-20.
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends in microbiology* 12, 361-365.
- Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhaute, J., Letesson, J.J., Jacobs-Wagner, C., and De Bolle, X. (2007). The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *The EMBO journal* 26, 1444-1455.
- Hecht, G.B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J.M., and Newton, A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO journal* 14, 3915-3924.
- Hung, D.Y., and Shapiro, L. (2002). A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13160-13165.
- Iniesta, A.A., McGrath, P.T., Reisenauer, A., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10935-10940.
- Jacobs-Wagner, C. (2004). Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Molecular microbiology* 51, 7-13.
- Jacobs, C., Hung, D., and Shapiro, L. (2001). Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4095-4100.
- Jenal, U., and Stephens, C. (2002). The *Caulobacter* cell cycle: timing, spatial organization and checkpoints. *Current opinion in microbiology* 5, 558-563.
- Kennis, J.T., and Crosson, S. (2007). Microbiology. A bacterial pathogen sees the light. *Science (New York, NY)* 317, 1041-1042.
- Ko, J., and Splitter, G.A. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical microbiology reviews* 16, 65-78.
- Kobayashi, H., De Nisco, N.J., Chien, P., Simmons, L.A., and Walker, G.C. (2009). *Sinorhizobium meliloti* CpdR1 is critical for co-ordinating cell cycle progression and the symbiotic chronic infection. *Molecular microbiology* 73, 586-600.
- Kubista, M., Akerman, B., and Norden, B. (1987). Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26, 4545-4553.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q., and Leibler, S. (2005). Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169, 1807-1814.
- Lam, H., Matroule, J.Y., and Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Developmental cell* 5, 149-159.



- Latch, J.N., and Margolin, W. (1997). Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 179, 2373-2381.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual review of genetics* 41, 121-145.
- Laub, M.T., McAdams, H.H., Feldblyum, T., Fraser, C.M., and Shapiro, L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science (New York, NY)* 290, 2144-2148.
- Mantel, C.R., Wang, R.H., Deng, C., and Broxmeyer, H.E. (2008). Sirt1, notch and stem cell "age asymmetry". *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 2821-2825.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Udden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 910-938.
- Matroule, J.Y., Lam, H., Burnette, D.T., and Jacobs-Wagner, C. (2004). Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* 118, 579-590.
- Mitchell, A., Romano, G.H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., Dahan, O., and Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature* 460, 220-224.
- Newton, A., and Ohta, N. (1990). Regulation of the cell division cycle and differentiation in bacteria. *Annual review of microbiology* 44, 689-719.
- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E.G., Sommer, J.M., and Newton, A. (1992). A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10297-10301.
- Ohta, N., and Newton, A. (2003). The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *Journal of bacteriology* 185, 4424-4431.
- Poindexter, J.S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiological reviews* 45, 123-179.
- Purcell, E.B., and Crosson, S. (2008). Photoregulation in prokaryotes. *Current opinion in microbiology* 11, 168-178.
- Quon, K.C., Marczynski, G.T., and Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84, 83-93.
- Robertson, R.W., Lynch, A.C., Beasley, S.W., and Morreau, P.N. (1999). Early experience with the laparoscopic ace procedure. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 69, 308-310.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* 32, 234-258.
- Schlaflfli, P., Borter, E., Spielmann, P., and Wenger, R.H. (2009). The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 66, 876-883.
- Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Pfeiffer, M., Kruger, M., Cloeckert, A., and Tomaso, H. (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)* 9, 153-156.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N., and Corbel, M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary microbiology* 90, 479-496.



- Sharp, M.D., and Pogliano, K. (1999). An *in vivo* membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14553-14558.
- Sommer, J.M., and Newton, A. (1989). Turning off flagellum rotation requires the pleiotropic gene *pleD*: *pleA*, *pleC*, and *pleD* define two morphogenic pathways in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* 171, 392-401.
- Stewart, E., and Taddei, F. (2005). Aging in *Escherichia coli*: signals in the noise. *Bioessays* 27, 983.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Tien, A.C., Rajan, A., and Bellen, H.J. (2009). A Notch updated. *The Journal of cell biology* 184, 621-629.
- Tomlinson, A.D., and Fuqua, C. (2009). Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Current opinion in microbiology* 12, 708-714.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhoute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast (Chichester, England)* 20, 739-746.
- Walhout, A.J., and Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods (San Diego, Calif)* 24, 297-306.
- Wang, S.P., Sharma, P.L., Schoenlein, P.V., and Ely, B. (1993). A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 630-634.
- Wetlaufer, D.B., and Ristow, S. (1973). Acquisition of three-dimensional structure of proteins. *Annual review of biochemistry* 42, 135-158.
- Wodak, S.J., and Janin, J. (1981). Location of structural domains in protein. *Biochemistry* 20, 6544-6552.
- Wortinger, M.A., Quardokus, E.M., and Brun, Y.V. (1998). Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* 29, 963-973.
- Wu, J., Ohta, N., and Newton, A. (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1443-1448.
- Yamashita, Y.M., and Fuller, M.T. (2008). Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *The Journal of cell biology* 180, 261-266.