



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Intégration de PdhS, une histidine kinase essentielle, et ses interactants potentiels dans le réseau de régulation impliquant DivK chez Brucella abortus

Van der Henst, Charles

Award date:
2007

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**Intégration de PdhS, une histidine kinase essentielle,
et ses interactants potentiels dans le réseau de
régulation impliquant DivK chez *Brucella abortus***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Charles Van der Henst

Juin 2007

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>

Intégration de PdhS, une histidine kinase essentielle, et ses interactants potentiels dans le réseau de régulation impliquant DivK chez *Brucella abortus*

Van der Henst Charles

Résumé :

A l'instar des cellules eucaryotes, la génération d'asymétrie est aussi observée dans le règne procaryote. Ces 20 dernières années, une bactérie a émergé comme modèle de génération d'asymétrie et de différenciation. *Caulobacter crescentus*, une α -protéobactérie aquatique non pathogène, possède un cycle cellulaire complexe, couplant la division cellulaire à la réplication de son matériel génétique ainsi qu'à la génération d'organes polaires. L'existence de réseaux de régulation interconnectés faisant intervenir des protéines de la famille du système de transduction du signal permet ce couplage d'évènements clés. Un mini réseau est caractérisé. Deux histidines kinases, nommées DivJ et PleC, sont responsables de la localisation et de l'activité d'un régulateur de réponse clé, DivK, impliqué dans le couplage des évènements cellulaires. La bactérie étudiée au sein du laboratoire est *Brucella abortus*. Des homologues de chacun de ces acteurs clés sont retrouvés chez *Brucella* spp.. Cependant, un nouvel acteur, homologue à DivJ et PleC, est potentiellement impliqué dans ce réseau chez *Brucella* spp.. Nommée PdhS (PleC/DivJ-Homologous Sensor), cette histidine kinase essentielle est localisée au pôle et pourrait être responsable de l'état de phosphorylation de DivK chez *Brucella abortus*. Trois interactants potentiels de PdhS, nommés PicC, PipP et FumC, ont été identifiés par des tests double hybride en levure.

Au cours de ce travail, nous avons initié des approches biochimiques (co-immunoprécipitation) et génétiques (génération d'allèles mutés de *pdhS*) pour caractériser l'interaction entre PdhS et ses partenaires putatifs. Nous nous sommes particulièrement intéressés à FumC, une fumarate insensible au choc oxydatif et à la carence en fer, au contraire de FumA, qui est sensible à ces conditions. Nous avons montré que FumC-YFP peut se localiser au pôle chez *Brucella abortus*, alors que FumA, fumarate hydratase principale chez *Escherichia coli*, fusionnée à l'YFP ne présente pas cette localisation polaire. Par ailleurs, la délétion des gènes *fumC* et *pipP* ne délocalise pas PdhS-YFP du pôle, ce qui suggère que FumC et PipP ne sont pas responsables de la localisation au pôle de PdhS. Enfin, l'étude de la localisation d'une protéine de fusion mutée, PdhSH805A-YFP, montre que la localisation subcellulaire de PdhS ne dépend pas non plus de sa phosphorylation, puisque cette fusion est toujours localisée au pôle.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur : Prof. X. De Bolle

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à ma famille, à mes parents ainsi qu'à mes grands-parents sans qui et sans l'ombre d'un doute ce mémoire n'aurait tout simplement pas pu se concrétiser. Du fond du cœur, Baby et Pépé, maman et papa, Mathilde, merci. Baby et Pépé, vous êtes les meilleurs grands-parents du monde et vous pouvez être fiers de ce que vous avez accomplis. Merci à toi papa pour la confiance que tu m'as accordée tout au long des mes études, ça me va droit au cœur, sache le. Merci à toi maman pour ton soutien tout au long de ces études, tu m'as apporté beaucoup plus que tu ne le penses. Petite pensée pour toi, ma petite sœur adorée ; je te souhaite beaucoup de courage pour cette aventure que tu vas bientôt démarrer. Ton intérêt ainsi que ta passion pour la science seront tes grands atouts. Et de toute manière, tu pourras toujours compter sur ton frère, quoiqu'il se passe. Merci à toi Renaud, je sais que tu es là si j'ai besoin de toi et c'est réciproque, sois en sûr. Petite pensée pour mon parrain et coach. Autant en volley que dans la vie, il est toujours essentiel d'avoir un phare lorsque le temps se couvre un peu. Merci beaucoup parrain, tout simplement.

Je tiens particulièrement à te remercier ma puce. Et oui Marie, cela fait maintenant deux belles années que je partage ma vie avec toi. Tu fais de moi l'homme le plus heureux de par l'amour et la gentillesse que tu me consacres jour après jour. Merci d'être à tout moment présente avec ce sourire si magnifique. Garde bien cette simplicité et cette gentillesse, qualités qui se font rares de nos jours.

Je tiens à remercier les Professeurs Xavier DeBolle et Jean-Jacques Letesson ainsi que toutes les personnes travaillant à l'URBM pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et permis de réaliser ce mémoire. Quelle chouette ambiance de travail : humour, entraide et convivialité étaient tous les jours au rendez-vous. Merci Julien pour ton aide, ta disponibilité et les blagues du « Chat » chaque semaine, merci dédé pour tes conseils et la thérapie des bonbons, merci marie d'être si sympathique au labo, merci aux deux Sophie(s) pour leur aide et bon courage à toi pour la rédaction de ta thèse. Merci de tes conseils Gégé. Pensées au couple d'immunologistes Richard-Mathieu. Merci à Monique pour les vaisselles et les autoclaves, sans toi le labo ne tournerait pas. A tous, merci, 1000 fois merci. Remerciements tout particuliers à mon tuteur, Johann pour sa sympathie, sa disponibilité, sa patience. D'ailleurs, qu'aurait il bien pu faire de moi sans la dernière ? J'ai appris énormément avec toi, Johann, et ce dans la bonne humeur et je t'en remercie, tout simplement.

Salutations à l'équipe de Volley. Merci les gars pour votre cohésion et votre sympathie autant en match qu'en dehors du terrain. Vous êtes pour moi beaucoup plus que des coéquipiers. Pensées également pour mon groupe de musique, Deven. Nous sommes des amis avant d'être un groupe. Merci pour toutes ces répétitions, ces concerts et ces soirées. Je vous adore. Merci également à toi, Yvain, compagnon d'escalade, de roller et ami, pour ton soutien et ton humour décalé. Merci à Christian pour la faute d'orthographe découverte dans mon mémoire.

Et pour terminer, je tiens à remercier les membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire. J'espère sincèrement avoir réussi à susciter votre intérêt.

Liste des abréviations utilisées

Abréviation	Nom complet	Explication complémentaire
AD	Activating domain	Domaine de transactivation de Gal4
Amp	Ampicilline	Antibiotique
BD	Binding domain	Domaine de liaison à l'ADN de Gal4
<i>bla</i>	b-lactamase	Gène de résistance à l'ampicilline
<i>cat</i>	Cm-acétyltransférase	Gène de résistance au chloramphénicol
cds	Coding sequence	Séquence codante d'une protéine
DIC	Differential interference contrast	Mode d'observation en microscopie photonique
DO	Densité optique	Mesure, entre autre, le nombre de bactéries
GW TM	Gateway TM	Technique de clonage par recombinaison
H	Histidine	Acide aminé
HK	Histidine kinase	Acteur du système à deux composants
<i>kan^R</i>	Néomycine phosphotransférase	Gène de résistance à la kanamycine
Hpt	Histidine phosphotransférase	Acteur du système à deux composants
Kb	Kilopaires de base	10 ³ 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
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le jaune

Table des matières

AVANT-PROPOS.....	- 2 -
INTRODUCTION.....	- 4 -
• Génomes procaryotes et évolution	- 4 -
Les alpha-protéobactéries, un groupe diversifié ^(Batut et al., 2004)	- 4 -
Evolution des génomes	- 4 -
Notion d'adaptation.....	- 5 -
• Réseaux de régulations transcriptionnelles	- 5 -
Transduction du signal : système à deux composants et phosphorelay	- 5 -
• <i>Caulobacter crescentus</i>, alpha-protéobactérie modèle	- 6 -
Dimorphisme et cycle cellulaire : notion d'horloge biologique	- 6 -
Avantages de l'utilisation de <i>Caulobacter crescentus</i> en tant que modèle	- 8 -
Régulation "just in time"	- 8 -
Assemblage du flagelle et cascade transcriptionnelle hiérarchisée	- 8 -
CtrA, le contremaître moléculaire	- 9 -
Le régulon de CtrA.....	- 9 -
Le régulateur régulé... et autorégulé.....	- 9 -
La voie de transduction du signal impliquée dans l'état de phosphorylation de CtrA	- 10 -
Les acteurs CckA et ChpT.....	- 10 -
Les acteurs DivJ-PleC-DivK	- 11 -
• Le concept d'asymétrie	- 13 -
Implication du peptidoglycan dans la génération d'asymétrie, une nouvelle piste ? (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005)	- 14 -
• Asymétrie chez les α-protéobactéries	- 15 -
Division asymétrique	- 15 -
• <i>Brucella abortus</i>, entre tradition et modernité	- 15 -
Réseau de régulation transcriptionnelle ^(Bellefontaine et al., 2002)	- 16 -
Caractérisation du réseau de régulation impliquant DivK ainsi que PdhS chez <i>Brucella abortus</i> (Hallez et al., 2007b)	- 16 -
PdhS, un nouvel acteur dans le contrôle de DivK chez <i>Brucella abortus</i> ^(Hallez et al., 2007b)	- 17 -
Localisation de PdhS.....	- 17 -
Interactants de PdhS.....	- 18 -
OBJECTIFS DU MEMOIRE	- 20 -
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	- 21 -
• Caractérisation des interactants de PdhS	- 22 -
<u>Co-ImmunoPrécipitation (CoIP)</u>	- 22 -
Fusion PdhS-TAP-Tag	- 22 -
Fusions PicC-Flag, PipP-Flag et FumC-Flag	- 23 -
<u>Mutants obtenus</u>	- 24 -
<u>Profils de localisation chez <i>Brucella abortus</i></u>	- 26 -
Localisation de PdhS-YFP chez <i>Brucella abortus</i>	- 26 -
Construction des différentes souches	- 27 -
Localisation de FumC-YFP chez <i>Brucella abortus</i>	- 28 -
Localisation de FumA-YFP chez <i>Brucella abortus</i>	- 29 -
Localisation de PipP-YFP chez <i>Brucella abortus</i>	- 29 -

Localisation de PicC-YFP chez <i>Brucella abortus</i>	- 30 -
<u>Profils de localisation chez les mutants <i>Brucella abortus</i> ΔfumC et ΔpipP</u>	- 31 -
Localisation de PdhS-YFP chez la souche <i>Brucella abortus</i> Δ fumC	- 31 -
Localisation de PdhS-YFP chez la souche <i>Brucella abortus</i> Δ pipP	- 32 -
Localisation de FumC-YFP chez la souche <i>Brucella abortus</i> Δ fumC	- 33 -
Localisation de FumA-YFP chez la souche <i>Brucella abortus</i> Δ fumC	- 34 -
Localisation de PipP-YFP chez la souche <i>Brucella abortus</i> Δ pipP	- 35 -
<u>Discussion</u>	- 36 -
• Obtention d'allèles mutés du gène <i>pdhS</i>	- 39 -
<u>IDA : interaction deficient allele</u>	- 39 -
<u>Substitution Histidine en Alanine</u>	- 41 -
<u>Discussion</u>	- 43 -
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	- 45 -
MATERIELS ET METHODES	- 48 -
• Souches et plasmides	- 48 -
Souches	- 48 -
Plasmides	- 48 -
• Milieux de culture	- 50 -
• Tampons et solutions	- 51 -
• Techniques relatives à l'ADN	- 52 -
PCR (Polymerase chain reaction)	- 52 -
Électrophorèse en gel d'agarose	- 53 -
Restriction de plasmide	- 54 -
Ligation	- 54 -
Purification sur gel	- 55 -
Purification sur colonne	- 55 -
Minipréparation de plasmide	- 55 -
Séquençage	- 56 -
Clonage Gateway™ (Fig36)	- 57 -
• Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	- 58 -
Préparation de cellules <i>Escherichia coli</i> électro-compétentes (DH10B/S17-1)	- 58 -
Transformation bactérienne par électroporation	- 59 -
Conjugaison	- 59 -
• Techniques relatives à l'utilisation de levures	- 61 -
Principe du double-hybride en levure	- 61 -
• Techniques relative à la microscopie	- 61 -
Appareillage	- 61 -
Préparation d'échantillons pour la microscopie	- 62 -
Molécules fluorescentes	- 62 -
BIBLIOGRAPHIE	- 63 -

« L'inconnu est autour de nous à chaque moment.
C'est là que tu dois rechercher la connaissance. »

« C'est lorsque nous croyons savoir quelque chose
qu'il faut justement réfléchir un peu plus profondément. »

Frank Herbert (1920-1986) : Extrait du livre
Les enfants de Dune (Cycle de Dune)

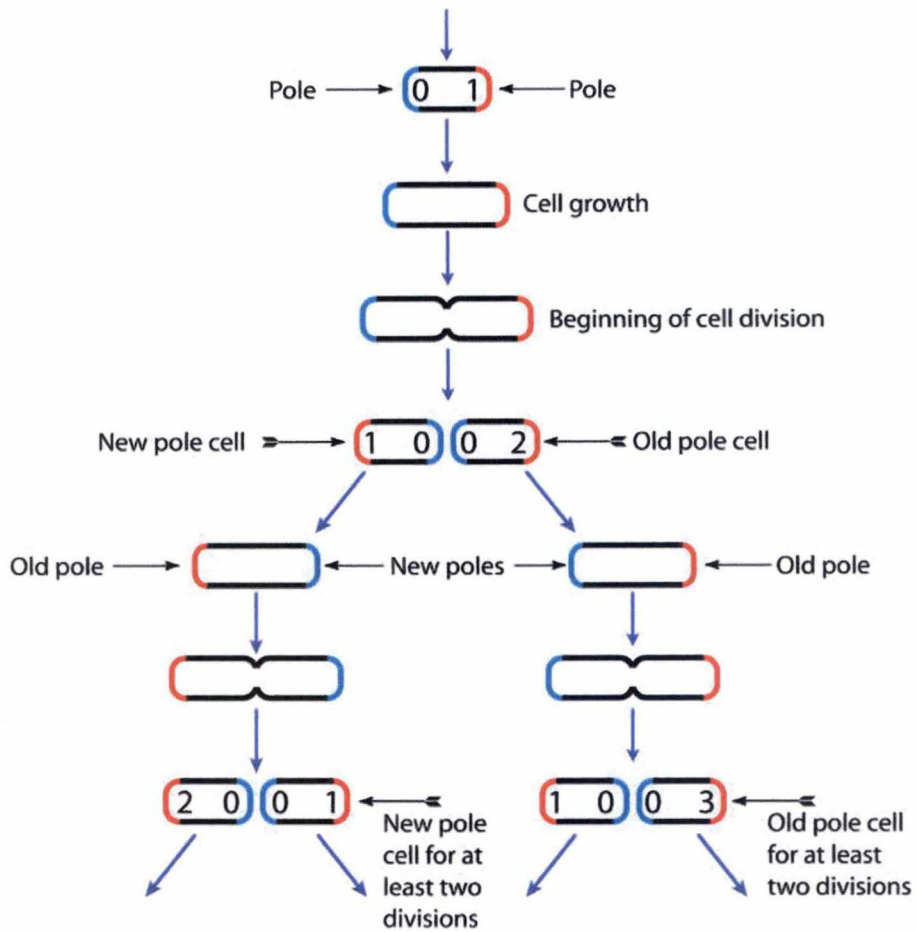


Figure 1 : Origine des pôles cellulaires après plusieurs divisions. Les chiffres indiquent le nombre d'évènements de division subit par le pôle ainsi marqué, les nouveaux pôles sont en couleur bleue, les pôles anciens sont en couleur rouge (Stewart *et al.*, 2005).

Avant-propos

L'étude du développement cellulaire représente un domaine de la Biologie en pleine expansion. Le plus fascinant est de voir qu'à partir d'une cellule unique, des cellules spécialisées telles que les neurones, les cellules musculaires et bien d'autres types cellulaires peuvent s'associer en tissus et former ainsi des organes complexes. Une question centrale de cette branche de la biologie concerne le fait qu'une cellule, après division, génère deux cellules morphologiquement différentes malgré un matériel génétique identique. Cette constatation s'applique au règne eucaryote mais également, de plus en plus, au règne procaryote.

La génération d'asymétrie chez les bactéries fait appel à des processus de régulations complexes dont certains seront décrits lors de ce mémoire. Cependant et plus fondamentalement, la notion d'asymétrie représente une caractéristique inhérente à la division cellulaire. En effet, la répartition inégale de constituants membranaires après division cellulaire est systématique. La cellule mère se divise grâce à la formation d'un anneau de septation placé en un endroit privilégié correspondant au site de synthèse d'une nouvelle enveloppe cellulaire (paroi et membrane cellulaire). Les constituants de cet anneau de septation représentent donc les futurs matériaux des nouveaux pôles des cellules filles. Les deux cellules filles résultant de la cytokinèse hériteront donc systématiquement d'une enveloppe cellulaire plus ancienne d'origine maternelle ainsi que d'une autre formée d'éléments membranaires nouvellement synthétisés. Les notions d'ancien et de nouveau pôles deviennent dès lors intrinsèquement liées au phénomène de division (**Fig1**). L'existence d'une distinction entre ancien et nouveau pôle implique que la cellule mère se divisera en deux cellules filles d'âge différent.

Après de multiples divisions, l'ancien pôle cellulaire devient de plus en plus ancien (**Fig1**). Il est démontré que chez *Caulobacter crescentus* et *Escherichia coli*, les cellules plus anciennes se divisent moins fréquemment par rapport à celles plus jeunes (Ackermann *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2005). Un phénomène de sénescence est mis en évidence chez les procaryotes. Cette branche de la recherche ne s'applique que depuis peu aux unicellulaires. Dans les années 1960-70, des biologistes étudient le phénomène de vieillissement chez des champignons (Osiewacz, 2002). Ensuite, dans les années 1980, ce phénomène de sénescence est observé chez la levure qui deviendra un modèle dans l'étude du vieillissement cellulaire (Jazwinski, 1999). En 2003, un phénomène de sénescence est mis en évidence chez une α -protéobactérie aquatique nommée *Caulobacter crescentus* (Ackermann *et al.*, 2003). Cette bactérie montre un dimorphisme évident. Ce fut ensuite le tour de la bactérie modèle de laboratoire, *Escherichia coli*, de montrer un phénomène de vieillissement cellulaire mis en évidence en 2005 (Stewart *et al.*, 2005). Il est montré que l'origine plus ancienne du pôle hérité par les cellules filles suffit à modifier le fitness des cellules filles, entravant le renouvellement de structures moléculaires ; ce qui mène au vieillissement de la cellule concernée.

Le concept d'asymétrie représente une condition fondamentale au phénomène de sénescence. En effet, deux cellules se divisant exactement symétriquement vieilliraient de la même manière, certains déchets cellulaires et autres défauts se répartissant équitablement entre les deux cellules filles. Le concept de vieillissement cellulaire était, jusqu'à présent, associé aux organismes présentant un phénotype évident de dimorphisme après division cellulaire. En effet, la mise en évidence du phénomène de sénescence est plus aisée chez des organismes montrant clairement une asymétrie, une des deux cellules filles pouvant être suivie et étudiée. Dès lors, le concept de sénescence ne fut que très tard associé au monde des procaryotes.

Introduction

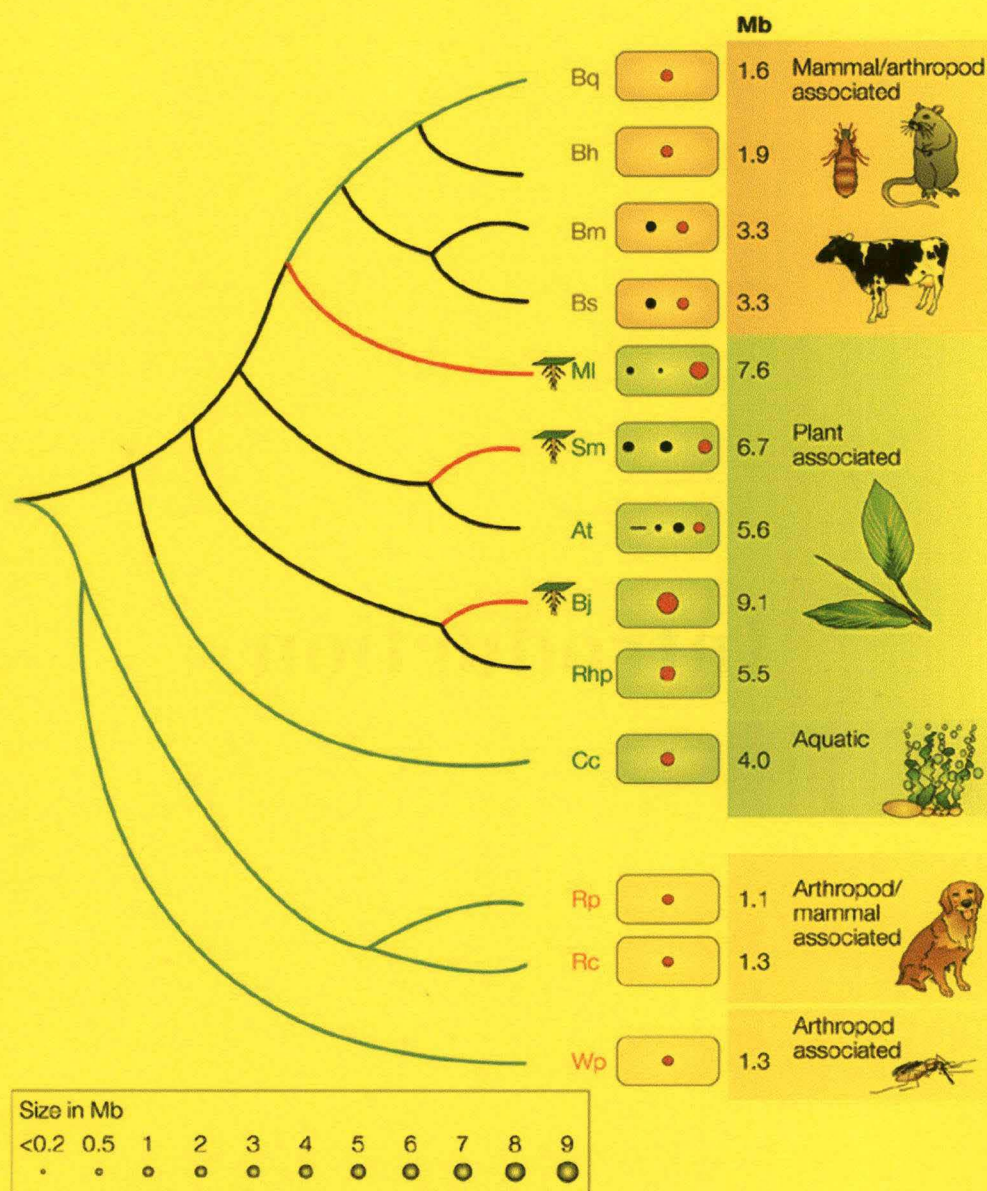


Figure 2 : Illustration de la diversité de génomes et de styles de vie au sein des α -protéobactéries. Les liens phylogénétiques de 13 α -protéobactéries dont la séquence complète du génome est disponible sont montrés. Les branches bleues correspondent à une évolution du génome par perte de gènes. Les branches noires correspondent à une taille de génome moyenne. Tandis que les branches rouges correspondent à une évolution du génome par gain de gènes. La grandeur des ronds symbolise la taille des réplicons de chaque bactérie. At, *Agrobacterium tumefaciens* ; Bh, *Bartonella henselae* ; Bj, *Bradyrhizobium japonicum* ; Bm, *Brucella melitensis* ; Bq, *Bartonella quintana* ; Bs, *Brucella suis* ; Cc, *Caulobacter crescentus* ; Ml, *Mesorhizobium loti* ; Sm, *Sinorhizobium meliloti* ; Rc, *Rickettsia conorii* ; Rhp, *Rhodopseudomonas palustris* ; Rp, *Rickettsia prowazekii* ; Wp, *Wolbachia pipientis*. A droite, style de vie ou hôte de la bactérie (Batut *et al.*, 2004).

Introduction

• Génomes procaryotes et évolution

Les alpha-protéobactéries, un groupe diversifié (Batut *et al.*, 2004)

La comparaison de nombreux génomes procaryotes intégralement séquencés est rendue de nos jours accessible (Lu *et al.*, 2006). La classe des α -protéobactéries représente un modèle intéressant dans l'étude de l'évolution des génomes procaryotes. En effet les α -protéobactéries sont caractérisées par des styles de vie radicalement différents et ces bactéries évoluent dans des conditions environnementales variées (Teyssier *et al.*, 2004) (Fig2). De fait, le terme "Proteo" a pour origine le nom d'un ancien dieu grec, Protée, qui pouvait à volonté changer de formes. Parmi les microorganismes de cette classe on retrouve des pathogènes d'animaux intracellulaires facultatifs tels *Brucella abortus* (bactérie étudiée au sein du laboratoire) et *Bartonella henselae* ou obligatoires tel *Rickettsia prowazekii* mais également des pathogènes de plantes comme *Agrobacterium tumefaciens*. Certaines bactéries ont développé une relation symbiotique avec des arthropodes comme *Wolbachia pipientis*, mais également avec des cellules végétales tels *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti*. Certaines sont des bactéries aquatiques telle *Caulobacter crescentus* ou encore du sol comme *Ochrobactrum anthropi* et *Ochrobactrum intermedium* (Teyssier *et al.*, 2003; Batut *et al.*, 2004). Une caractéristique générale concernant les α -protéobactéries pathogènes décrites jusqu'à présent repose sur la chronicité de leurs infections, reflet d'un lien étroit établi avec la cellule hôte. En outre, concernant la classe des α -protéobactéries, l'organisation et la taille des génomes ainsi que la forme cellulaire présentent également une grande hétérogénéité (Dobrindt and Hacker, 2001, Teyssier *et al.*, 2005).

Evolution des génomes

Le génome peut au cours de l'évolution acquérir ou éliminer des séquences génomiques de grandes ou petites tailles, et ce la plupart du temps en corrélation avec le style de vie du microorganisme. Certaines bactéries intracellulaires "baignent" dans les métabolites de leur cellule hôte, ce qui signifie qu'elles n'ont plus besoin de garder dans leur génome les gènes encodant ces différents métabolites. Ainsi, pour les bactéries du genre *Rickettsia*, parasites intracellulaires obligatoires, 24% de leur génome contient des séquences non codantes, représentant une des plus hautes proportions détectées parmi les génomes procaryotes (Andersson *et al.*, 1998). On suppose que le lien avec la cellule hôte est caractérisé par l'invariance de l'environnement, le génome des bactéries intracellulaires évoluera par pertes de gènes, gènes qui étaient auparavant utiles pour faire face à des conditions qui ne se présentent plus. Ces bactéries passeraient alors du stade pathogène intracellulaire facultatif au stade pathogène obligatoire. La mitochondrie représente un stade très avancé dans cette relation étroite établie entre les α -protéobactéries et leur cellule hôte eucaryote. De plus, les

bactéries du genre *Rickettsia* sont phylogénétiquement les organismes les plus proches des mitochondries identifiés à ce jour (Andersson *et al.*, 1998). A l'opposé, les α -protéobactéries libres vivant dans des environnements ouverts comme le sol, l'eau ou en surface des animaux et des plantes possèdent des génomes caractérisés par de multiples voies alternatives afin de faire face au milieu extérieur changeant ; élargissant le panel de signaux reconnus et de réponses fournies (Moreno, 1998). Par exemple, les bactéries extracellulaires sont en contact avec le système immunitaire de l'hôte, sont sujettes à des modifications osmotiques du milieu ainsi que des changements de température, pour ne citer que ces paramètres.

Notion d'adaptation

Les termes d'évolution et d'adaptation représentent deux concepts fondamentaux à la base de l'étude de la biologie. En effet, d'après la théorie de la sélection naturelle proposée par Charles Darwin (1809-1882), les organismes les mieux adaptés à des conditions environnementales particulières sont plus aptes à engendrer une descendance possédant toujours une partie de leurs caractéristiques génétiques. Il est nécessaire pour les organismes vivants de percevoir les conditions environnementales directes dans lesquelles ils se développent afin de survivre à un environnement particulier. Un moyen de percevoir et de s'adapter à des conditions environnementales changeantes s'appuie sur l'utilisation de réseaux de régulations transcriptionnelles. Ces réseaux permettent d'exprimer spécifiquement des gènes dont les produits sont nécessaires à une réponse adaptée en rapport à des stimuli externes et/ou internes (Lozada-Chavez *et al.*, 2006).

• Réseaux de régulations transcriptionnelles

Des mécanismes robustes et malléables à l'échelle évolutive sont indispensables afin de permettre aux microorganismes de résister, à court terme comme à long terme, à ces environnements changeants. Une des principales caractéristiques des α -protéobactéries symbiontes et pathogènes repose sur leur capacité à établir des liens étroits avec leur cellule hôte (Batut *et al.*, 2004). Afin de se multiplier dans une cellule hôte, les pathogènes doivent développer diverses réponses adaptées aux changements de conditions qui les entourent.

Transduction du signal : système à deux composants et phosphorelay

Le principe de ces systèmes repose sur la perception d'un signal qui sera converti en un langage cellulaire menant à l'élaboration d'une réponse adaptée. Les bactéries doivent pouvoir adapter des processus tels que leur cycle de division cellulaire, la biogenèse d'organes moteurs ou encore leur pouvoir pathogène en fonction des conditions environnementales mais également de facteurs cellulaires internes tels le taux de métabolites cellulaires ou le déroulement correct d'étapes du cycle cellulaire pour ne citer qu'eux. Un système efficace utilisé par une majorité de bactéries mais également par certains champignons et plantes est le système à deux composants. Formé comme son nom l'indique de deux acteurs principaux, une histidine kinase senseur (HK) et un régulateur de réponse effecteur (RR), ce système permet à l'organisme d'intégrer des signaux externes et/ou internes (Fig3). L'HK est composée d'un domaine senseur et d'un domaine autokinase, ce dernier étant lui-même composé d'un domaine portant un résidu histidine phosphorylable et d'un

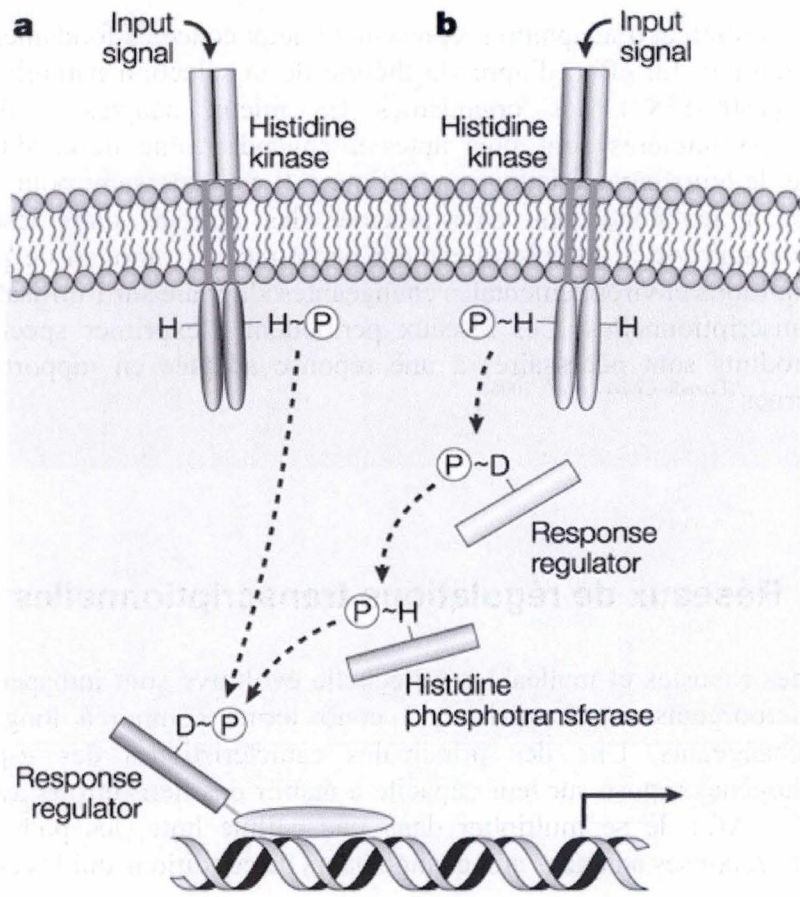


Figure 3 : Représentation schématique de cascades de transduction du signal. En a, système à deux composants. Le transfert du groupement phosphate se réalise d'une histidine kinase au régulateur de réponse. En b, système de phosphorelay comprenant une histidine phosphotransférase et un régulateur de réponse supplémentaires par rapport au système à deux composants. H : Histidine, D : Aspartate, ~P : Groupement phosphate ^(Skerker and Laub, 2004).

domaine de liaison à l'ATP. Quant au régulateur de réponse, il est composé au minimum d'un domaine appelé régulateur ou receveur contenant un résidu aspartate accepteur d'un groupement phosphate. Au domaine régulateur se greffe souvent un domaine effecteur en rapport avec la réponse produite. Le plus souvent, ces RR sont des facteurs de transcription, le domaine effecteur pouvant se lier au promoteur de certains gènes spécifiques avec plus d'affinité lorsque ces RR sont activés par phosphorylation ^(Stock et al., 2000).

Ces réseaux d'intégration fonctionnent par transfert d'un groupement phosphate ^(Hoch, 2000). Suite à la présence d'un stimulus approprié, l'histidine kinase s'autophosphoryle de manière ATP-dépendante sur un résidu histidine conservé (au niveau évolutif). Ensuite ce groupement phosphate est transféré au régulateur de réponse sur un résidu aspartate conservé. Une hypothèse propose que le domaine régulateur inhibe le domaine effecteur du régulateur de réponse. Action négative levée par la fixation du groupement phosphate qui laisse le domaine effecteur libre de réaliser sa fonction ^(Hoch, 2000). Une réponse adéquate est ainsi fournie, la plupart du temps se traduisant par la transcription de gènes spécifiques dont les produits participeront à la réponse au stimulus.

Une autre voie d'intégration du signal existe également, reposant sur le même principe du transfert d'un groupement phosphate sur des résidus conservés, mais faisant intervenir plus de deux acteurs. En effet, dans le système de transduction du signal à multicomposants ou phosphorelays, l'HK autophosphorylée transmet son phosphate à un premier régulateur de réponse composé uniquement d'un domaine aspartate receveur. Ce phosphate est ensuite transféré à une histidine phosphotransférase (Hpt), intermédiaire entre le premier RR à domaine unique et un second RR classique possédant le domaine receveur et le domaine effecteur. Autrement dit, le groupement phosphate est transféré tout le long de cette cascade, en alternance avec un résidu histidine et un résidu aspartate. Enfin, une autre variante existe également, faisant intervenir des histidine kinases hybrides. Dans ce cas, un domaine aspartate receveur est présent au côté carboxy-terminal d'une histidine kinase classique, le groupement phosphate pouvant notamment passer d'une manière intramoléculaire entre l'histidine et l'aspartate de l'histidine kinase hybride.

Plus le nombre d'intermédiaires impliqués dans ces voies de transduction du signal est élevé, plus grandes sont les possibilités de régulation et d'intégrations de divers signaux, permettant des régulations plus fines de ces voies. Un des avantages offerts par ces réseaux est la modularité concernant les domaines des protéines de transduction du signal. En effet, au cours de l'évolution, des HK peuvent s'associer avec différents RR en un réseau moléculaire adapté au mode de vie du microorganisme ^(Stock et al., 2000).

• *Caulobacter crescentus*, alpha-protéobactérie modèle

Dimorphisme et cycle cellulaire : notion d'horloge biologique

Une caractéristique commune à plusieurs genres d' α -protéobactéries (*Brucella*, *Agrobacterium*, *Sinorizobium*, *Hyphomonas* et *Caulobacter*) est leur division asymétrique ^(Lam et al., 2003; Hallez et al., 2004). La bactérie modèle pour l'étude de cette génération d'asymétrie est l' α -protéobactérie gram négative, aquatique et non pathogène *Caulobacter crescentus*. Le fait que, chez *Caulobacter crescentus*, deux cellules filles génétiquement identiques montrent une asymétrie morphologique et fonctionnelle est interpellant. Autrement dit, les deux cellules filles héritent d'un programme de développement distinct. Les bactéries appartenant au genre *Caulobacter* colonisent la majeure partie des milieux aquatiques de la Terre, jouant un rôle

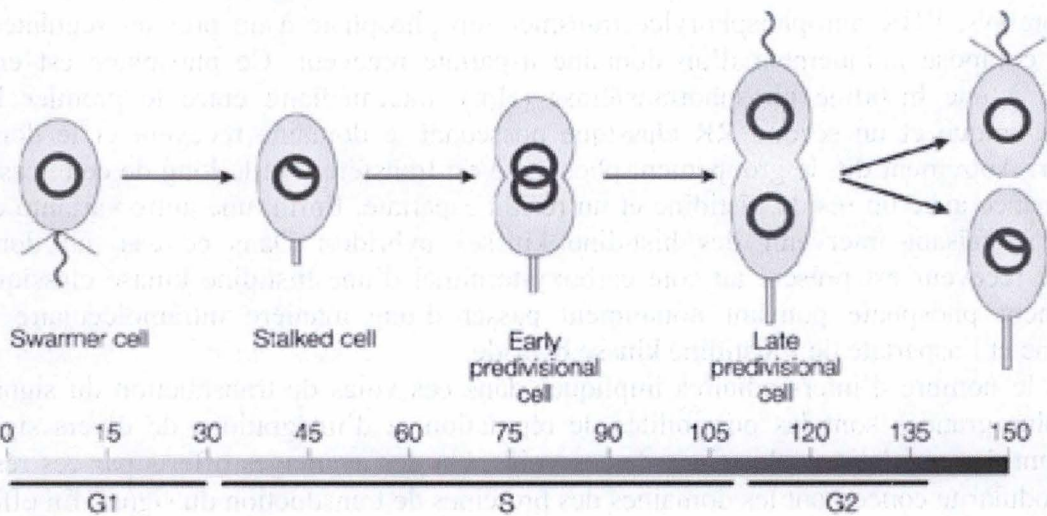


Figure 4 : Schéma du cycle de vie de *Caulobacter crescentus*. Les chiffres situés sur la barre de temps représentent des minutes. Un cercle unique représente une seule copie du chromosome. La forme en "θ" symbolise un chromosome en cours de réplication. G1-S-G2 représentent les différentes phases du cycle cellulaire (Skerker and Laub, 2004)

important dans le cycle du carbone en minéralisant des substrats organiques dissous. *Caulobacter crescentus* représente un modèle concernant l'étude moléculaire de la polarité, du cycle cellulaire, de la génération d'asymétrie et du couplage de ces événements ainsi que de la différenciation cellulaire. D'autres exemples d'asymétrie chez les bactéries sont cités dans la littérature, dont le plus connu correspond au phénomène de sporulation chez *Bacillus subtilis* (Errington, 1996). Notons que dans ce cas, la génération de l'asymétrie résulte principalement de facteurs environnementaux tels l'augmentation de densité de la population ou encore le manque de nutriments. Un phénomène de dimorphisme n'est donc pas généré à chaque division de manière systématique.

Le cycle de vie de *Caulobacter crescentus* est complexe (Poindexter, 1981) (Fig4). En effet, trois stades peuvent être décrits, correspondant chacun à une sous-population cellulaire possédant des caractéristiques morphologiques et physiologiques différentes : les cellules flagellées, pédonculées et prédivisionnelles. Après chaque division, invariablement, deux cellules filles morphologiquement différentes sont générées à partir d'une cellule pédonculée, chacune possédant un destin cellulaire différent : une cellule flagellée mobile ainsi qu'une cellule fixée sur un substrat solide via un pédoncule (également appelée stalk ou prosthéca). La cellule flagellée possède comme organes polaires des pili et un flagelle unique. Munie également d'un appareil de chimiotaxie actif polaire, celle-ci peut se déplacer vers des environnements propices par chimiotaxie, permettant ainsi la dispersion de la population tout en diminuant la compétition intra- et interspécifique.

La cellule flagellée inhibe l'initiation de la réplication de son chromosome. Autrement dit, elle est bloquée en phase G1, et ne possède qu'une unique copie de son chromosome. Elle va devoir se différencier en cellule sessile répliquative durant une phase de transition G1-S afin de pouvoir initier la réplication de son chromosome. Le flagelle est éjecté et les pili sont rétractés. Un pédoncule est ensuite généré à l'ancien pôle précédemment occupé par le flagelle et les pili. Ce pôle pédonculé le restera jusqu'à la mort de cette cellule. La cellule sessile adhère à un substrat solide par une structure particulière à l'extrémité du pédoncule appelée holdfast (Bodenmiller et al., 2004). L'initiation de la réplication du chromosome est engagée durant la phase S caractérisant cette cellule pédonculée. Cette cellule croît pour entrer en stade de cellule prédivisionnelle précoce, la réplication du chromosome se poursuivant. La ségrégation des deux chromosomes, le début de la constriction septale ainsi que la biogenèse d'un flagelle polaire non mobile au pôle opposé au pôle pédonculé se déroulent lors du stade de cellule prédivisionnelle tardive, la cellule poursuivant sa croissance cellulaire vers un stade G2. Cette cellule prédivisionnelle possède alors deux copies de son chromosome. La formation définitive du septum (cytokinèse) permet la séparation de la cellule prédivisionnelle tardive en une cellule flagellée et une cellule pédonculée. Cette septation permet l'acquisition de la mobilité flagellaire ainsi que la biogenèse des pili chez la cellule flagellée et rend compétente la cellule pédonculée pour l'initiation d'un nouveau cycle de réplication. Cette cellule sessile peut effectuer jusqu'à 130 cycles de division (Ackermann et al., 2003).

Le cycle de division chez *Caulobacter crescentus* est comparable à celui des eucaryotes. En effet, chez une cellule eucaryote en voie de division, la phase de croissance (interphase) se subdivise en trois parties et alterne avec la phase mitotique. Par contraste, *Escherichia coli* est capable d'initier la réplication de son chromosome plus de 4 fois avant de se diviser, si bien que les cellules filles héritent d'un chromosome ayant déjà initié plusieurs réplications, ce qui explique un temps de génération très court (environ 20 minutes). Une similitude supplémentaire existe entre les eucaryotes et les procaryotes: un point de non retour caractérise la fin de la phase G1 chez *Caulobacter crescentus* ainsi que chez les cellules eucaryotes. Malgré des conditions devenues défavorables, *Caulobacter crescentus* est incapable de faire marche arrière lorsque ce point est dépassé.

Figure 5: Expression séquentielle des gènes flagellaires de classe I à IV. En a, profil obtenu par microarrays au cours du cycle cellulaire. Les carrés jaunes représentent les gènes activés alors que les carrés bleus représentent les gènes réprimés. En b, représentation schématique du flagelle (Skerker and Laub, 2004).

Le profil d'expression des gènes flagellaires est caractérisé par une expression séquentielle au cours du cycle cellulaire. Les gènes de la classe I sont exprimés en premier, suivis par les gènes de la classe II, III et IV. Cette expression séquentielle est reflétée dans le profil de microarrays, où les carrés jaunes indiquent l'activation des gènes et les carrés bleus indiquent la répression.

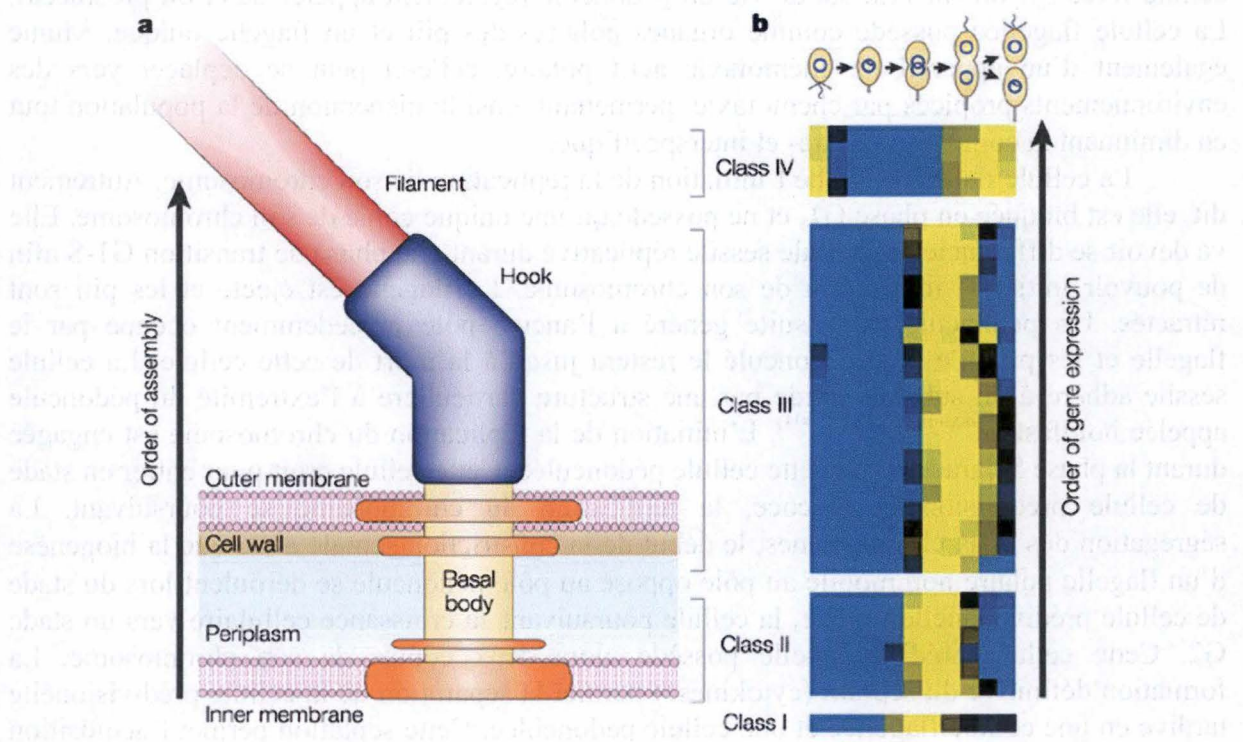


Figure 5 : Expression séquentielle des gènes flagellaires de classe I à IV. En a, profil obtenu par microarrays au cours du cycle cellulaire. Les carrés jaunes représentent les gènes activés alors que les carrés bleus représentent les gènes réprimés. En b, représentation schématique du flagelle (Skerker and Laub, 2004).

Le profil d'expression des gènes flagellaires est caractérisé par une expression séquentielle au cours du cycle cellulaire. Les gènes de la classe I sont exprimés en premier, suivis par les gènes de la classe II, III et IV. Cette expression séquentielle est reflétée dans le profil de microarrays, où les carrés jaunes indiquent l'activation des gènes et les carrés bleus indiquent la répression.

Avantages de l'utilisation de *Caulobacter crescentus* en tant que modèle

- Le génome de *Caulobacter crescentus* entièrement séquencé constitue une ressource utile pour les approches protéomiques et génomiques ^(Niërman et al., 2001).
- Les appendices polaires rendent l'observation du phénomène de dimorphisme plus aisée.
- Un autre avantage offert par le dimorphisme de *Caulobacter crescentus* réside dans la possibilité d'obtenir des populations synchronisées, en séparant les cellules flagellées des autres sous-populations ^(Evinger and Agabian, 1977).
- Notons enfin que le temps de génération de cette bactérie est relativement court (1h30 en conditions optimales pour *Caulobacter crescentus*).
- L'utilisation d'une bactérie modèle non pathogène est plus aisée en comparaison des contraintes de sécurités imposées par la manipulation de pathogènes. En effet, dans le cas qui nous occupe, la manipulation de *Brucella abortus* nécessite un laboratoire de sécurité de niveau trois (BL3).

Régulation "just in time"

Le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* est régulé par des paramètres internes tels les signaux indiquant l'état d'avancement de la réplication de l'ADN, la cytokinèse ou encore de la différenciation mais également par des signaux émanant de son environnement externe. Deux approches expérimentales complémentaires ont permis de mettre en évidence des régulations de type "just in time": les microarrays ^(Laub et al., 2002) et la protéomique ^(Grunenfelder et al., 2001; Vohradsky et al., 2003). Les gènes dont les produits contribuent à une fonction donnée sont activés au moment du cycle cellulaire où cette fonction est nécessaire. La parfaite synchronisation de ces événements nécessite l'intervention de réseaux de régulation interconnectés, rendant possible un couplage de l'expression de gènes avec les événements cellulaires. En effet, la cytokinèse est dépendante de la réussite de la réplication du chromosome ainsi que de la ségrégation des chromosomes fils, elle-même requise pour la formation du flagelle ^(Skerker and Laub, 2004). La cytokinèse est, de plus, requise pour l'assemblage des pili ^(Sommer and Newton, 1988). Le cycle cellulaire joue le rôle d'horloge biologique coordonnant les événements impliqués dans la différenciation morphologique.

Assemblage du flagelle et cascade transcriptionnelle hiérarchisée

Une étroite coordination temporelle concernant la régulation transcriptionnelle de gènes spécifiques est donc nécessaire. Un exemple flagrant est la hiérarchisation des gènes impliqués dans l'assemblage du flagelle ^(Gober and Marques, 1995) (**Fig5**). Un ordre temporel de profil d'expression des gènes flagellaires, nommés gènes de classe I à IV, est mis en évidence ^(Skerker and Laub, 2004). Concrètement, chez *Caulobacter crescentus*, le gène de classe I, codant pour un régulateur de réponse appelé CtrA, est exprimé en premier. Ce facteur de transcription active l'expression des gènes de classe II qui codent les produits formant l'appareil de sécrétion ainsi que l'anneau interne associé à la membrane interne. L'assemblage correct de ces composants codés par les gènes de classe II mène à l'expression des gènes de classe III codant des composants du flagelle associés cette fois au périplasme ainsi qu'à la membrane externe. Par après, les gènes de classe IV encodant des sous unités formant le filament du flagelle seront exprimés à leur tour. L'assemblage séquentiel de ce flagelle se produit toujours de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. La raison en est que le corps basal

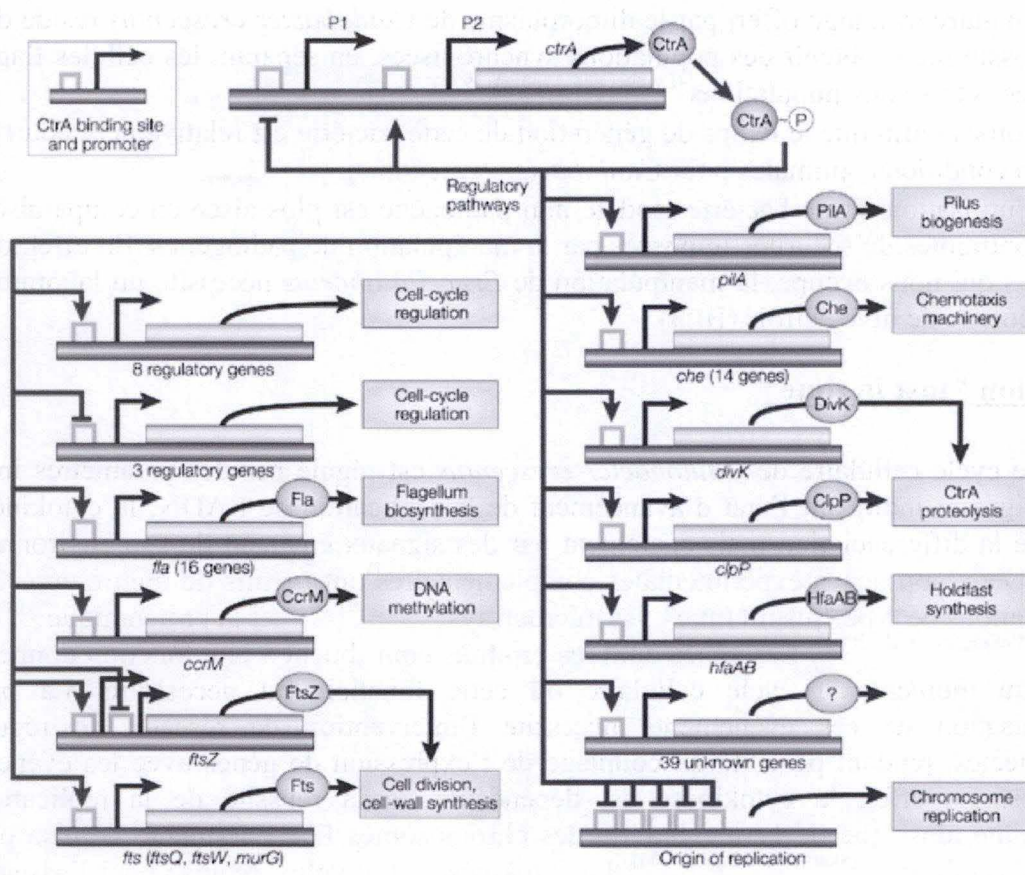


Figure 6 : Régulon de CtrA chez *Caulobacter crescentus*. Les flèches en fin de ligne représentent une activation tandis que les barres perpendiculaires en fin de ligne symbolisent une répression (Skerker and Laub, 2004)

sert de pore pour la sécrétion des composants des appareils plus externes (associés au périplasma et en membrane externe).

Une observation intéressante faite chez *Caulobacter crescentus* en 1981 met en évidence le couplage entre la biogenèse du flagelle et la réplication du chromosome, évènements non liés notamment chez *Escherichia coli* (Sheffery and Newton, 1981). Ce couplage implique la présence d'un mécanisme ou d'un régulateur commun à ces deux évènements. Il existe en effet un régulateur de réponse global commun : CtrA (Cell Cycle Transcriptional Regulator A) (Quon *et al.*, 1996).

CtrA, le contremaître moléculaire

Le gène *ctrA* encode un régulateur de réponse global appartenant à la famille des protéines de transduction du signal à deux composants. Il se compose d'un domaine régulateur de réponse phosphorylable sur un résidu aspartate (D51) et d'un domaine de liaison à l'ADN reconnaissant une séquence consensus 9-mère (Marczynski and Shapiro, 1992; Ouimet and Marczynski, 2000; Laub *et al.*, 2002). Un second motif consensus fut également mis en évidence par les techniques de microarrays et d'immunoprécipitation chromatinienne (Laub *et al.*, 2000). Le gène *ctrA* est essentiel et un homologue proche est retrouvé chez une grande proportion d' α -protéobactéries comme *Caulobacter crescentus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia prowazekii*, *Brucella abortus* et *Rhodobacter capsulatus* (Hallez *et al.*, 2004). Notons que chez *Rhodobacter capsulatus*, l'homologue de *ctrA* n'est pas essentiel (Lang and Beatty, 2000; Lang and Beatty, 2002).

Le régulon de CtrA

Chez *Caulobacter crescentus*, CtrA possède deux activités. Dans son état activé, il réprime l'initiation de la réplication du chromosome de la cellule flagellée et prédivisionnelle en se liant à l'origine de réplication, créant ainsi un encombrement stérique empêchant la liaison à l'ADN d'un facteur d'initiation clé, DnaA (Quon *et al.*, 1998). L'origine de réplication possède cinq sites de liaison reconnus par CtrA, rendant cette inhibition relativement efficace. D'un autre côté, CtrA peut agir en tant que facteur de transcription directement en activant ou en réprimant 95 gènes organisés en 55 opérons (Fig6) (Laub *et al.*, 2002). Ces gènes, formant le régulon de CtrA, peuvent être divisés en trois classes : les gènes requis pour la biogenèse d'organelles polaires comme la cascade de biogenèse du flagelle (*fla*) ainsi que le gène codant pour les constituants de pili (*pilA*) et du holdfast (*hfaAB*) constituent la première classe. La seconde classe comprend les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, tel *ftsZ*, dont les produits formeront un anneau de septation, permettant la cytokinèse, mais également des gènes de méthylation de l'ADN (*ccrM*) ainsi que l'initiation de la réplication (*hemE Ps*). Enfin la dernière classe de gènes englobe les gènes de régulations (Laub *et al.*, 2002).

Le régulateur régulé... et autorégulé

La transcription du gène *ctrA* est influencée par deux promoteurs nommés P1 et P2 (Domian *et al.*, 1999, (Holtzendorff *et al.*, 2004) (Fig6). CtrA est capable de s'autoréguler par une boucle de rétroaction négative sur le P1 et positive sur le P2. Un régulateur de réponse supplémentaire essentiel est identifié, GcrA (Holtzendorff *et al.*, 2004). A l'opposé de CtrA, GcrA active des composants des machineries de réplication et de ségrégation des cellules de *Caulobacter crescentus*. CtrA réprime la transcription du gène *gcrA* ; alors que GcrA active la transcription du gène *ctrA* (Fig7). Le promoteur P1 de *ctrA* est activé par GcrA alors que le promoteur P2

de *ctrA* sera activé plus tard en fin de phase prédivisionnelle. Des mutants capables de transcrire constitutivement le gène codant pour CtrA présentent un cycle cellulaire normal (Domian *et al.*, 1997), ce qui suggère la présence de niveaux de régulations supplémentaires. Le second niveau de régulation de CtrA, sa protéolyse, est dépendante du complexe de protéases ClpXP (Jenal and Fuchs, 1998). Cette protéolyse est spécifiquement localisée à des endroits où sont présents des complexes de protéolyse. Ce complexe de protéases ClpXP peut être localisé au pôle chez *Caulobacter crescentus* (McGrath *et al.*, 2006). Une protéine, nommée RcdA (Regulator of CtrA Degradation) forme un complexe avec CtrA et le complexe de protéases ClpXP. Cette protéine, conservée chez les α -protéobactéries, est responsable de la colocalisation au pôle pédonculé naissant de CtrA avec le protéasome. De surcroît CpdR, un régulateur de réponse à domaine unique et conservé chez les α -protéobactéries intervient dans la protéolyse de CtrA (Biondi *et al.*, 2006a). Lorsque CpdR se trouve dans son état déphosphorylé, il se lie au complexe de protéases ClpXP et le localise au pôle pédonculé (Iniesta *et al.*, 2006). Au stade de cellule prédivisionnelle et dans la cellule nageuse, CpdR est dans son état phosphorylé, le complexe de protéases et CtrA ne seront pas colocalisés et donc CtrA ne sera pas dégradé. Un régulateur de réponse supplémentaire nommé DivK contribue également à la protéolyse de CtrA au pôle pédonculé, bien que les modalités de cette action soient encore mal connues (Hung and Shapiro, 2002) (Fig7).

La voie de transduction du signal impliquée dans l'état de phosphorylation de CtrA

L'état de phosphorylation de CtrA change au cours du cycle cellulaire (Fig8). Une voie de transduction du signal complexe impliquant des protéines du système à deux composants influence l'état de phosphorylation de CtrA : CckA-ChpT et DivJ-PleC-DivK.

Les acteurs CckA et ChpT

Une histidine kinase hybride essentielle nommée CckA (Cell-cycle Kinase) a été identifiée lors d'un crible semblable à celui qui a servi à mettre en évidence CtrA (Jacobs *et al.*, 1999). En plus des parties typiques d'une histidine kinase "classique", CckA possède un domaine aspartate receveur lui aussi typique des systèmes à deux composants (Jacobs *et al.*, 1999). Deux segments transmembranaires sont présents du côté amino-terminal et permettent une insertion de cette protéine en membrane interne. Cette histidine kinase hybride est capable de s'autophosphoryler sur le résidu histidine conservé puis de transférer ce groupement phosphate sur son domaine receveur de régulateur de réponse. La région transmembranaire est essentielle pour la localisation polaire de CckA et la viabilité de la cellule (Jacobs *et al.*, 1999). Cette région transmembranaire est impliquée dans la dimérisation de CckA, phénomène courant impliqué dans la régulation de l'activité des histidines kinases (Surette *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1999). La concentration de CckA est constante au cours du cycle cellulaire mais sa localisation est dynamique (Jacobs *et al.*, 1999) (Fig9). En effet, celle-ci se retrouve aux deux pôles de la cellule prédivisionnelle. Cependant, lors de la séparation des deux cellules filles, CckA se retrouve uniquement en membrane au pôle flagellé de la cellule nageuse. De fait, CtrA sera dans son état activé chez la cellule nageuse, inhibant l'initiation de la réplication du chromosome. CckA jouant son rôle par l'intermédiaire de CtrA, elle permet d'éviter ainsi une réinitiation prématurée du chromosome, notamment.

Afin de vérifier si CckA active directement CtrA par phosphorylation, une approche biochimique appelée "phosphotransfer profiling" a été réalisée (Skerker *et al.*, 2005; Biondi *et al.*, 2006b). Cette technique permet de mettre en évidence *in vitro* le transfert de phosphate d'une histidine kinase à un régulateur de réponse apparenté. Le résultat de cette expérience concernant le lien

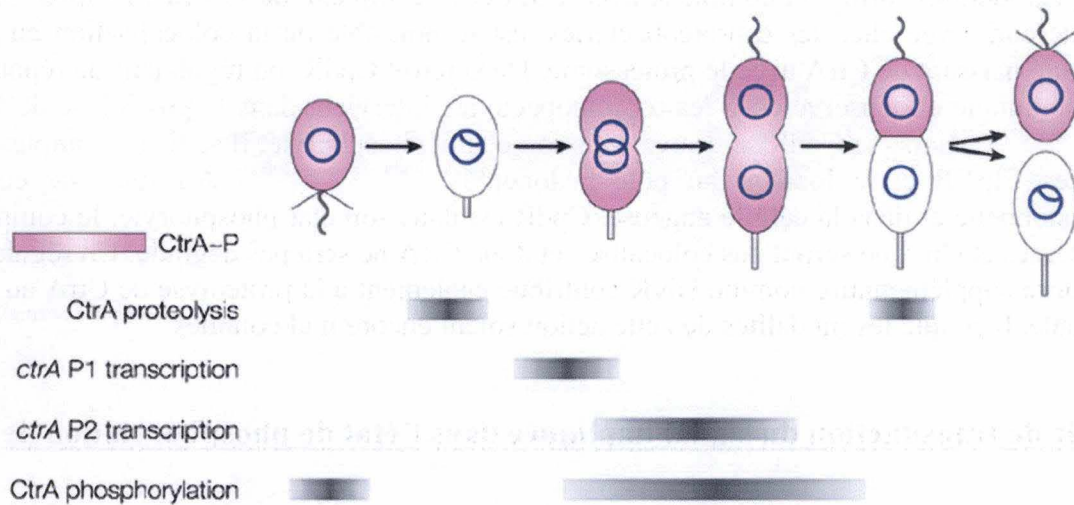


Figure 8 : Les trois niveaux de régulation de CtrA. Variation de la concentration du régulateur de réponse global CtrA au cours du cycle de division chez *Caulobacter crescentus*. Un cercle unique représente une seule copie du chromosome. La forme en "θ" symbolise un chromosome en cours de réplication (Skerker and Laub, 2004)

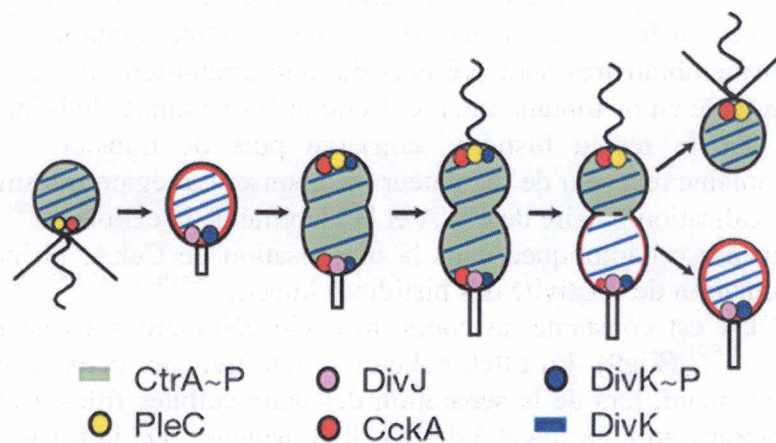


Figure 9 : Pattern de localisation des différents acteurs clés de la voie de régulation impliquant CtrA et DivK (Biondi *et al.*, 2006)

direct entre CckA et CtrA fut négatif. Cette technique fut donc recommencée avec l'histidine phosphotransférase supposée faire le lien entre CckA et CtrA^(Biondi et al., 2006a). Baptisée ChpT (Cell Cycle histidine Phosphotransférase), cette histidine phosphotransférase essentielle influence l'état de phosphorylation de CtrA^(Biondi et al., 2006a) (Fig7). Les gènes *cckA* et *ctrA* sont deux gènes essentiels, il n'est donc pas étonnant que *chpT* le soit également. Le second round de "phosphotransfer profiling" testé avec ChpT a permis de mettre en évidence les relations entre CckA, ChpT, CtrA et CpdR. Après l'évènement d'autophosphorylation de CckA sur le résidu histidine conservé, le groupement phosphate est transféré intramoléculairement à un résidu aspartate receveur. Le groupement phosphate est ensuite transféré à ChpT qui à son tour phosphoryle CtrA et CpdR. CtrA sera donc activé (CtrA-P) alors que, concomitamment, CpdR-P ne pourra pas colocaliser le complexe de protéase ClpXP au pôle pédonculé avec CtrA. Lorsque la concentration de CckA ou de ChpT diminue, il s'ensuit une diminution de la concentration de CtrA-P^(Biondi et al., 2006a). De surcroît, l'allèle *ctrA_{D51E}*, qui encode une version constitutivement active de CtrA, supprime le caractère d'essentialité de *cckA* ainsi que de *chpT*^(Biondi et al., 2006a). La découverte de ChpT représente une étape décisive dans la compréhension globale du réseau de régulation impliquant CtrA. En effet, elle représente le lien unissant les deux régulations post-transcriptionnelles de CtrA à savoir la protéolyse et la phosphorylation.

Les acteurs DivJ-PleC-DivK

Un allèle conditionnel de *ctrA* nommé *sokA* (suppressor of *divK*) a permis de mettre en évidence le lien génétique entre DivJ-PleC-DivK et CtrA^(Wu et al., 1998). En effet, cet allèle *sokA* supprime la létalité d'un mutant *cs divK* mais également le phénotype en rapport avec la division d'un mutant *cs divJ* et encore les phénotypes pléiotropiques d'absence de pédoncule et de non motilité d'un mutant nul $\Delta pleC$ ^(Wu et al., 1998; Sciochetti et al., 2002). Ces observations suggèrent la position en amont de ces protéines de signal par rapport à CtrA^(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). De plus, le phénotype d'une souche mutante portant un allèle *cs divK* à température restrictive (stoppé en phase G1) est similaire au phénotype de souches portant l'allèle non protéolysable et constitutivement actif *ctrA_{D51EΔ3Q}*. Cette observation suggère que DivK est impliqué indirectement dans la déphosphorylation ainsi que dans la protéolyse de CtrA^(Hecht et al., 1995; Wu et al., 1998; Hung and Shapiro, 2002). Une hypothèse est que DivK ne contrôlerait pas CtrA directement, mais plutôt indirectement en inhibant CckA^(Biondi et al., 2006a).

- **DivK** (phénotypes de **division**), un régulateur de réponse essentiel est à la base de ce mini-réseau^(Hecht et al., 1995). Formé de 125 résidus, DivK est constitué d'un unique domaine régulateur avec un résidu aspartate phosphorylable conservé (Asp53). Grâce à son caractère soluble, ce régulateur de réponse essentiel peut diffuser dans le cytoplasme. Une de ses fonctions est de représenter un signal de cytokinèse. En effet, lorsque la cytokinèse est complète, les liens cytoplasmiques entre les deux cellules filles n'existent plus et la diffusion de DivK entre ces deux pôles est stoppée. L'état de phosphorylation de ce régulateur de réponse est influencé par deux histidines kinases : DivJ et PleC^(Wheeler and Shapiro, 1999). En outre, des expériences de FRET ont prouvé les interactions physiques directes *in vivo* entre DivJ et DivK ainsi qu'entre PleC et DivK^(Matroule et al., 2004).
- **DivJ** (phénotypes de **division**) est une histidine kinase de 597 acides aminés possédant 5 régions transmembranaires prédites dans la région amino-terminale. Cette région de 326 résidus est suffisante pour la localisation polaire de DivJ au pôle pédonculé^(Sciochetti et al., 2002). Un linker cytoplasmique sert de connexion avec le domaine catalytique carboxy-terminal. Ce dernier contient le résidu histidine phosphorylable

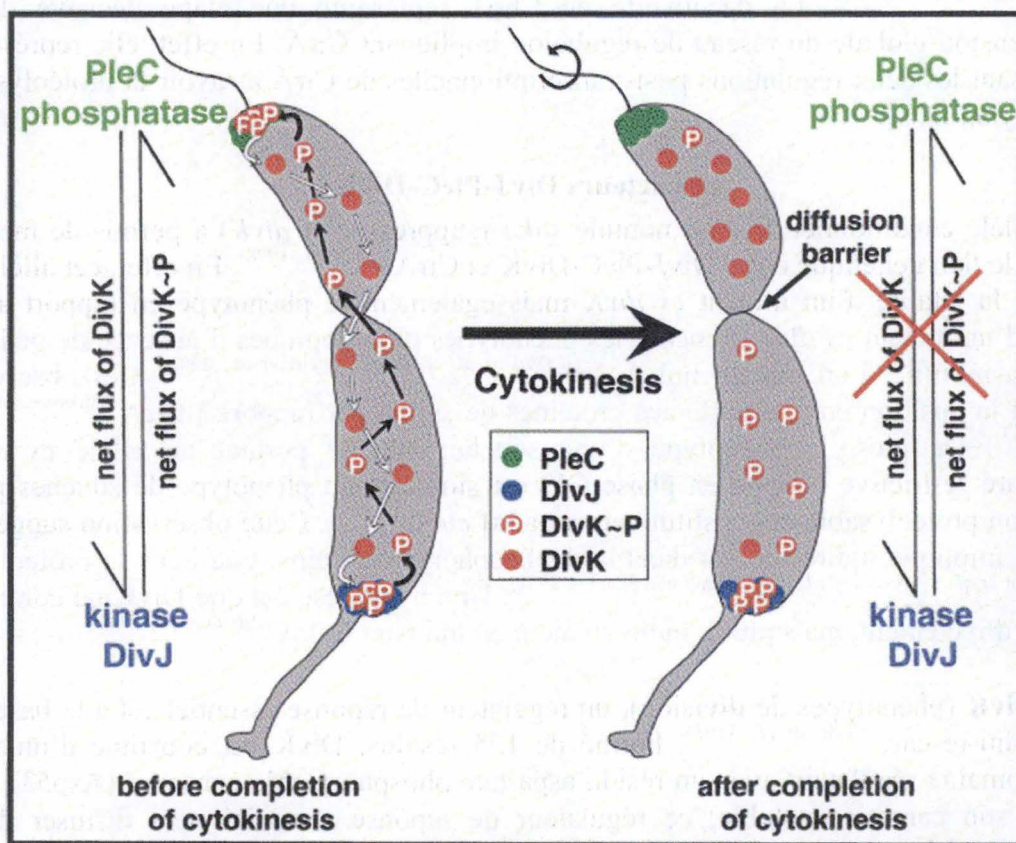


Figure 10 : Localisation de DivJ, PleC et DivK chez *Caulobacter crescentus*. Modèle de « ping-pong » moléculaire contrôlant la localisation dynamique de DivK par DivJ et PleC chez *Caulobacter crescentus* (Matroule et al., 2004).

(His338). Cette kinase est nécessaire pour l'initiation de la division cellulaire ainsi que pour la localisation et la biogenèse correctes du pédoncule (Ohta *et al.*, 1992; Wheeler and Shapiro, 1999; Lam *et al.*, 2003). DivJ, comme la plupart des histidines kinases, n'est pas essentielle. Une souche de *Caulobacter crescentus* délétée pour le gène *divJ* montre un défaut dans les premières étapes de division cellulaire ainsi qu'une légère filamentation (Sciochetti *et al.*, 2002). DivJ est associée au pôle pédonculé où elle agit comme une kinase du régulateur de réponse DivK (Wheeler and Shapiro, 1999) (Fig9). Le régulateur de réponse DivK est complètement délocalisé dans une souche mutante $\Delta divJ$ (Jacobs *et al.*, 2001).

- **PleC (pleiotropic effects)**, une histidine kinase de 842 acides aminés est insérée en membrane interne par quatre segments transmembranaires prédits, situés du côté amino-terminal. Elle possède un site de phosphorylation classique des histidines kinases (His610). Un mutant $\Delta pleC$ est perturbé en phase de transition de la cellule flagellée en cellule pédonculée et montre également une absence de mobilité et de synthèse de pili, notamment (Ohta *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Wheeler and Shapiro, 1999). *In vivo*, il a été montré que PleC agissait comme une phosphatase de DivK (Wheeler and Shapiro, 1999; Matroule *et al.*, 2004). En effet, le niveau de DivK phosphorylé est plus élevé dans un mutant $\Delta pleC$ par rapport à la souche sauvage. De surcroît, DivK se localise aux deux pôles dans une souche mutante $\Delta pleC$, reflétant son incapacité à être relargué du pôle flagellé lorsqu'il n'est pas déphosphorylé (Jacobs *et al.*, 2001; Matroule *et al.*, 2004). PleC est localisée au pôle flagellé dans la cellule prédivisionnelle (Wheeler and Shapiro, 1999) (Fig9).

Une relation de type "ping-pong" moléculaire est donc observée entre les deux pôles de la cellule prédivisionnelle, impliquant les acteurs DivJ-PleC-DivK (Fig10) (Matroule *et al.*, 2004). En effet, à ce stade du cycle de division, un lien cytoplasmique existe entre les deux compartiments (la future cellule flagellée et la future cellule pédonculée) et DivK est donc libre de diffuser d'un pôle à l'autre. DivJ phosphoryle DivK et donc stimule sa localisation vers le pôle flagellé. PleC, associé au pôle flagellé est responsable de la déphosphorylation de DivK et donc de sa délocalisation du pôle flagellé. Un équilibre s'installe via les activités antagonistes compensées de DivJ et PleC. La localisation dynamique de DivK se traduit par une diffusion rapide à travers le cytoplasme entre les deux pôles opposés. Tant que cette diffusion libre de DivK phosphorylé (DivK-P) peut avoir lieu, l'accumulation de DivK-P au pôle flagellé empêchera la rotation flagellaire ainsi que la formation des pili. Cependant lorsque la cytokinèse s'achève, le pont cytoplasmique emprunté par DivK est interrompu. Seule la cellule pédonculée contiendra DivK-P. CtrA sera donc dégradé dans la cellule pédonculée et la réplication du chromosome pourra être réinitiée dans ce type cellulaire. Dans la cellule flagellée, DivK ne sera pas déphosphorylé. Autrement dit, CtrA ne sera pas protéolysé dans cette cellule flagellée et pourra réprimer l'initiation de la réplication du chromosome. L'absence de DivK-P au pôle flagellé permet la rotation du flagelle. Remarquons que ce mécanisme empêche le déplacement de la cellule flagellée avant que la cytokinèse ne soit complète.

PodJ est un facteur de régulation qui agit en tant que protéine de signalisation. Il est synthétisé dans le pôle négatif et se dégrade à mesure qu'il se déplace vers le pôle positif. Cette dégradation est régulée par PerP et PleC. PodJ est impliqué dans la régulation de l'expression de divers gènes, y compris ceux impliqués dans la motilité et la formation de biofilms.

Le schéma illustre le cycle de vie de PodJ et la localisation des autres protéines impliquées. Les étapes sont : 1. Localisation de PleC, 2. Expression de PerP, et 3. Traitement de PodJ.

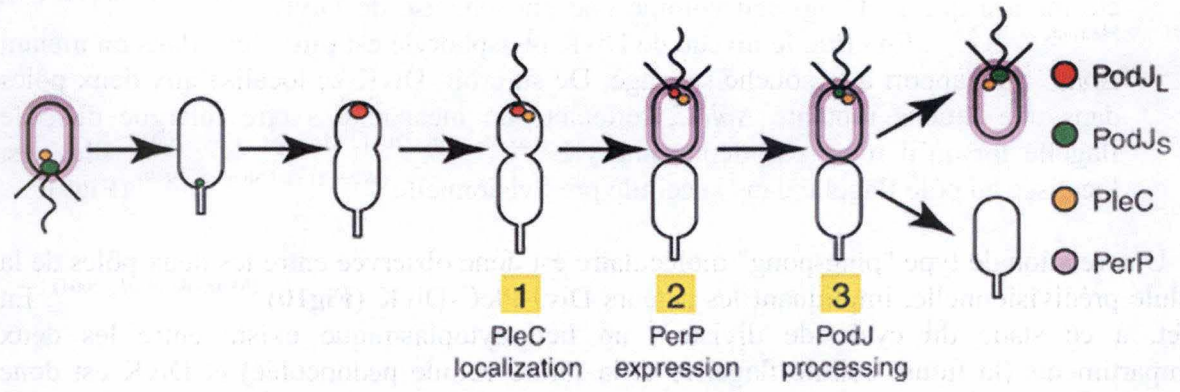


Figure 11 : Pattern de localisation des deux formes de PodJ ainsi que PerP et PleC chez *Caulobacter crescentus* (Chen et al., 2006).

Le schéma illustre le cycle de vie de PodJ et la localisation des autres protéines impliquées. Les étapes sont : 1. Localisation de PleC, 2. Expression de PerP, et 3. Traitement de PodJ.

• Le concept d'asymétrie

Chez les procaryotes, par les exemples décrits, l'asymétrie se résume souvent à une localisation unipolaire de macromolécules comme par exemple des protéines régulatrices. Un grand nombre de comportements bactériens fait appel à cette notion de polarité comme la chimotaxie, la sécrétion de protéines, la locomotion et l'adhésion notamment (Shapiro *et al.*, 2002; Pugsley and Buddelmeijer, 2004). On peut néanmoins s'interroger sur les mécanismes qui permettent cette localisation préférentielle. Chez *Bacillus subtilis*, deux mécanismes distincts permettraient le positionnement précis d'acteurs clés à la membrane de septation : la diffusion suivie de la capture ou l'insertion ciblée suivie également d'une capture (Ebersbach and Jacobs-Wagner, 2007). Dans le premier cas, une protéine est uniformément insérée en membrane dans laquelle elle est libre de diffuser jusqu'à ce qu'elle soit spécifiquement retenue par des facteurs d'ancrage. Dans la deuxième situation, la protéine semble être dirigée et directement ancrée dans la membrane. Cependant, ce concept ne fait que repousser le raisonnement plus loin : comment ces protéines impliquées dans l'ancrage de ces acteurs clés se retrouvent-elles localisées ? La bactérie gram négative pathogène *Shigella flexneri* se déplace de cellules en cellules en polymérisant une queue d'actine systématiquement au pôle ancien par l'activité d'une protéine appelée IcsA (Ebersbach and Jacobs-Wagner, 2007). La diffusion membranaire de cette protéine impliquée dans cette polymérisation est réduite par une protéolyse ciblée partout ailleurs du pôle, maintenant une grande concentration de cette protéine à ce pôle précisément (Steinhauer *et al.*, 1999). Un même mode de déplacement est observé chez *Listeria monocytogenes* (Ebersbach and Jacobs-Wagner, 2007). Dans ce cas-ci, un déplacement passif d'une protéine nommée ActA est en rapport avec le turn over du peptidoglycan (Dabiri *et al.*, 1990). Le turn over du peptidoglycan plus faible au pôle y permet l'accumulation de la protéine ActA.

Cependant, concernant *Caulobacter crescentus*, la compartimentation n'explique pas tout. Lors de la phase précoce prédivisionnelle, les histidines kinases DivJ et PleC contrôlant l'état de phosphorylation de DivK sont déjà localisées aux pôles opposés avant la formation du septum. Une étape supplémentaire a été franchie grâce à l'identification d'un facteur de localisation nommé PodJ pour "Polar Organelle Development" (Crymes *et al.*, 1999; Viollier *et al.*, 2002b; Hinz *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). Cette protéine, qui ne possède aucune caractéristique des protéines impliquées dans les systèmes de transduction du signal est nécessaire à la localisation correcte de PleC. En effet, PleC est majoritairement délocalisé sur la membrane cytoplasmique dans un mutant *podJ*. PodJ est donc logiquement localisée au futur pôle flagellé des cellules prédivisionnelles. Ce facteur de localisation PodJ est une protéine de 974 acides aminés possédant un domaine amino-terminal riche en coiled-coils, un unique segment transmembranaire et une région carboxy-terminale périplasmique composée de trois motifs répétés tétratricopeptidiques (TRP) ainsi que des domaines se liant au peptidoglycan (PG). Les coiled-coils et les TRP sont connus pour être impliqués dans les interactions protéines-protéines. PodJ se révèle donc être un bon candidat tenant le rôle de connecteur moléculaire entre certains acteurs clés protéiques et le peptidoglycan. PodJ est retrouvée sous deux formes différentes : PodJ_L, la forme complète et PodJ_S, la forme tronquée (Viollier *et al.*, 2002a; Lawler and Brun, 2006). PodJ est synthétisé sous sa forme complète dans la cellule prédivisionnelle précoce où elle se localise au futur pôle flagellé (Fig11). Ce facteur de localisation peut dès lors recruter d'autres protéines impliquées dans la synthèse des pili, dont les protéines PleC et CpaE font

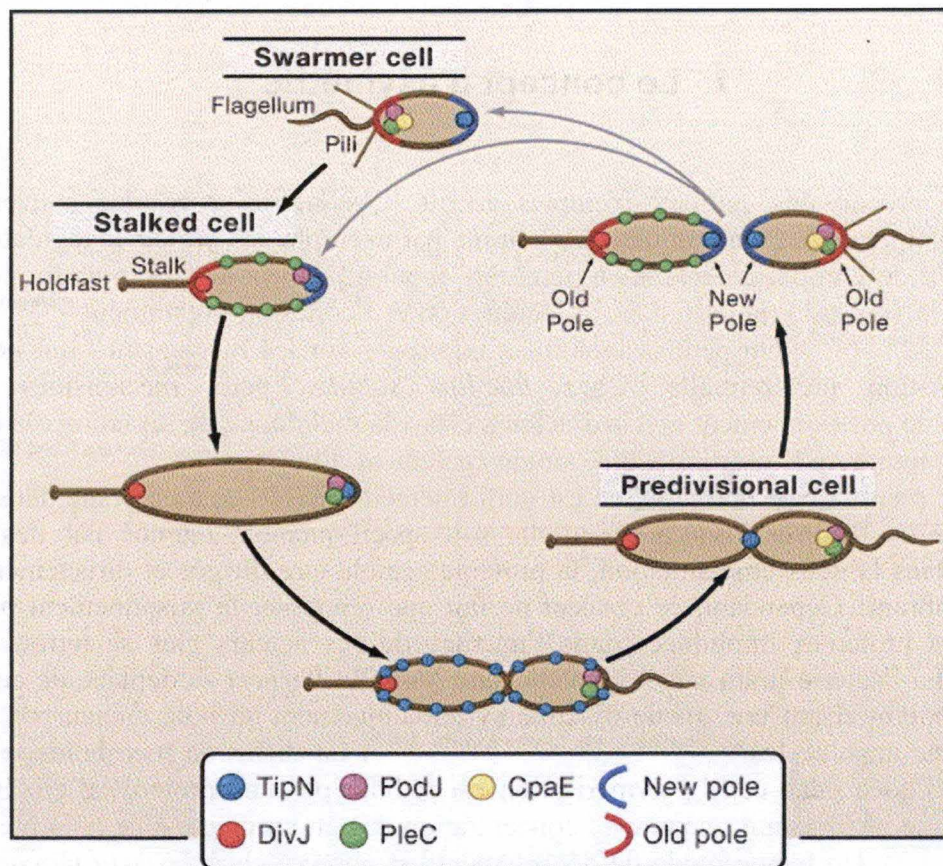


Figure 12 : Schéma récapitulatif reprenant certains éléments clés à caractère polaire identifiés à ce jour chez *Caulobacter crescentus* (Lawler and Brun, 2006).

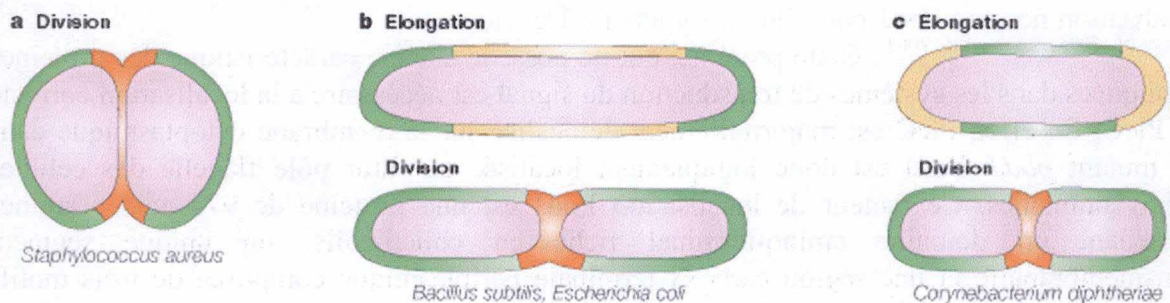


Figure 13 : Mode de croissance cellulaire durant les évènements d'élongation cellulaire et de cytokinèse. En rouge, peptidoglycan nouvellement synthétisé lors de la cytokinèse. En jaune, peptidoglycan nouvellement synthétisé lors de l'élongation cellulaire (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005)

partie. Cette forme complète de PodJ est processée par une protéase périplasmique nommée PerP. La forme PodJs ainsi générée restera attachée au pôle flagellé des cellules nageuses. Cette forme tronquée est requise pour la formation du holdfast à l'extrémité du stalk mais également est impliquée dans la chimotaxie. Enfin, durant la phase de différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée, PodJs est éliminée définitivement du pôle par une métalloprotéase nommée MmpA ^(Chen et al., 2006).

Le fait qu'une protéine se situe à un pôle unique peut être le reflet d'une marque physique laissée après chaque division. En effet, une protéine nommée TipN serait héritée par les cellules filles chez *Caulobacter crescentus* afin de mettre en place de manière *ad hoc* la future polarisation correcte ^(Huitema et al., 2006; Lam et al., 2006). TipN (tip of new pole) est une protéine de 94 kDa possédant deux segments transmembranaires prédits ainsi qu'une région riche en coiled coils. TipN peut dès lors s'insérer en membrane et interagir avec d'autres protéines. Ce marqueur de pôle possède une localisation dynamique suivant la phase du cycle cellulaire. En effet, cette protéine se trouve localisée au nouveau pôle durant une grande partie du cycle cellulaire, dans la cellule prédivisionnelle, TipN est relâché et se retrouve localisée au septum dans la cellule prédivisionnelle tardive (**Fig12**). Par conséquent, chaque nouveau pôle des deux cellules filles sera marqué par TipN, offrant une cicatrice de naissance pour l'orientation de la polarité dans les cellules filles. La délétion de cette protéine entraîne des effets pléiotropiques polaires tels la délocalisation de protéines et d'organelles ou encore des modifications de l'axe de symétrie des cellules filles ^(Huitema et al., 2006).

Implication du peptidoglycan dans la génération d'asymétrie, une nouvelle piste ?

(Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005)

La plupart des procaryotes possèdent une paroi entourant leur membrane plasmique. Celle-ci est impliquée dans le maintien de la forme cellulaire et offre également une protection mécanique, empêchant la bactérie d'éclater si elle se retrouve dans un milieu hypotonique. L'insertion de nouveaux éléments de peptidoglycan est délicate. En effet, elle met en péril l'intégrité de cette paroi bactérienne. Cette synthèse de paroi cellulaire est cependant nécessaire pour que la cellule croisse avant de se diviser. Des protéines nommées PBP (Penicillin-binding proteins) forment des complexes avec d'autres protéines hydrolysant le peptidoglycan (hydrolases). Il existe plusieurs classes de PBPs, chacune de ces protéines réalise son activité enzymatique spécifique de modification et d'insertion de nouveau peptidoglycan au sein de complexes ^(Figge et al., 2004). Le recrutement de certaines PBPs à des sites précis se traduirait par un remaniement localisé de la paroi cellulaire. L'élongation cellulaire par croissance polaire ou latérale est à distinguer de la division cellulaire par croissance septale (**Fig13**) ^(Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005). Lors de la formation de l'anneau de septation, FtsZ, l'homologue de la tubuline eucaryotique, est capable de recruter certaines PBPs spécifiques au site de division ^(Errington et al., 2003). De plus, lors de l'élongation cellulaire, MreB, l'homologue bactérien de l'actine eucaryote qui forme des structures hélicoïdales le long du grand axe de la bactérie, peut recruter d'autres PBPs spécifiques responsables de la synthèse de peptidoglycan chez *Caulobacter crescentus* ^(Figge et al., 2004). Suivant l'axe de croissance de la bactérie, le recrutement de différentes PBPs mène donc à une hétérogénéité du peptidoglycan. Toutes ces modifications spécifiques du peptidoglycan pourraient constituer des cibles pour des protéines impliquées dans la génération d'asymétrie. Un indice supplémentaire est fourni par la notion de "peptidoglycan inerte", caractérisé par un "turn over" très faible. Dans la situation où une protéine régulatrice serait fermement associée à ce peptidoglycan inerte, celle-ci se déplacerait donc de paire avec lui.

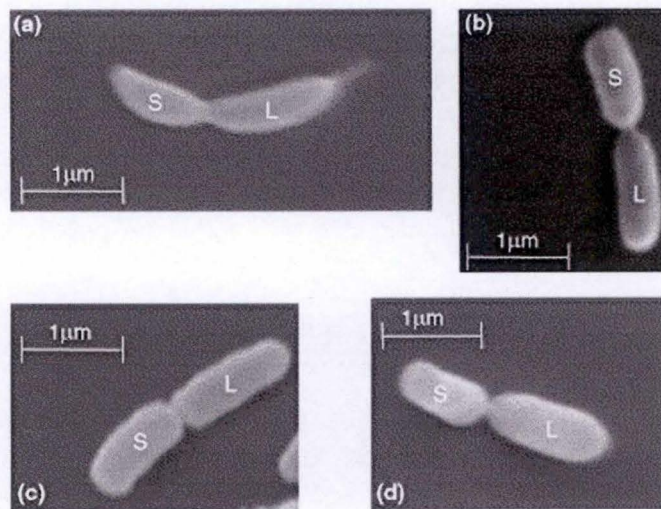


Figure 14 : Asymétrie chez les α -protéobactéries. Micrographies en microscopie électronique à balayage de quatre espèces d' α -protéobactéries. Une cellule de grande taille (L) ainsi qu'une cellule de petite taille (S) sont visibles. a). *Caulobacter crescentus*, b). *Brucella abortus*, c). *Sinorhizobium meliloti* et d). *Agrobacterium tumefaciens* ^(Hallez et al., 2004).

• Asymétrie chez les α -protéobactéries

Nous avons vu que chez *Caulobacter crescentus*, l'asymétrie morphologique est associée à l'asymétrie fonctionnelle. Cette corrélation existe-t-elle chez d'autres α -protéobactéries qui présentent un dimorphisme ? Ce dimorphisme confère-t-il un avantage adaptatif à ces bactéries à un moment précis de leur cycle de vie ? Une observation empirique abonde en ce sens. Des cultures successives en laboratoire de *Caulobacter crescentus* durant une période supérieure à deux années montre une tendance à perdre son asymétrie lorsque celle-ci n'est pas nécessaire (communication personnelle de Urs Jenal). Cette asymétrie aurait donc un caractère fonctionnel dont cette bactérie, *in vitro* et donc en absence de pression de sélection, pourrait se passer.

Division asymétrique

Une caractéristique partagée par plusieurs α -protéobactéries est leur division asymétrique comme montrée chez *Caulobacter crescentus*, *Brucella abortus*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* et ce malgré des styles de vie très différents (Fig14) (Hallez *et al.*, 2004). En effet, une grande ainsi qu'une petite cellule sont générées à chaque division cellulaire. Ce dimorphisme s'accompagne pour ces quatre espèces d'une importante conservation du réseau de régulation transcriptionnelle reflétant sans doute la présence d'un réseau régulateur hérité d'un ancêtre commun et capable de positionner la machinerie de division à un endroit précis, légèrement excentré par rapport au milieu de la cellule. Des orthologues de chacune des protéines impliquées dans la signalisation (CtrA, DivJ, PleC, CckA, ChpT) décrites auparavant ont été trouvés chez *Caulobacter crescentus*, *Brucella abortus*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* (Hallez *et al.*, 2004). Cependant, l' α -protéobactérie *Rickettsia prowazekii* possède uniquement les orthologues des protéines de CtrA et PleC. Cette absence d'acteurs du réseau CtrA est interpellant et soulève la question du rôle de ceux-ci chez les autres α -protéobactéries, où certains de ces gènes sont essentiels. L'observation d'une division symétrique chez *Rickettsia prowazekii* serait intéressante. Une tendance observée montre que les domaines d'interactions transmettant le phosphate sont plus conservés que les domaines senseurs, suggérant que des stimuli différents d'une espèce à l'autre peuvent être intégrés par une même voie de transduction du signal (Hallez *et al.*, 2004). La diversité de ces signaux intégrés serait le reflet des différents styles de vies de ces bactéries confrontées à des environnements variables.

• *Brucella abortus*, entre tradition et modernité

La bactérie utilisée au sein du laboratoire pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'infection cellulaire par un pathogène est *Brucella abortus*. Le genre *Brucella* comprend plusieurs autres espèces identifiées à ce jour dont *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella*

canis et *Brucella ovis* (Broughton and Jahans, 1997; Jahans *et al.*, 1997). Ces bactéries sont toutes des pathogènes intracellulaires facultatifs, coccobacilles à Gram négatif de 1,2 µm de long sur 0,8 µm de large. Le genre *Brucella* est responsable d'infections chroniques nommées brucelloses, maladies zoonotiques mondiales, se manifestant chez l'homme par une maladie appelée "fièvre de Malte" (Samartino and Enright, 1993; Boschiroli *et al.*, 2001). Ces bactéries sont fascinantes de par leur capacité à contrôler le trafic intravésiculaire de leur cellule hôte, ceci afin de se constituer une niche de réplication associée au réticulum endoplasmique (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998; Celli *et al.*, 2003; Celli, 2006).

En plus du dimorphisme commun, une grande majorité des acteurs clés des réseaux de régulation décrits ci-dessus chez *Caulobacter crescentus* possèdent des homologues chez *Brucella abortus* comme CtrA, CckA, DivJ, PleC, DivK, ChpT, TipN et PodJ (Bellefontaine *et al.*, 2002; Hallez *et al.*, 2007b).

Réseau de régulation transcriptionnelle (Bellefontaine *et al.*, 2002)

Les premières données concernant le réseau de régulation impliquant CtrA chez *Brucella abortus* furent obtenues au courant de l'année 2000. Celles-ci montraient que, *in vitro*, CtrA de *Caulobacter crescentus* pouvait lier le promoteur du gène *ccrM* encodant une ADN méthyltransférase de *Brucella abortus* (Robertson *et al.*, 2000). Cette donnée suggérait d'une part que la transcription des gènes *ccrM* de *Brucella abortus* était également sous l'influence de CtrA et que le motif consensus reconnu par CtrA (TTAA-N₇-TTAA, avec N qui représente un des quatre nucléotides) pouvait être conservé entre ces deux espèces. Le régulateur de réponse global CtrA chez *Brucella abortus*, composé de 232 acides aminés, est l'homologue fonctionnel de CtrA de *Caulobacter crescentus* (Bellefontaine *et al.*, 2002). A l'instar de l'autorégulation utilisée par CtrA chez *Caulobacter crescentus*, CtrA chez *Brucella abortus* est également capable de s'autoréguler lorsqu'il est phosphorylé. Cette régulation est également mise en évidence, *in vitro*, chez *Sinorhizobium meliloti* (Barnett *et al.*, 2001).

Le gène *divK* chez *Brucella abortus* (*Ba**divK*) partage 79% d'identité avec son homologue fonctionnel *divK* chez *Caulobacter crescentus* (*Cc**divK*). Le gène *Ba**divK* est capable d'hétérocomplémenter le gène *Cc**divK* chez *Caulobacter crescentus*. En effet, la présence d'un plasmide contenant la séquence de *Ba**divK* supprime le caractère essentiel de *Cc**divK* (Hallez *et al.*, 2007b). Plusieurs tentatives visant à l'obtention d'un mutant Δ *divK* chez *Brucella abortus* ont échoués, suggérant que ce gène soit également essentiel chez *Brucella abortus*. *Ba*DivK interagit physiquement en test double hybride en levure avec les histidines kinases *Ba*DivJ et *Ba*PleC, ainsi qu'avec un nouvel acteur récemment identifié chez *Brucella abortus* par homologie de séquence et nommé PdhS (PleC/DivJ-homologous Sensor) (Hallez *et al.*, 2004).

Caractérisation du réseau de régulation impliquant DivK ainsi que PdhS chez *Brucella abortus* (Hallez *et al.*, 2007b)

La complémentation avec la séquence codante *pleC* de *Brucella abortus* est observée dans une souche mutante Δ *pleC* de *Caulobacter crescentus*. Ces complémentations sont possibles grâce au haut degré d'identité partagé par tous les membres de la cascade de transduction du signal entre ces différentes espèces au moins dans certains domaines-clés. Une localisation polaire de la fusion PleC-YFP est observée soit à l'endroit de septation entre les deux cellules filles, soit aux nouveaux pôles cellulaires après division chez *Brucella*

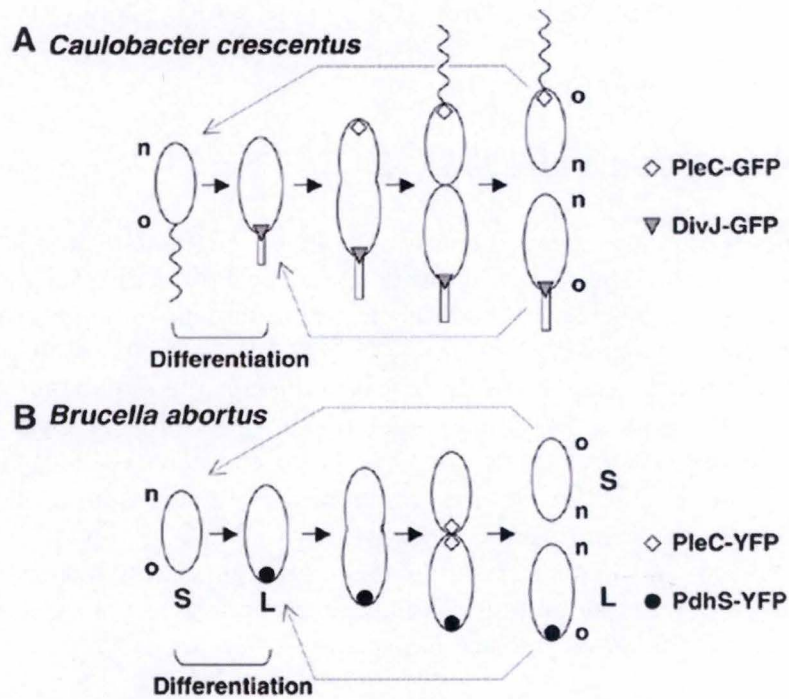


Figure 15 : Comparaison des patterns de localisations, en A, des fusions PleC-GFP et DivJ-GFP chez *Caulobacter crescentus* et en B, des fusions PleC-YFP et PdhS-YFP chez *Brucella abortus* (Hallez *et al.*, 2007)

abortus (Fig15). La fusion DivJ-YFP montre un pattern de localisation diffus cytoplasmique chez *Brucella abortus*. De plus, la localisation polaire de DivK est conservée dans les deux souches mutantes nulles $\Delta divJ$ et $\Delta pleC$ de *Brucella abortus* alors que la phosphorylation de DivK est nécessaire à sa localisation polaire. En effet, un mutant D53A de *Ba*divK n'est plus localisé au pôle comparé à DivK-YFP qui se localise (Hallez et al., 2007b).

Ces observations suggèrent que DivJ et PleC ne sont pas les kinases de DivK *in vivo* chez *Brucella abortus*, la recherche d'autres protéines impliquées dans la régulation de la phosphorylation de DivK est donc justifiée.

PdhS, un nouvel acteur dans le contrôle de DivK chez *Brucella abortus* (Hallez et al., 2007b)

PdhS est une histidine kinase particulière paralogue aux histidines kinases PleC et DivJ. Le locus *pdhS* encode une protéine de 1035 acides aminés, taille relativement importante par rapport aux histidines kinases classiques. De plus, PdhS ne contient pas de segments transmembranaires prédis au contraire de la plupart des histidines kinases décrites dans le réseau de CtrA. Au moins un homologue de PdhS est présent chez *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* et *Agrobacterium tumefaciens* mais pas chez *Caulobacter crescentus*. De plus PdhS est essentielle, ce qui est rare pour une histidine kinase. En effet, une seule histidine kinase essentielle est trouvée chez *Bacillus subtilis* et aucune chez *Escherichia coli*. La proportion d'histidines kinases essentielles chez *Caulobacter crescentus* est de 4 sur 62.

Une information supplémentaire ressortant de ce test double hybride montre que l'histidine kinase PdhS est capable d'interagir avec elle-même formant ainsi des oligomères, les 613 premiers acides aminés étant critiques pour garder cette interaction. Ces informations suggèrent que la protéine PdhS est composée de deux parties : une partie de multimérisation du côté amino-terminal et d'une partie classique histidine kinase interagissant avec DivK du côté carboxy-terminal. Composée de plus de 600 acides aminés, la partie amino-terminale de la protéine ne possède pas de domaine de fonction prédite connue.

PdhS représente un bon candidat pour le contrôle de l'état de phosphorylation et subséquemment de la localisation de DivK étant donné qu'une interaction existe entre cette histidine kinase et DivK en test double hybride en levure. La localisation de DivK étant dépendante de son état de phosphorylation, la localisation de ce régulateur de réponse pourrait être prédite suivant la fonction de PdhS comme phosphatase et/ou comme kinase.

Localisation de PdhS

L'histidine kinase PdhS possède une localisation polaire (Hallez et al., 2007b) (Fig15). D'abord présente au vieux pôle de la grande cellule, cette histidine kinase sera acquise par la petite cellule après division et croissance de celle-ci (Hallez et al., 2007b). En effet, PdhS localise au pôle ancien de la petite cellule fille après un laps de temps compris entre 60 et 120 minutes. Cette donnée suggère que la localisation de PdhS sera à l'ancien pôle uniquement après maturation de la petite cellule en grande cellule. Une co-localisation de PdhS et de DivK fusionnées à des fluorochromes différents est observée (Hallez et al., 2007b). *Ba*PdhS se localise chez *Sinorhizobium meliloti* où un homologue de PdhS est présent mais ne se localise pas chez *Escherichia coli* qui ne possède pas d'homologue de PdhS (Hallez et al., 2007b). *Ba*PdhS se localise cependant à un pôle chez *Caulobacter crescentus*, qui pour rappel ne possède pas

d'homologue proche du gène *pdhS*. Ces données permettent de proposer des caractéristiques communes entre l'ancien pôle de la grande cellule de *Brucella abortus* et l'ancien pôle pédonculé chez *Caulobacter crescentus*.

Interactants de PdhS

Le fait que cette histidine kinase, qui ne possède pas de segment transmembranaire, montre un profil de localisation polaire nous amène à penser qu'une ou plusieurs protéines participent à son ancrage au pôle chez *Brucella abortus*. De plus, la taille importante du domaine amino-terminal laisse supposer l'existence de plusieurs fonctions associées à ce domaine.

Afin d'identifier des partenaires physiques de PdhS, un test double hybride en levure a été réalisé (Mémoire Delphine Dotreppe 2006 et thèse en cours de Johann Mignolet). Des interactants potentiels de PdhS, nommés PicC, PipP et FumC, ont été mis en évidence. La partie amino-terminale s'est avérée nécessaire pour interagir avec ces nouveaux partenaires hypothétiques, contrairement à l'interaction avec DivK qui implique la partie carboxy-terminale.

Les deux premiers interactants potentiels cités, PicC et PipP, sont annotés comme des protéines hypothétiques auxquelles aucune fonction connue n'est associée. PicC possède des domaines coiled-coils et aucun homologue du gène *picC* n'est présent dans le genome de *Caulobacter crescentus*. Ces protéines, à l'heure actuelle, ne fournissent donc aucun renseignement concernant la fonction de PdhS. Le gène *picC* se situe au locus de *ctrA* chez *brucella abortus*, locus comprenant plusieurs gènes de la voie impliquant CtrA (*pdhS* et *chpT*, notamment). Le gène *picC* n'est pas en opéron avec les gènes de ce locus.

Le troisième interactant potentiel, FumC, est annoté comme une fumarate hydratase (également nommée fumarase). Il existe trois fumarases identifiées à ce jour chez *Escherichia coli* : FumA, FumB et FumC (Tseng *et al.*, 2001). Les fumarates hydratases catalysent la conversion du composé fumarate en malate, cette réaction est une étape du cycle de Krebs. Elles peuvent être classées en deux types : les fumarases A et B appartiennent aux fumarases de type I. Ces deux enzymes sont paralogues. FumA contient un centre fer-soufre (4Fe-4S), elle participerait au cycle de krebs et est activée en conditions aérobiques (Woods *et al.*, 1988). La fumarase B serait requise en anaérobie (Woods *et al.*, 1988). FumA est sensible aux chocs oxydatifs et/ou à la déplétion en fer du milieu. FumC est une enzyme de type II. Cette fumarase C ne possède pas d'homologie avec FumA et FumB. FumC ne possède pas de centre Fe-S garde son activité lors d'un choc oxydatif et dans des conditions de carence en fer (Hassett *et al.*, 1997).

Sinorhizobium meliloti

La conservation du réseau de transduction du signal impliquant CtrA, la division asymétrique, la présence d'appendices polaires et l'appartenance à la même classe d' α -protéobactéries désignent *Caulobacter crescentus* comme bactérie modèle idéale dans l'étude de la génération d'asymétrie. Cependant *Caulobacter crescentus* n'est pas pathogène et de surcroît possède un mode de vie libre. Dans le cadre de l'étude de pathogènes intracellulaires, *Sinorhizobium meliloti* représente un modèle alternatif de choix dans l'étude de *Brucella* spp. En effet, *Sinorhizobium meliloti* est phylogénétiquement plus proche de *Brucella abortus* que *Caulobacter crescentus*. De plus, son cycle de vie comprend une interaction étroite avec des cellules hôtes. De surcroît, *Sinorhizobium meliloti* possède un homologue de DivK qui partage 74% d'identité concernant la séquence en acides aminés avec son homologue chez *Caulobacter crescentus* (Barnett *et al.*, 2001). Le régulateur de réponse DivK de *Sinorhizobium*

meliloti montre également un profil de localisation dynamique ^(Lam et al., 2003). En effet, il se localise au vieux pôle de la cellule prédivisionnelle précoce. Après septation, il sera délocalisé dans la petite cellule fille alors qu'il localisera à l'ancien pôle de la grande cellule fille.

Une récente étude montre qu'un des deux homologues de PdhS chez *Sinorizobium meliloti*, CbrA, est codé par un gène non-essentiel et joue un rôle dans la production de succinoglycan, un exopolysaccharide impliqué dans la formation de nodules de cette bactérie symbionte de plantes ^(Gibson et al., 2006). La présence de cette protéine est critique pour le succès de l'établissement de la symbiose chez *Sinorhizobium meliloti*. De plus, une souche mutante nulle $\Delta CbrA$ semble montrer une perturbation de l'enveloppe cellulaire ^(Gibson et al., 2007).

Objectifs du mémoire

La division asymétrique dont fait systématiquement preuve *Brucella abortus* lorsqu'elle est cultivée en milieu bactériologique pose la question de l'utilité pour cette bactérie de générer deux cellules filles différentes. Ces cellules filles pourraient posséder des fonctions propres nécessaires au processus infectieux de *Brucella abortus*. Au laboratoire, une protéine essentielle et polaire nommée PdhS est en cours de caractérisation. L'identification du rôle ainsi que les signaux reconnus par PdhS devrait être de nature à mieux comprendre les fonctions qui sont assignées au vieux pôle de la bactérie. Nous avons choisi de caractériser trois interactants identifiés précédemment. Ces informations pourraient aider à associer un caractère fonctionnel à l'asymétrie morphologique systématique de *Brucella abortus*.

Ce mémoire vise d'une part à confirmer les interactions entre PdhS et ses trois interactants potentiels à l'aide de plusieurs approches complémentaires : biochimiques (co-immunoprécipitation), génétiques (création de mutants) et de localisations subcellulaires de fusions à la molécule fluorescente YFP. D'autre part, la caractérisation de l'histidine kinase PdhS elle-même sera réalisée par mutagenèses dirigée et aléatoire.

Résultats et discussions

Résultats et discussions

Un test double hybride en levure réalisé antérieurement a permis de mettre en évidence trois interactants potentiels de l'histidine kinase PdhS nommés PicC, PipP et FumC. L'agencement des résultats s'appuie sur deux volets intrinsèquement liés.

La première partie porte sur la caractérisation des interactants potentiels identifiés. La technique de co-immunoprécipitation initiée permettra une confirmation biochimique *in vitro* des interactions entre PdhS et ses trois interactants. A cette fin, des constructions sont nécessaires et seront décrites. Ensuite la mise en évidence de liens génétiques s'appuiera sur l'observation par rapport à la souche sauvage de phénotypes de mutants des gènes correspondant aux interactants potentiels. Enfin, une comparaison de profils de localisations entre PdhS et ses interactants sera réalisée par l'observation *in vivo* de fusions protéiques à l'aide de molécules fluorescentes.

La deuxième partie se consacrera majoritairement à la caractérisation du gène *pdhS* lui-même, rendue possible grâce à l'obtention d'une banque d'allèles mutés de ce gène. Une série d'allèle sera construite afin de mettre en évidence des pertes d'interaction entre PdhS et ses interactants. Ensuite, l'existence du lien reliant la localisation de PdhS à sa phosphorylation sera vérifiée par mutagenèse dirigée.

• Caractérisation des interactants de PdhS

Co-ImmunoPrécipitation (CoIP)

Afin de confirmer les interactions entre PicC, PipP, FumC et PdhS, une méthode biochimique complémentaire sera utilisée : la CoIP. Le principe de cette stratégie repose sur la précipitation concomitante d'une protéine d'intérêt en complexe avec ses interactants physiques.

Concrètement, un lysat cellulaire est mis en présence de billes couplées à des anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine d'intérêt. Les protéines non reconnues par les anticorps seront éluées par des lavages successifs tandis que la protéine d'intérêt, ici PdhS, restera liée aux billes par l'intermédiaire des anticorps. L'éluotion ultérieure de PdhS permettra l'éluotion de ses interactants physiques. Les protéines "pêchées" en complexe avec PdhS subiront une migration par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide puis seront révélées par la technique du western blot, permettant ainsi l'identification des interactants potentiels de départ co-précipités. Le régulateur de réponse DivK servira de contrôle positif à cette technique.

Des anticorps reconnaissant spécifiquement PdhS, PicC, PipP et FumC ne sont cependant pas disponibles au sein du laboratoire. Une séquence d'ADN (*TAP-Tag*) a donc été fusionnée par remplacement allélique au coté carboxy-terminal du gène *pdhS* tandis qu'une autre séquence (*Flag*) a quant à elle été fusionnée au coté carboxy-terminal des trois interactants potentiels par un évènement d'intégration au locus codant chacun de ces interactants. Des anticorps dirigés contre le TAP-Tag et le Flag sont disponibles au sein du laboratoire. Des anticorps dirigés contre DivK sont également accessibles au laboratoire. Plusieurs constructions sont nécessaires afin de permettre l'utilisation de cette technique.

Des séquençages ont été réalisés sur chacune des séquences d'intérêts utilisées pour les constructions dans le cadre de ce mémoire, les résultats obtenus ne pouvant pas être attribués à des mutations dans les séquences utilisées.

Fusion PdhS-TAP-Tag

Premièrement, l'extrémité 3' du gène *pdhS* a été fusionnée à une séquence *TAP-Tag* (**Fig16**). La stratégie utilisée repose tout d'abord sur la technique d'amplification de séquence d'ADN par PCR (voir matériels et méthodes page 53). Pour ce faire, deux couples d'amorces ont été dessinés (notées 1-2 et 3-4) afin d'amplifier la séquence génomique coté 3' du gène d'une part ainsi que la région terminatrice du locus du gène *pdhS*. Ces deux régions, d'une longueur d'environ 500 paires de bases, ont été utilisées comme régions d'homologie pour des évènements de recombinaison ultérieurs. Les amorces 2 et 3 permettaient l'introduction d'une mutation en remplaçant l'avant dernier codon et le codon terminateur de la séquence de

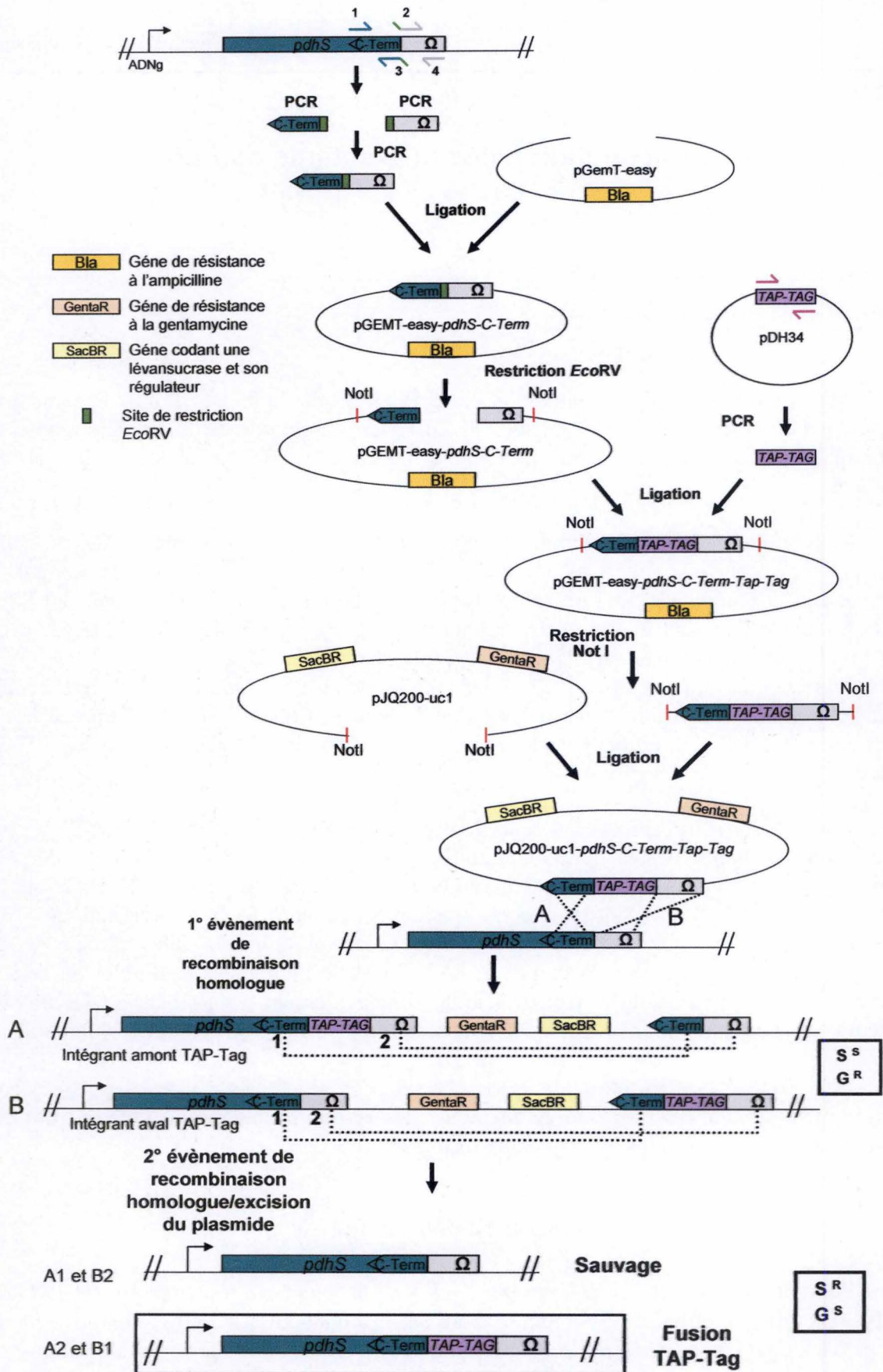


Figure 16 : Fusion en 3' de la séquence *TAP-Tag* au gène *pdhS* par remplacement allélique. S^R : phénotype de résistance au sucrose, S^S : phénotypesensibilité au sucrose, G^R : phénotype de résistance à la gentamicine, G^S phénotype de sensibilité à la gentamicine. Les flèches en arçon (↷) symbolisent les amorces PCR. ↗ représente la région amont de la cds. Le Ω représente la région avale de la cds.

pdhS par un site de restriction *EcoRV*, offrant la possibilité d'un clonage à l'extrémité 3' de la séquence codante de *pdhS*. Deux PCR distinctes ont été réalisées : l'une utilisant le couple d'amorces 1-2 et l'autre la paire d'amorces 3-4. Une PCR avec les amorces 1 et 4 permettait ensuite de relier ces deux produits PCR et d'amplifier ainsi un fragment d'environ 1000 paires de bases. Ces produits PCR liés ont ensuite été ligués dans le plasmide pGEMT-easy. Une restriction à l'aide de l'enzyme *EcoRV* a permis la linéarisation au site reliant la partie 3' de *pdhS* et sa région terminatrice génomique. Ensuite, un événement de ligation a permis le clonage de la séquence *TAP-Tag*, préalablement amplifiée par PCR à partir d'un plasmide pDH34^(Damien Hermand), à ce site rendu accessible. Le codon initiateur de la séquence *TAP-Tag* fut enlevé, alors que le codon terminateur fut gardé. Une restriction aux deux sites *NotI* flanquant cette construction a permis d'exciser la région d'intérêt et de l'insérer dans le plasmide pJQ200-uc1 restreint en *NotI*. Ce plasmide pJQ200-uc1 possède une origine de réplication unique chez *Escherichia coli* et aucune chez *Brucella* spp. (voir matériels et méthodes page 50). L'unique façon pour une souche de *Brucella abortus* de garder ce plasmide avec son marqueur de sélection de résistance à la gentamycine est de l'intégrer dans son génome. Le plasmide pJQ200-uc1 est donc l'outil moléculaire utilisé afin de permettre une intégration au locus chromosomique choisi d'une construction d'intérêt. Le plasmide d'intérêt pJQ200-uc1-*pdhS-C-Term-TAP-Tag* fut électroporé dans une souche S17-1 d'*Escherichia coli*, souche avec laquelle il a été introduit par conjugaison dans des souches de *Brucella abortus* 544 où un événement d'intégration génomique était attendu. Pour un remplacement allélique, deux événements successifs de recombinaisons homologues sont nécessaires ; l'un en amont de la séquence *TAP-Tag* et l'autre en aval de la séquence *TAP-Tag* ou inversement. Lors d'un premier événement de ce type, une intégration de l'entièreté du plasmide peut s'effectuer de deux manières différentes menant ainsi à l'obtention d'intégrants dits "amonts" ou "avals". Les souches caractérisées par cet événement de recombinaison homologue deviennent dès lors concomitamment résistantes à la gentamycine et sensible au sucrose. Ces souches furent étalées sur un milieu contenant de la gentamycine. Un deuxième événement de recombinaison homologue se traduisant par l'excision du plasmide pJQ200-uc1 intégré fut permis par des cultures successives de ces souches sur un milieu non sélectif. Ensuite, ces bactéries ont été étalées sur un milieu contenant du sucrose, l'excision du plasmide était donc sélectionnable grâce à la perte du marqueur de contre sélection *sacBR* (voir matériels et méthodes page 50). Autrement dit, ce phénomène d'excision se traduisait par les phénotypes de résistance au sucrose et de sensibilité à la gentamycine. Enfin, les bactéries résistantes au sucrose furent déposées sur un milieu contenant de la gentamycine suivi directement après d'un repiquage sur un milieu non sélectif 2YT (voir matériels et méthodes page 51). Les souches ne poussant pas sur gentamycine mais bien sur 2YT devenaient des candidats PdhS-TAP-Tag. A ce stade, deux situations étaient observées. Les souches rendues de cette manière sensibles à la gentamycine étaient soit des souches sauvages de *Brucella abortus* 544 de départ, soit les mutants recherchés. Des PCR diagnostics sur colonies ont permis de discriminer les souches revenues à la situation de départ des mutants d'intérêts.

Fusions PicC-Flag, PipP-Flag et FumC-Flag

Les gènes *picC*, *pipP* et *fumC* devaient chacun être fusionnés à la séquence *Flag* coté 3'. En effet, le *Flag* est un épitope très court et de ce fait risque moins de perturber la conformation de la protéine fusionnée. Ces trois gènes d'intérêts sont disponibles dans l'ORFéome de *Brucella melitensis* au sein du laboratoire^(Dricot et al., 2004). Cet Orféome reprend

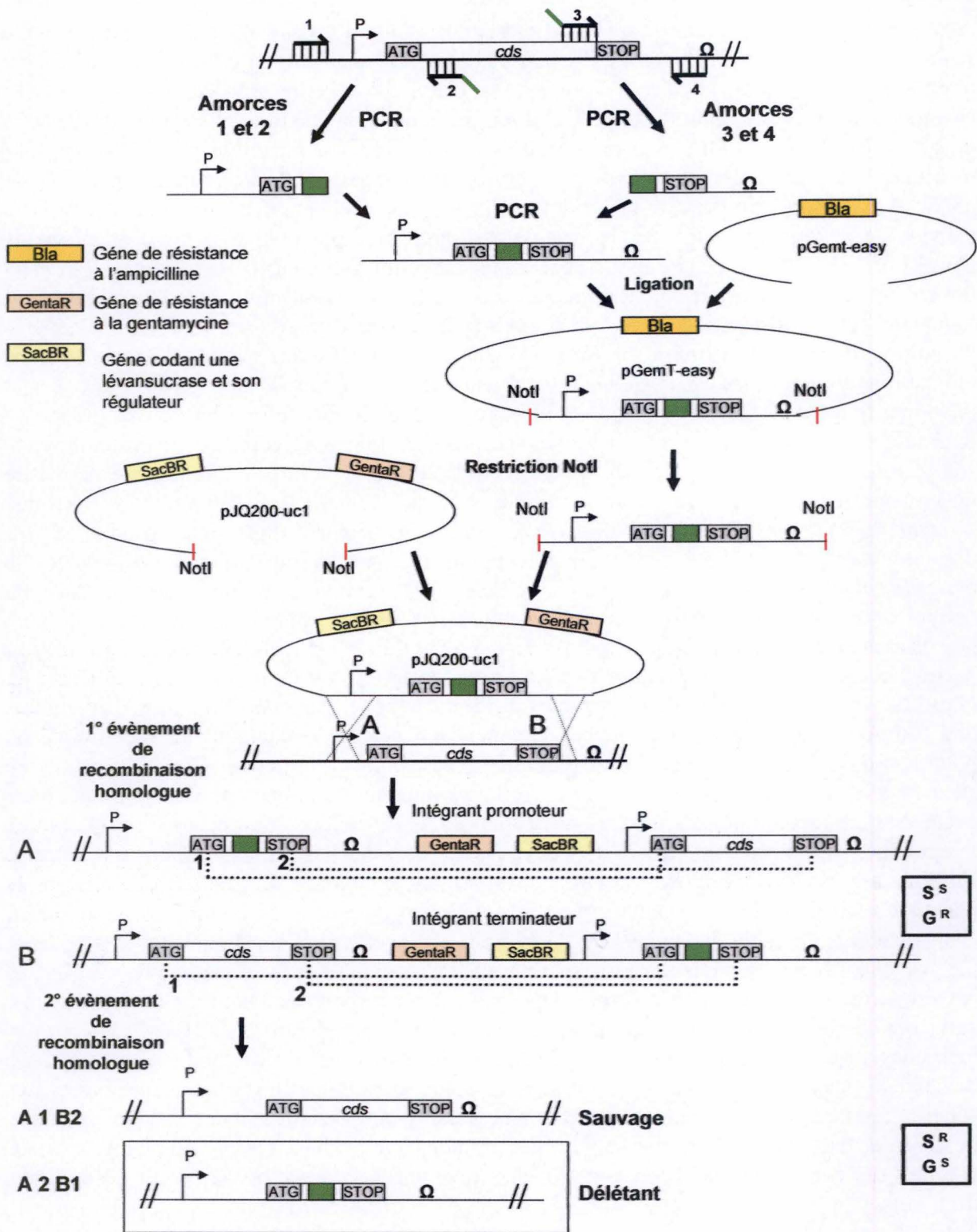


Figure 17 : Stratégie utilisée pour obtenir des mutants délétés de *cds* d'intérêts. S^R : phénotype de résistance au sucrose, S^S : phénotype de sensibilité au sucrose, G^R : phénotype de résistance à la gentamycine, G^S phénotype de sensibilité à la gentamycine.

Les flèches en arçon (\curvearrowright) symbolisent les amorces PCR. \overleftarrow{P} représente la région amont de la *cds*. Le Ω représente la région aval de la *cds*

90% des phases ouvertes de lecture présentes dans le génome de *Brucella melitensis*, chacune étant clonée dans des plasmides pDONR201 compatibles avec le système Gateway™ (voir matériels et méthodes page 57). La réalisation d'une réaction LR entre les plasmides pDONR201-*picC*, pDONR201-*pipP*, pDONR201-*fumC* et le plasmide intégratif pKSoriT-*KanR-GW-Flag* permettait le remplacement de la cassette Gateway™ par le gène d'intérêt et la mise en fusion de ce gène d'intérêt avec la séquence *flag*. Les constructions ainsi obtenues étaient donc le pKSoriT-*kanR-picC-Flag*, le pKSoriT-*kanR-pipP-Flag* et le pKSoriT-*kanR-fumC-Flag*. Ces plasmides de destination ainsi obtenus ont ensuite été électroporés dans des souches d'*Escherichia coli* S17-1 afin de permettre, par conjugaison, leur introduction dans des souches de *Brucella abortus*. Un événement de recombinaison homologue a permis l'intégration de ces plasmides dans le génome de *Brucella abortus*. La fusion du gène d'intérêt avec la séquence *flag* se retrouve sous l'influence du promoteur natif du gène en question, mais en gardant la copie sauvage du gène en une position aval sur le chromosome, sans promoteur.

Mutants obtenus

Le caractère léthal d'une souche délétée pour le gène *pdhS* chez *Brucella abortus* soulève la question de l'essentialité des interactants de PdhS ou des phénotypes que provoquerait la délétion des gènes encodant ces interactants. Des liaisons génétiques pourraient ainsi être mises en évidence par comparaison de phénotypes chez des mutants de ces gènes *picC*, *pipP* et *fumC*.

La stratégie utilisée afin de déléter les gènes *picC*, *pipP* et *fumC* du génome de *Brucella abortus* faisait appel à la technique de PCR et nécessitait deux couples d'amorces nommées 1-2 et 3-4 (**Fig17**). Les amorces 2 et 3 étaient flanquées à leur extrémité 5' flottantes de séquences anti-complémentaires entre elles. Une première PCR à l'aide du premier couple d'amorce (amorces 1 et 2) amplifiait la région promotrice ainsi que les 5 premiers codons du gène *pdhS* (environ 500 pb) tandis que les 5 derniers codons et la région terminatrice de *pdhS* ont été amplifiés à l'aide d'une deuxième PCR également de 500 pb utilisant le second couple d'amorces (3 et 4). Ces deux produits PCR ainsi obtenus ont été liés par une troisième PCR qui donnait un produit de 1000 pb. Les sites anti-complémentaires ajoutés sur les amorces 2 et 3 constituaient des régions d'homologies afin de permettre l'appariement de deux brins d'ADN lors de la troisième PCR. Les 5 premiers et les 5 derniers codons sont dans la même phase de lecture. La séquence de ces régions anti-complémentaires est donc un multiple de trois nucléotides. Le couple d'amorces 1-4 était nécessaire dans un des deux cas de figures présentés par cette troisième PCR. Ensuite, les produits PCR de 1000 pb ont été clonés dans le plasmide pGEMT-easy et transformés dans des souches d'*Escherichia coli* DH10B. Les cellules qui possédaient ces plasmides ont été sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline. Cette fusion (amont-aval) fut ensuite excisée par une restriction avec l'enzyme *NotI* puis liguée dans le pJQ200-uc1 restreint également en *NotI*. Une restriction supplémentaire par l'enzyme *ScaI* permettait de cliver la matrice du pGemT-easy et de favoriser ainsi l'évènement de ligation recherché : le clonage des produits de la troisième PCR dans le pJQ200-uc1. Après électroporation dans des cellules S17-1 d'*Escherichia coli*, les plasmides pJQ200-uc1 ont été introduits par conjugaison dans la souche *Brucella abortus* 544. A nouveau, deux évènements de recombinaison homologue,

grâce aux régions promotrice et terminatrice flanquant les codons initiateur et terminateur du gène d'intérêt, ont permis l'intégration et l'excision du plasmide dans le génome de *Brucella abortus*. Pratiquement, l'excision du plasmide se réalisait lors de repiquages des souches en milieux non sélectifs. Ensuite, l'étalement des souches sur du milieu contenant du sucrose permettait de sélectionner les bactéries ayant perdu le marqueur de contre-sélection *sacBR* et donc le pJQ200-uc1. Enfin, un repiquage de ces cellules sur un milieu contenant de la gentamycine suivi directement d'un repiquage sur 2YT permettaient de mettre en évidence les bactéries sensibles à la gentamycine. A ce stade, des mutants potentiels ont été sélectionnés et systématiquement vérifiés par PCR. Cette dernière vérification par PCR permettait de s'assurer de l'absence de la cds à déléter. Un premier couple d'amorces était dessiné à l'extérieur de la cds pour s'hybrider aux régions bordantes du gène afin de s'assurer de la taille de la région d'intérêt, délétée du gène. Une deuxième paire d'amorces fut dessinée pour s'hybrider à l'intérieur du gène et ainsi vérifier l'absence du gène dans le génome de ces mutants.

A l'aide de cette méthode, deux souches mutantes de *Brucella abortus* ont pu être obtenues : les délétants *pipP* ainsi que *fumC* (notés respectivement par convention *B.abΔpipP* et *B.abΔfumC*). Le succès de l'obtention de ces deux souches mutantes permet de considérer ces deux gènes comme non essentiels. Par contraste, toutes les tentatives d'obtention d'un mutant de délétion *Brucella abortus ΔpicC* ont échoué. Autrement dit, toutes les souches résistantes au sucrose et sensibles à la gentamycine se sont révélées être, après PCR, des souches revenues à la situation sauvage. Cette constatation suggère que le gène *picC* soit essentiel chez cette espèce. Une hypothèse alternative serait qu'il existe une recombinaison amont ou aval préférentielle qui mènerait systématiquement à l'obtention au final de souches sauvages. Afin de vérifier l'existence d'un tel biais dans l'évènement d'intégration, des PCR ont été réalisées après l'intégration du plasmide au génome de *Brucella abortus*, autrement dit lorsque les cellules sont étalées sur un milieu contenant de la gentamycine. En cas d'absence de biais, environ 50% des intégrations seraient en amonts et 50% en aval du gène. Sur 17 PCR réalisées, nous obtenons 8 intégrants amonts et 9 intégrants avals. Cette donnée suggère qu'aucun biais de recombinaison n'existe dans ce cas précis.

Pour les observations au microscope, des précultures de trois clones indépendants de chacun des mutants (*B.abΔpipP* et *B.abΔfumC*) ont été lancées la veille de l'observation, dans un milieu liquide sélectif, afin de permettre une observation au microscope des souches à une DO^{600} d'environ 0,5. Le jour même de l'observation, les bactéries furent étalées sur *agarose pad* (voir matériels et méthodes page 62) afin de les garder vivantes pour l'observation sous le microscope. La technique de microscopie en DIC (contraste interférentiel différentiel, *Normarski*) est utilisée pour l'observation de préparations non colorées. Deux rayons séparés spatialement par une très courte distance traversent les spécimens en deux points différents mais très proches. Si ces deux rayons lumineux traversent des matériaux cellulaires différents, par exemple une membrane phospholipidique pour l'un et le cytoplasme pour l'autre, ces rayons subiront un déphasage différent. Suivant la différence de phase entre ces rayons, un contraste positif ou négatif sera généré. Les structures cellulaires seront ainsi révélées. Concernant les observations en microscopie à épifluorescence, les longueurs d'ondes utilisées correspondaient aux longueurs d'ondes de l'YFP (voir matériels et méthodes page 63).

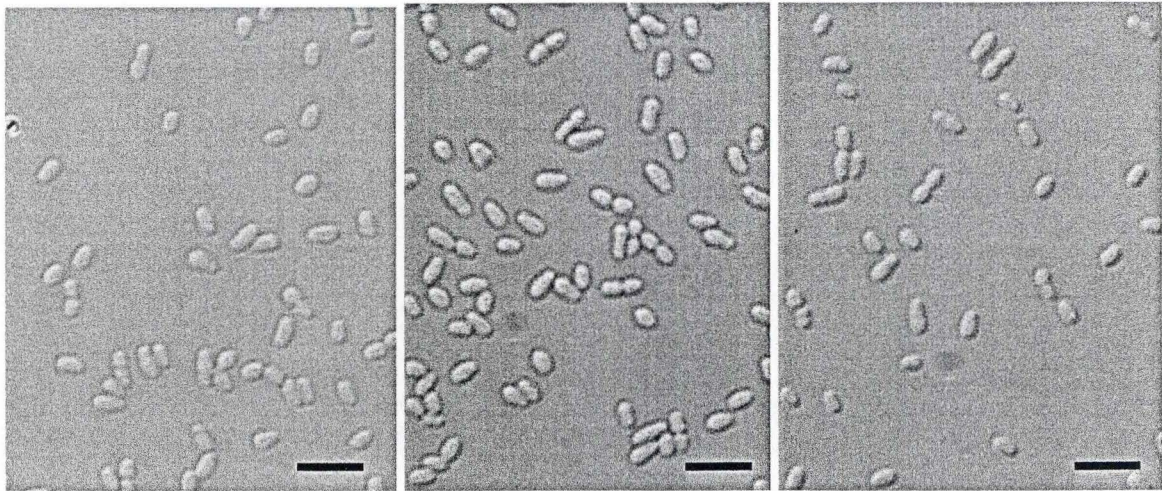


Figure 18 : Micrographies obtenues en DIC. A gauche, souche sauvage de *Brucella abortus* 544. Au milieu, *Brucella abortus* Δ *fumC*. A droite, *Brucella abortus* Δ *pipP*. La barre d'échelle représente 2 μ m.

Aucun phénotype particulier n'est détecté dans ces conditions d'observation pour les mutants *Brucella abortus* Δ *fumC* et *Brucella abortus* Δ *pipP* par rapport à la souche sauvage *Brucella abortus* 544 (**Fig18**).

Profils de localisation chez *Brucella abortus*

Localisation de PdhS-YFP chez *Brucella abortus*

Les plasmides pMR10*cat-pdhS-yfp* et pKSoriT-*kanR-pdhS-yfp* furent introduits dans la souche sauvage *Brucella abortus* 544. Trois cultures liquides à partir de trois clones indépendants ont été réalisées la veille de l'observation. Les bactéries étaient disposées sur *agarose pad* lorsque les cultures liquides atteignaient une DO⁶⁰⁰ de 0,5 pour l'observation au microscope.

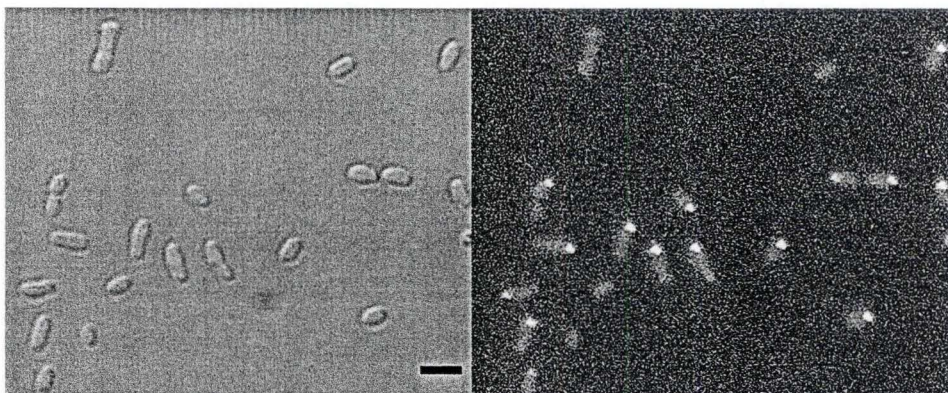


Figure 19 : Visualisation de la localisation de PdhS-YFP dans la souche *Brucella abortus* pMR10*cat-pdhS-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 μ m.

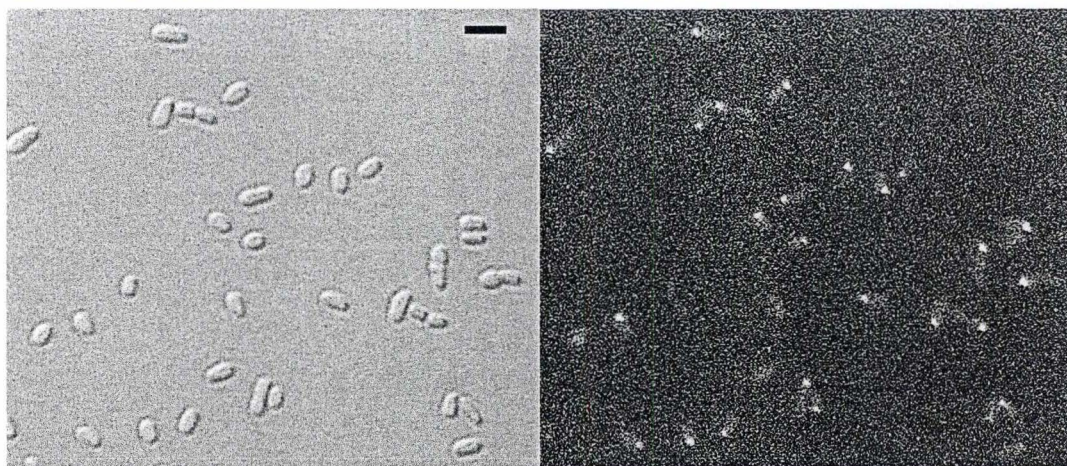


Figure 20 : Visualisation de la localisation de PdhS-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pKSoriT-kanR-pdhS-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

Des foci fluorescents sont observés au pôle, suggérant une localisation polaire de PdhS-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pKSoriT-kanR-pdhS-yfp ainsi que dans la souche *Brucella abortus* pMR10cat-pdhS-yfp. Ce qui confirme des données antérieures ^(Hallez et al., 2007b).

Etant donné que PdhS est localisée à un pôle chez *Brucella abortus* 544, nous posons l'hypothèse d'une localisation polaire de ses interactants. Il s'agirait d'un argument de plus en faveur des interactions potentielles mises en évidence par le test double hybride en levure.

Construction des différentes souches

Les séquences codantes (cds) *picC*, *pipP* et *fumC* sont accessibles au sein de l'ORFéome de *Brucella melitensis* dans des plasmides pDONR201 compatibles avec le système GatewayTM (Dricot et al., 2004). Deux réactions LR pour chaque plasmide pDONR201 ont été réalisées : l'une avec un plasmide réplcatif à faible nombre de copies nommé pMR10cat-GW-yfp (nommé pRH005) et l'autre avec un plasmide intégratif nommé pKSoriT-kanR-GW-yfp (pRH011), tous deux compatibles avec le système GatewayTM (Hallez et al., 2007a). Les plasmides intégratifs permettent l'intégration chromosomique de la construction d'intérêt avec comme conséquence l'insertion de la construction sous l'influence du promoteur natif. A l'opposé, les plasmides réplcatifs, présents en plusieurs copies non chromosomiques, peuvent provoquer la surexpression de la protéine. La cds présente sur ces plasmides se trouve sous l'influence d'un promoteur nommé *Plac* constitutif chez *Brucella abortus*. Les plasmides réplcatifs permettent d'augmenter le signal de fluorescence dans le cas de protéines fusionnées à des fluorochromes. Les vecteurs de destination ainsi obtenus étaient les plasmides pKSoriT-kanR-*picC*-yfp, pKSoriT-kanR-*pipP*-yfp et pKSoriT-kanR-*fumC*-yfp ainsi que les plasmides pMR10cat-*picC*-yfp, pMR10cat-*pipP*-yfp et pMR10cat-*fumC*-yfp. Ces constructions ont ensuite été électroporées dans des souches d'*Escherichia coli* S17-1 compétentes pour effectuer le phénomène de conjugaison chez *Brucella abortus* 544. L'observation des souches transformées s'effectuait à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Localisation de FumC-YFP chez *Brucella abortus*

Les plasmides pKSoriT-kanR-fumC-yfp et pMR10cat-fumC-yfp furent introduits dans des souches sauvages de *Brucella abortus* par conjugaison. Les trois cultures correspondant à trois clones indépendants atteignant une DO⁶⁰⁰ de 0,5 ; les bactéries furent donc étalées sur *agarose pad* pour l'observation au microscope.

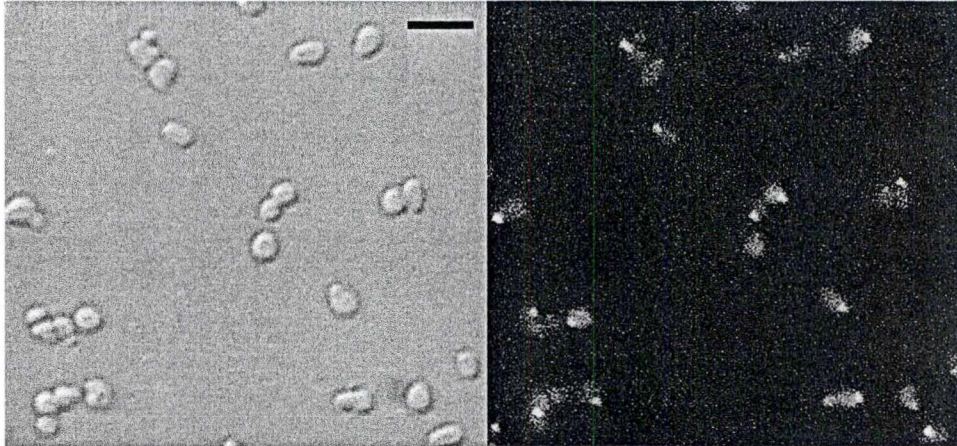


Figure 21 : Visualisation de la localisation polaire de FumC-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pKSoriT-kanR-fumC-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

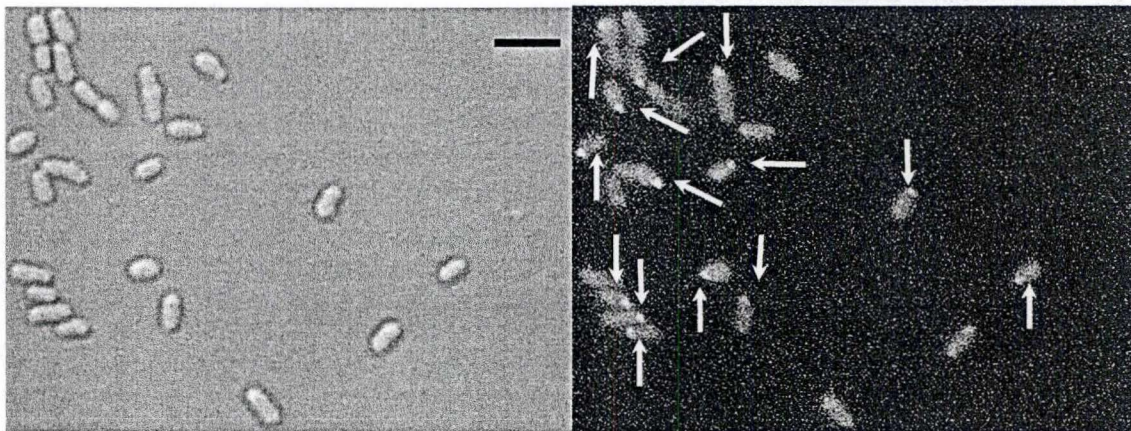


Figure 22 : Observation de la localisation de FumC-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pMR10cat-fumC-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. Les flèches blanches pointent les foci lumineux. La barre d'échelle représente 2µm.

Des foci lumineux polaires sont observés, suggérant une localisation également polaire de FumC-YFP après insertion du plasmide pKSoriT-kanR-fumC-yfp dans des souches de *Brucella abortus* (**Fig21**). Un profil de localisation semblable est observé lors d'une fusion de FumC avec la protéine fluorescente YFP à l'aide d'un plasmide répliatif (**Fig22**). Le profil de localisation à l'aide de ce plasmide répliatif pMR10cat fumC-yfp est cependant moins net par rapport au profil obtenu par le plasmide intégratif pKSoriT-kanR-fumC-yfp. Ceci pourrait s'expliquer par la surproduction de la fusion FumC-YFP. La souche *Brucella abortus* pKSoriT-kanR-fumC-yfp montre une morphologie arrondie (**Fig21**). Ce dernier phénotype sera à reconfrmer.

Localisation de FumA-YFP chez *Brucella abortus*

Le fait qu'une fumarate hydratase cytoplasmique potentiellement impliquée dans le cycle de Krebs se caractérise par une localisation polaire est, *a priori*, interpellant. L'intérêt soulevé par cette constatation vise la localisation potentielle d'une autre fumarate hydratase, FumA (voir introduction page 18). Afin de vérifier si la localisation polaire de FumC représente une caractéristique partagée par FumA, FumA fut également fusionnée à l'YFP. Un séquençage du gène *fumA* provenant l'ORFéome de *Brucella melitensis* a été réalisé. Ce séquençage ne révélant aucune mutation, une réaction LR a ensuite été réalisée entre le pDONR201-*fumA* et les plasmides réplcatifs et intégratifs, pMR10*cat*-GW-*yfp* (pRH005) et pKS*SoriT*-*kanR*-GW-*yfp* (pRH011), respectivement.

Le plasmide pMR10*cat-fumA-yfp* fut introduit par conjugaison dans une souche sauvage de *Brucella abortus*. Les cultures cellulaires de trois clones indépendants atteignant une DO⁶⁰⁰ de 0.5, les cellules furent étalées sur agarose *pad* pour observation au microscope.

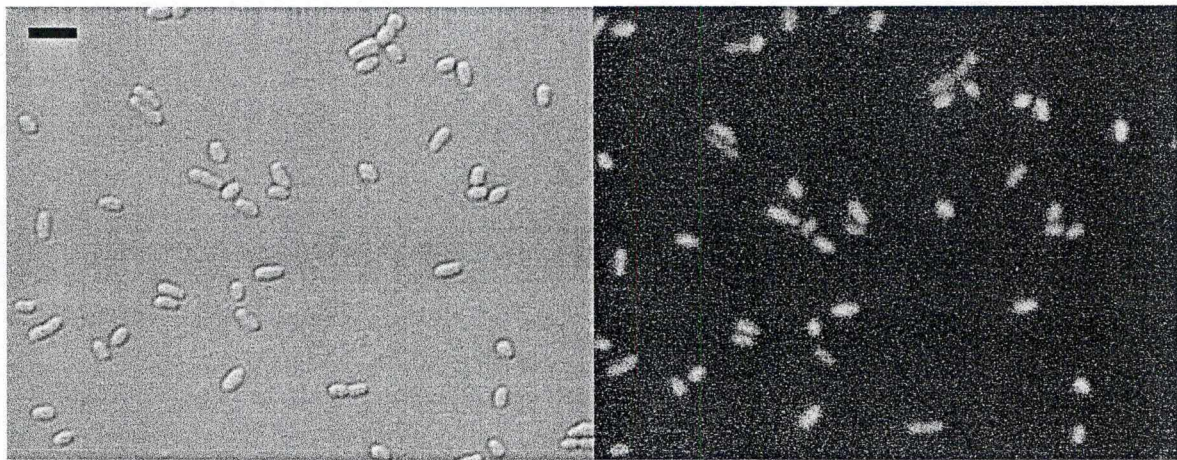


Figure 23 : Visualisation de la localisation de FumA-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pMR10*cat-fumA-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

Aucun focus fluorescent polaire n'est observé, suggérant qu'aucune localisation polaire de FumA-YFP n'est détectée après insertion du plasmide pMR10*cat-fumA-yfp* dans la souche de *Brucella abortus* (**Fig23**), argument en faveur d'un pattern de localisation diffus de FumA dans le cytoplasme.

Localisation de PipP-YFP chez *Brucella abortus*

Le plasmide pMR10*cat-pipP-yfp* fut introduit dans la souche sauvage *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Des cultures liquides réalisées en milieu sélectif à partir de trois clones indépendants étaient à une DO⁶⁰⁰ d'environ 0,5. Les bactéries furent étalées sur *agaroses pad* pour observation au microscope.

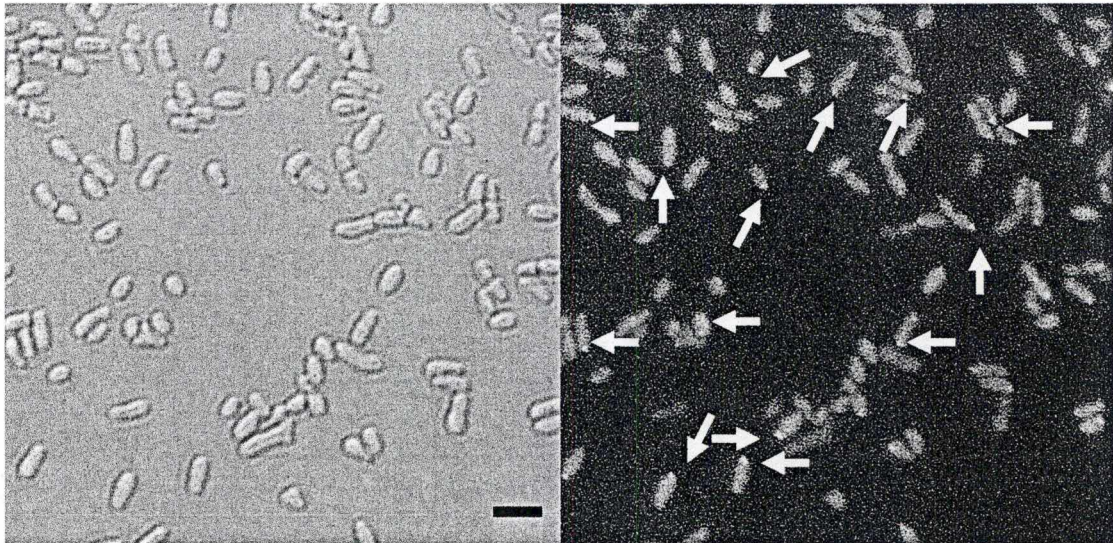


Figure 24 : Visualisation de la localisation de PipP-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pMR10cat-pipP-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. Les flèches blanches pointent des foci fluorescents. La barre d'échelle représente 2 μ m.

Des foci lumineux sont visibles chez la souche *Brucella abortus* 544 pMR10cat-pipP-yfp, suggérant un profil de localisation polaire de PipP-YFP (**Fig24**).

Localisation de PicC-YFP chez *Brucella abortus*

Les plasmides pKSoriT-kanR-picC-yfp et pMR10cat-picC-yfp furent introduits dans la souche sauvage *Brucella abortus* 544 par conjugaison. Les cultures cellulaires en milieu liquide sélectif arrivées à une DO⁶⁰⁰ de 0,5 ; des cellules ont été prélevées de chacune des trois cultures et étalées sur des *agarose pads* pour l'observation au microscope.

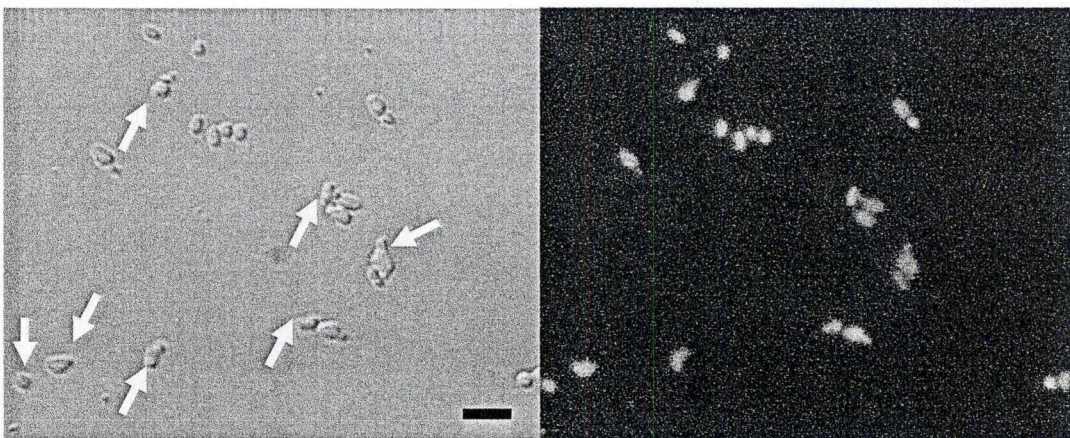


Figure 25 : Observation de la localisation de PicC-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pKSoriT-kanR-picC-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. Les flèches blanches indiquent des cellules montrant des aberrations morphologiques. La barre d'échelle représente 2 μ m.

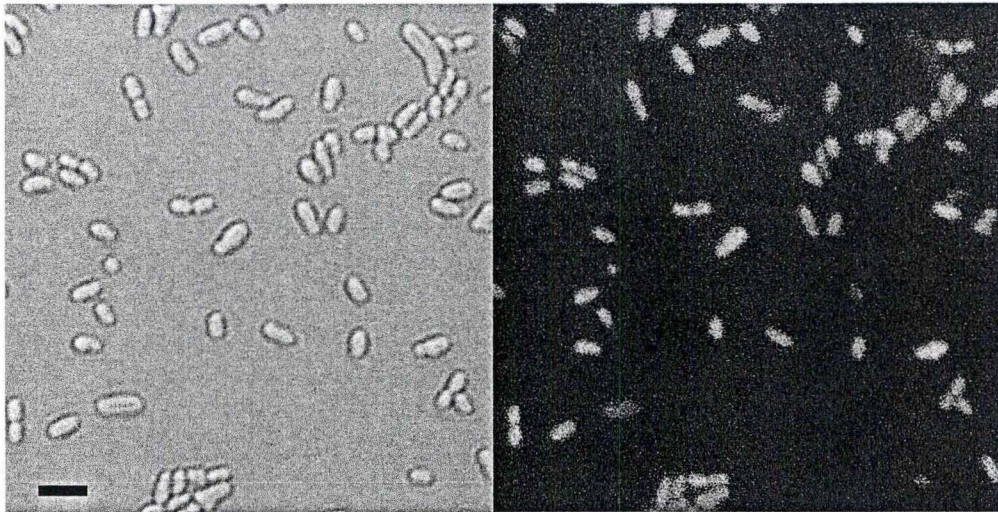


Figure 26 : Observation de la localisation de PicC-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 pMR10cat-*picC-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

Aucun foci lumineux polaire n'est détecté après observation au microscope des souches *Brucella abortus* pKSoriT-*kanR-picC-yfp* et *Brucella abortus* 544 pMR10cat-*picC-yfp* (**Fig25-26**). Cette donnée suggère un pattern de localisation diffus cytoplasmique concernant la fusion protéique PicC-YFP dans ces conditions d'observation. De plus, la fusion PicC-YFP exprimée sur le plasmide pKSoriT-*kanR-picC-yfp* semble gêner le développement normal de la bactérie (**Fig25**). En effet, des aberrations morphologiques de ces cellules sont observées. Rappelons que le gène *picC* semble essentiel.

Profils de localisation chez les mutants *Brucella abortus* Δ fumC et Δ pipP

Deux des trois interactants potentiels de PdhS, FumC et PipP possède une localisation polaire. La question du rôle de FumC et PipP sur la localisation de PdhS est posée. Des modifications de pattern de localisation de PdhS pourraient être observées chez ces mutants si la localisation de PdhS dépend de PipP ou de FumC. Cette observation représenterait un argument de plus concernant les interactions protéiques entre ces acteurs. Afin de tester cette hypothèse, les localisations de PdhS ainsi que ses interactants furent visualisées en fusionnant ces protéines avec des molécules fluorescentes YFP chez les deux mutants obtenus, *Brucella abortus* Δ fumC et *Brucella abortus* Δ pipP.

Localisation de PdhS-YFP chez la souche *Brucella abortus* Δ fumC

Les plasmides pMR10cat-*pdhS-yfp* et pKSoriT-*kanR-pdhS-yfp* furent introduits dans la souche mutante de *Brucella abortus* Δ fumC par conjugaison. Des cultures liquides réalisées à partir de trois clones indépendants étant arrivées à une DO⁶⁰⁰ d'environ 0,5 ; les bactéries furent étalées sur *agaroses pad* pour observation au microscope.

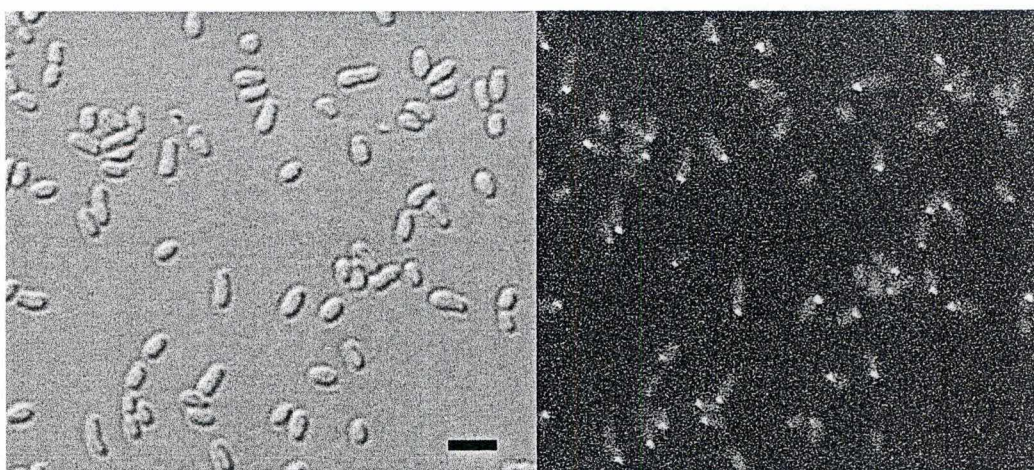


Figure 27 : Observation de la localisation de PdhS-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 Δ *fumC* pK*SoriT-kanR-pdhS-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 μ m.

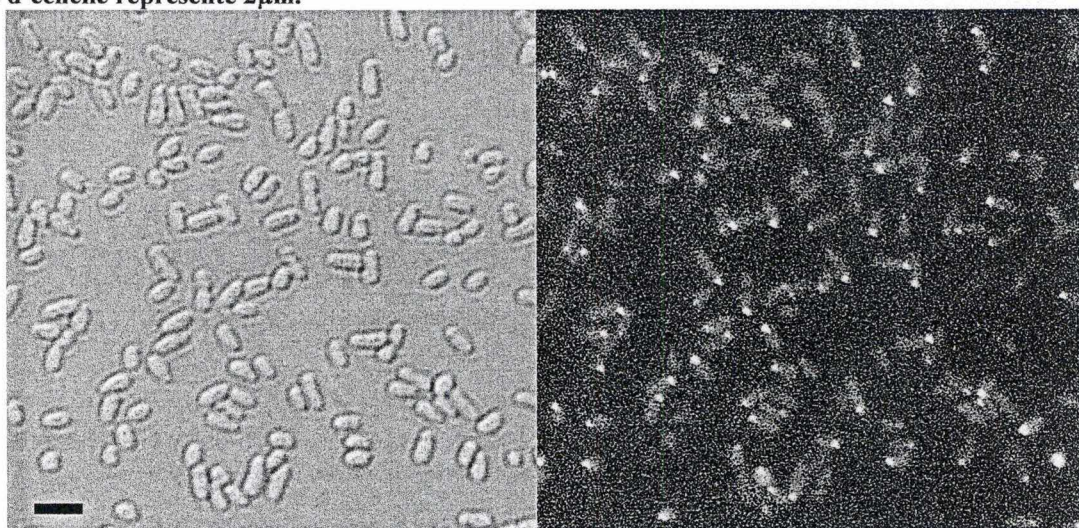


Figure 28 : Observation de la localisation de PdhS-YFP dans la souche *Brucella abortus* 544 Δ *fumC* pMR10*cat-pdhS-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 μ m.

La visualisation de foci fluorescents aux pôles suggère une localisation polaire de la fusion protéique PdhS-YFP chez la souche mutante *Brucella abortus* 544 Δ *fumC* (Fig 27-28), à l'instar de la souche sauvage de *Brucella abortus* (Fig19-20). *FumC* n'est donc pas requis pour la localisation polaire de PdhS-YFP.

Localisation de PdhS-YFP chez la souche *Brucella abortus* Δ *pipP*

Le plasmide intégratif pK*SoriT-kanR-pdhS-yfp* fut introduit dans la souche mutante de *Brucella abortus* Δ *pipP* par conjugaison. Les cultures cellulaires liquides arrivées à une DO⁶⁰⁰ d'environ 0,5 le jour de l'observation ; les cellules furent étalées sur *agarose pad* pour la visualisation au microscope.

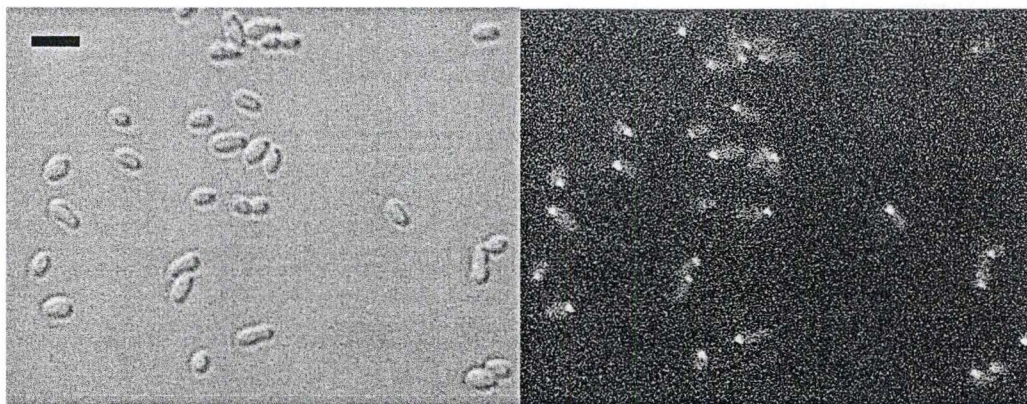


Figure 29 : Visualisation du pattern de localisation de PdhS-YFP chez la souche *Brucella abortus* $\Delta pipP$ pKSoriT-kanR-pdhS-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle vaut 2 μ m.

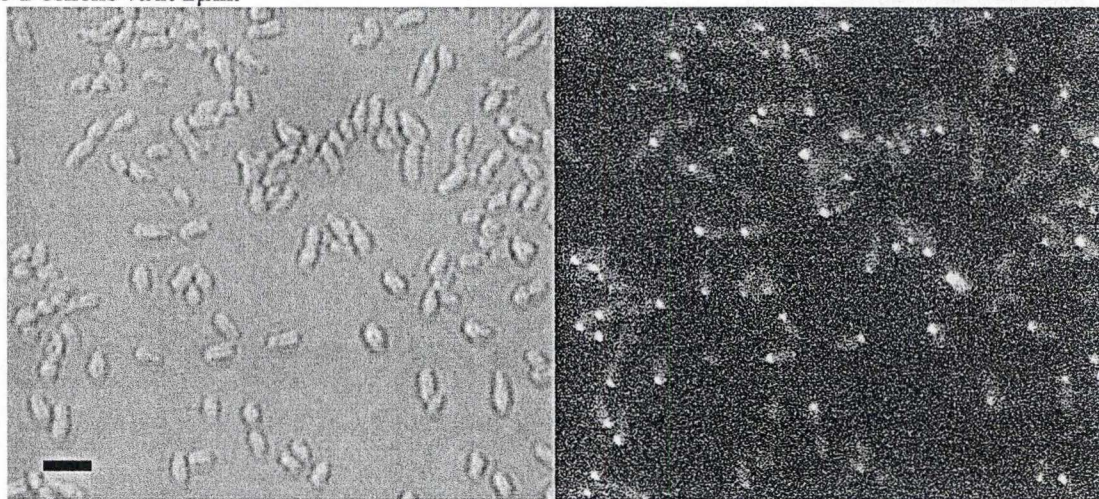


Figure 30 : Visualisation du pattern de localisation de PdhS-YFP chez la souche *Brucella abortus* $\Delta pipP$ pMR10cat-pdhS-yfp. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle vaut 2 μ m.

L'observation de foci fluorescents polaires suggère un profil de localisation au pôle de la fusion protéique PdhS-YFP chez la souche mutante *Brucella abortus* $\Delta pipP$ (Fig14) à l'instar de la souche sauvage de *Brucella abortus* (Fig19-20). PipP n'est donc pas requis pour la localisation polaire de PdhS-YFP.

Localisation de FumC-YFP chez la souche *Brucella abortus* $\Delta fumC$

La protéine FumC forme des tétramères^(Weaver et al., 1995). Dès lors, la localisation polaire observée dans les souches *Brucella abortus* pKSoriT-kanR-fumC-yfp et *Brucella abortus* pMR10cat-fumC-yfp citées plus haut attribuée à FumC-YFP pourrait être due à la présence d'une concentration endogène existante de FumC. En effet, dans ces souches, la copie endogène du gène *fumC* est toujours présente dans le génome. Ces protéines FumC endogènes seraient déjà localisées et recruteraient les fusions FumC-YFP au pôle. Afin de vérifier si FumC-YFP est capable de se localiser seule, la localisation de FumC-YFP dans la souche mutante *Brucella abortus* $\Delta fumC$ a été observée.

Le plasmide répliquatif pMR10cat-fumC-yfp fut introduit chez la souche mutante *Brucella abortus* $\Delta fumC$ par conjugaison. Trois clones indépendants ont été mis en culture la veille de l'observation au microscope afin d'obtenir une DO^{600} d'environ 0,5 lors de

l'observation au microscope. Une fois cette valeur atteinte, un échantillon de cellules fut disposé sur des *agarose pads* pour la visualisation en microscopie.

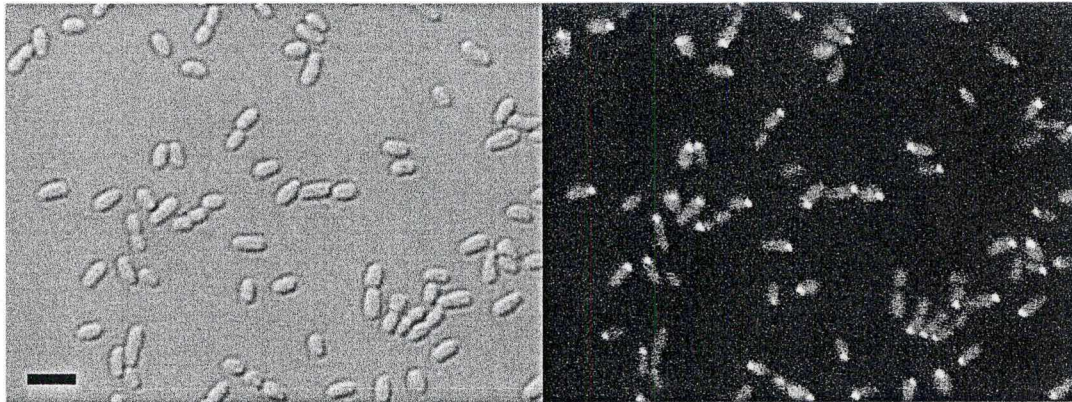


Figure 31 : Visualisation de la localisation de FumC-YFP dans la souche mutante *Brucella abortus* Δ *fumC* pMR10*cat-fumC-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2 μ m.

Nous observons des foci lumineux polaires dans la souche *Brucella abortus* Δ *fumC* pMR10*cat-fumC-yfp*, suggérant une localisation polaire de la construction FumC-YFP (Fig31). Le profil de localisation de FumC-YFP est net et de surcroît beaucoup plus net que le pattern de localisation observé pour FumC-YFP dans une souche sauvage (Fig22). Deux raisons peuvent être avancées : le plasmide répliquatif utilisé permet la surexpression de FumC-YFP d'une part, augmentant le signal de fluorescence. Mais également le fait que la compétition entre les copies de FumC endogènes avec les fusions protéiques FumC-YFP est devenue dès lors inexistante. Ces résultats vérifient d'une part que la fusion protéique FumC-YFP est fonctionnelle seule pour sa localisation polaire. Et d'autre part que la fusion avec l'YFP n'altère pas cette localisation.

Localisation de FumA-YFP chez la souche *Brucella abortus* Δ *fumC*

Prenant en compte la localisation polaire de la protéine FumC dans la souche sauvage de *Brucella abortus* ainsi que sa fonction comparable à FumA, l'hypothèse du remplacement de FumC au pôle par FumA chez une souche mutante de *Brucella abortus* déléetée pour le gène *fumC* fut avancée. Dans cette optique, la fusion FumA-YFP fut introduite dans la souche de *Brucella abortus* Δ *fumC* par conjugaison. Les cultures liquides des trois clones indépendant étaient à une DO⁶⁰⁰. Les cellules furent étalées sur *agarose pad* et observées au microscope.

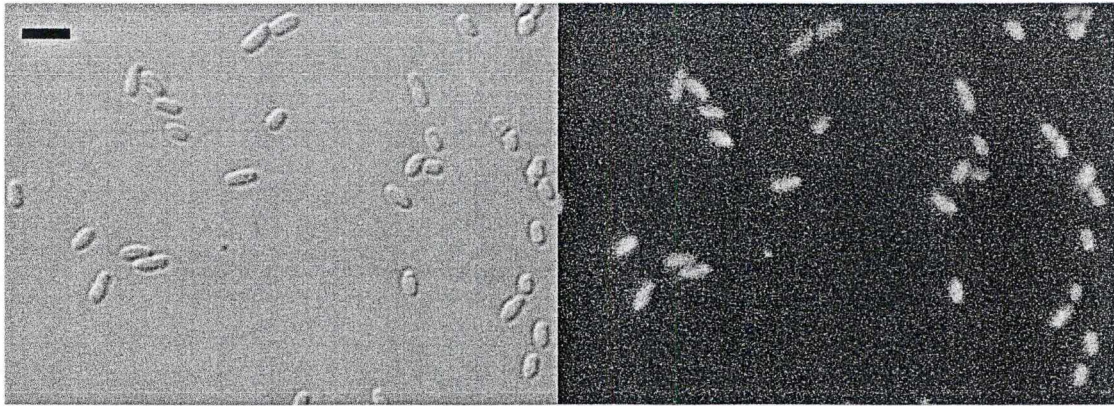


Figure 32 : Observation de la localisation de FumA-YFP dans la souche mutante *Brucella abortus* Δ *fumC* pMR10*cat-fumA-yfp*. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. La barre d'échelle représente 2µm.

Aucun foci lumineux n'est détecté, suggérant une localisation diffuse cytoplasmique de la fusion protéique FumA-YFP (**Fig32**). Ce pattern de localisation diffus est comparable au profil de localisation diffus de FumA-YFP chez la souche sauvage (**Fig23**). La délétion du gène *fumC* ne provoque donc pas de localisation polaire de FumA-YFP.

Localisation de PipP-YFP chez la souche *Brucella abortus* Δ *pipP*

À l'instar de FumC, PipP pourrait former des multimères. Dès lors, afin de vérifier si d'une part la protéine PipP est capable seule de se localiser au pôle et d'autre part si la fusion PipP-YFP est fonctionnelle pour la localisation, le plasmide pMR10*cat-pipP-yfp* fut introduit par conjugaison dans des cellules mutantes de *Brucella abortus* Δ *pipP*. Trois cultures liquides contenant chacune un clone indépendant ont été réalisées et montraient une DO⁶⁰⁰ de 0,5 au moment de l'observation au microscope des bactéries sur *agarose pad*.

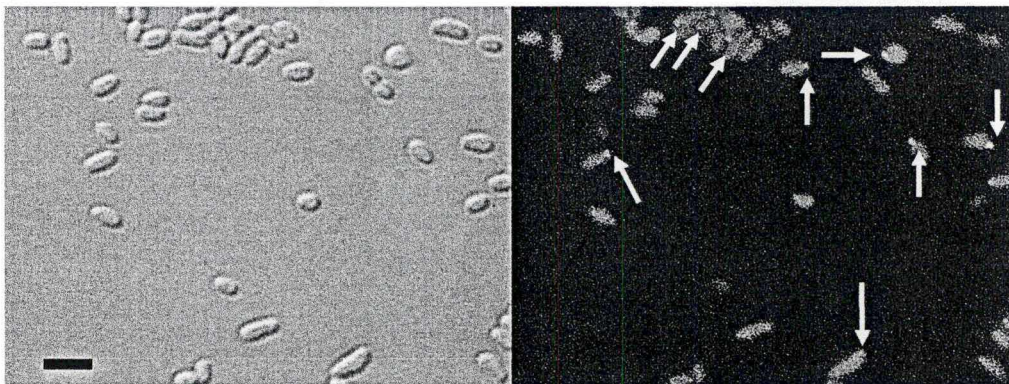


Figure 33 : Observation du pattern de localisation de PipP-YFP dans la souche *Brucella abortus* Δ *pipP* pMR10*cat-pipP-yfp*. A gauche, micrographie obtenue en DIC. A droite, micrographie obtenue en épifluorescence. Les flèches blanches indiquent des foci lumineux. La barre d'échelle représente 2µm.

L'observation de foci lumineux polaires suggère une localisation également polaire de PipP-YFP (**Fig33**). Cependant, une faible proportion de la population porte un pôle marqué. De plus, le profil de localisation est moins net par rapport aux autres fusions déjà citées.

Discussion

Une des limitations du test double hybride en levure repose sur la difficulté de mettre en évidence des interactions qui impliquent des protéines membranaires. Ces protéines membranaires, si elles existent, seraient toutefois intéressantes dans l'étude de la localisation de PdhS. Afin de découvrir d'autres interactants, une technique biochimique supplémentaire pourra être utilisée : une double purification d'affinité en tandem grâce à une fusion au TAP-Tag. La séquence Tap-Tag contient les séquences de la protéine A possédant une forte affinité pour les IgG, un site de clivage spécifique reconnu par une protéase (TEV : tabacco etching virus) et enfin un peptide de haute affinité à la calmoduline. Dans une première colonne d'affinité, des billes recouvertes d'Immoglobulines G (IgG) retiennent les protéines de fusion via la protéine A. Ces anticorps vont donc non seulement retenir la fusion protéique contenant PdhS mais également indirectement d'autres protéines en interaction physique avec PdhS. Ces complexes vont ensuite être élués grâce à une protéase spécifique qui va cliver le site TEV du Tap-Tag. Les complexes ainsi élués vont être retenus dans une seconde colonne d'affinité contenant des billes associées à la calmoduline en présence de calcium. Le peptide de haute affinité à la calmoduline ancrera donc le complexe protéique qui sera retenu dans cette colonne. Enfin, ces complexes seront élués par ajout sur la colonne d'un chélateur de calcium (EGTA) libérant le complexe contenant ce peptide de haute affinité pour la calmoduline en fusion avec PdhS ainsi que les interactants potentiels de PdhS. Ces protéines, après électrophorèse, seront identifiées par spectrométrie de masse. Il s'agit d'une méthode spécifique qui demande cependant une importante quantité de protéines de départ.

Au vu des résultats, les gènes *pipP* et *fumC* apparaissent comme non essentiels à la viabilité des souches de *Brucella abortus*. Ces deux délétants ne présentent aucun phénotype particulier dans les conditions d'observation utilisées, aucun test de complémentation n'est donc envisageable pour le moment. Cependant, il est probable que des phénotypes puissent être mis en évidence en utilisant d'autres conditions expérimentales telles un choc oxydatif ou une déplétion en fer du milieu. L'impossibilité d'obtenir une souche de *Brucella abortus* délétée du gène *picC* argumente en faveur du caractère essentiel de ce gène. Une façon de démontrer l'essentialité de ce gène serait d'amener un plasmide de sauvegarde portant une copie du gène *picC* durant les manipulations expérimentales menant à l'obtention du mutant *Brucella abortus* Δ *picC*.

		Intégratif pRH011	Réplicatif pRH005
<i>B.ab</i> 544	PdhS	YFP	YFP
	FumC	YFP	YFP
	PipP		YFP
	PicC	YFP	YFP
	FumA		YFP
<i>B.ab</i> Δ <i>fumC</i>	PdhS	YFP	YFP
	FumC	X	YFP
	FumA		YFP
<i>B.ab</i> Δ <i>pipP</i>	PdhS	YFP	YFP
	PipP	X	YFP

Tableau 1 : Récapitulatif des localisations concernant les fusions protéiques utilisées. Les lettres YFP sur fond gris marquent les profils de localisations polaires. Les lettres YFP sur fond blanc signifie que les patterns de localisation sont cytoplasmiques. Les cases vides représentent des observations non réalisées à ce jour. Les cases marquées d'un "X" représentent deux souches qui ne peuvent être obtenues dans ces conditions

La localisation unipolaire des fusions protéiques FumC-YFP (**Fig21-22**) et PipP-YFP (**Fig24**) dans les cellules de *Brucella abortus* 544 rappelle la localisation polaire de PdhS-YFP. Nous posons l'hypothèse d'une localisation de ces interactants au vieux pôle. Une expérience de co-localisation renseignerait dès lors sur le bien fondé de cette hypothèse. Une souche de *Brucella abortus* exprimant la fusion protéique PdhS-CFP est depuis peu disponible au sein du laboratoire (Delphine Dotreppe, thèse en cours). Cette souche permettra de réaliser ces expériences de co-localisation entre PdhS et ses interactants. En outre, une expérience complémentaire de "time lapse" permettrait de voir avec quelle cinétique et dans quel ordre ces protéines s'associent au vieux pôle.

Le profil de localisation cytoplasmique de PicC-YFP est constaté. Une explication serait que la protéine fluorescente YFP soit clivée et que PicC se localise bien au pôle à l'instar de PipP et de FumC. Cependant, un western blot réalisé au laboratoire (Johann Mignolet, thèse en cours) a montré que les fusions protéiques PicC-YFP sont bien présentes chez les souches mutantes de *Brucella abortus* considérées. A contrario, PicC pourrait ne pas interagir avec PdhS *in vivo* ou alors cette interaction pourrait ne pas être suffisamment forte pour ancrer PicC au pôle. Une autre hypothèse serait que la fusion de l'YFP coté carboxy-terminal génère la protéine PicC. Dans ce cas, une fusion de l'YFP au coté amino-terminal de PicC pourrait être envisagée.

La localisation polaire d'une fumarate hydratase est interpellant. D'autant plus que nous observons un profil de localisation cytoplasmique d'une autre fumarate hydratase FumA, renseignée comme participant au cycle des acides tricarboxyliques chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* (Tseng *et al.*, 2001). Plusieurs hypothèses viendraient apporter un élément de réponse à cette localisation polaire *a priori* étonnante pour FumC. Le recrutement au pôle de FumC pourrait être intrinsèquement lié au phénomène d'infection de *Brucella*. En effet, l'activité de FumC est gardée lors d'une déplétion en fer du milieu ainsi que lors d'un choc oxydatif, contrairement à FumA qui est inhibée dans ces conditions de stress (Tseng *et al.*, 2001); deux situations rencontrées après phagocytose dans les macrophages. Les macrophages luttent contre les pathogènes par un choc oxydatif, notamment. Le relargage de FumC du pôle pourrait permettre à la bactérie de survivre à ces deux chocs. De plus, il est intéressant de noter que PdhS, une histidine kinase, pourrait jouer le rôle de senseur des conditions du milieu direct de *Brucella*, et dès lors conditionner la délocalisation de FumC. En outre, si la cellule a besoin de FumC, cela doit correspondre à une réponse pratiquement instantanée. La cellule n'a pas le temps d'engager une réponse transcriptionnelle en transcrivant les gènes adéquats et en traduisant ces derniers en protéines qui participeront à la réponse au stress. Un pool de FumC préexisterait et remplacerait rapidement FumA dans ces conditions de stress. Il serait donc intéressant de tester la survie des souches de délétants de *Brucella abortus* Δ fumC dans des conditions de carence en fer et de choc oxydatif mais également d'observer la localisation de la fusion FumC-YFP dans ces conditions.

FumC formant des tétramères chez *Escherichia coli*, notamment, la localisation polaire de FumC-YFP dans une souche *Brucella abortus* Δ fumC permet d'affirmer qu'aucun recrutement de FumC-YFP ne s'est effectué par une fumarase C endogène déjà localisée à un pôle. D'autres acteurs positionnent donc FumC-YFP. De même, la localisation polaire de PipP-YFP dans une souche de *Brucella abortus* Δ pipP permet également de penser à d'autres acteurs moléculaires positionnant ces protéines, étant donné qu'aucune d'entre elles ne contient de segment transmembranaire et notamment à PdhS vu que FumC et PipP ne sont pas responsables de la localisation de PdhS.

La localisation de PdhS-YFP dans une souche mutante de *Brucella abortus* Δ fumC renseigne sur le fait que la protéine FumC, qui possède également une localisation polaire, n'est pas responsable de la localisation polaire de PdhS. Même constatation chez le mutant de *Brucella abortus* Δ pipP.

Afin de s'assurer que les foci fluorescents observés représentent bien les fusions protéiques d'intérêts et non des agrégats quelconques de protéines et/ou du bruit de fond, une observation à une longueur d'onde différente de celle du fluorochrome utilisé permettrait de vérifier l'origine de la fluorescence. Si aucun signal fluorescent n'est visible à une autre longueur d'onde, cela signifierait que les foci sont bien dû à la présence du fluorochrome d'intérêt. La technique d'immunocytochimie permettrait de vérifier ces profils de localisation. De plus, une expérience de "time lapse" pourrait mettre en évidence une localisation dynamique des protéines d'intérêts, tout en écartant l'hypothèse d'agrégats fluorescents non spécifiques si une localisation dynamique est montrée.

• Obtention d'allèles mutés du gène *pdhS*

L'importante taille atypique caractérisant le gène *pdhS*, comparé aux histidines kinases classiques, est interpellant. En outre, le côté amino-terminal de cette protéine, composé de plusieurs domaines de fonctions inconnues, interagit avec PicC, PipP et FumC dans le test double hybride en levure. Une approche génétique par mutagenèse aléatoire sera utilisée afin de décortiquer la ou les fonctions du côté amino-terminal de PdhS. Des mutations dans la cds de *pdhS* seront insérées afin de permettre une étude plus précise de ces interactions. Primo, une technique nommée "IDA" (interaction deficient allele) servira à mettre en évidence des résidus aminés essentiels à l'interaction entre PdhS et ses trois interactants potentiels. Secundo, la substitution du résidu histidine accepteur de phosphate par une alanine renseignera quant à l'importance de la phosphorylation de PdhS sur sa localisation, de même que sur le caractère essentiel de cette phosphorylation.

IDA : interaction deficient allele

A ce jour, deux données sont disponibles : les interactions potentielles, mises en évidence par double hybride, du côté amino-terminal de PdhS avec PicC, PipP et FumC ainsi que la taille importante de ce domaine non caractérisé composé d'environ 600 acides-aminés. Le but de cette expérience consiste à dissocier les interactions de ce domaine amino-terminal par une technique de "reverse two hybrid" (Walhout and Vidal, 2001). Pratiquement, ce test permet, à partir d'interactions connues en double hybride, de casser ces interactions par mutagenèse. Une constatation attendue serait que ces domaines d'interaction soient étalonnés le long de ce grand domaine amino-terminal et discriminable les uns des autres. Autrement dit, des pertes d'interactions avec un ou plusieurs acteurs sont recherchées. Une perte d'interaction avec tous ses partenaires signifierait que la protéine soit dépliée et ne fournirait aucune information précise afin de caractériser ce domaine. Afin d'identifier les acides aminés critiques à ces interactions physiques, une banque d'allèles mutés du gène *pdhS* doit être créée. Concrètement, ces insertions de mutations mettent en évidence des pertes d'interactions par des tests double hybride en levure. Nous nous sommes préalablement penchés sur la caractérisation de l'interaction entre PdhS et FumC au vu de l'intérêt primordial que nous accordons à cette interaction en particulier. De plus, une raison empirique vient étayer ce choix : le test double hybride réalisé antérieurement (Delphine Dotreppe et Johann Mignolet, thèses en cours) montra que les souches contenant PdhS et les interactants PipP et PicC ne poussent pas sur un milieu sans uracile, contrairement aux souches qui contiennent PdhS et FumC.

Afin de réaliser cette expérience de "reverse two hybrid", une PCR fut réalisée à l'aide d'amorces spécifiques des régions amont et aval du gène *pdhS*, chacune des deux amorces étaient flanquées d'un site de recombinaison homologue *attB1* et *attB2* compatible avec le système GatewayTM. La GO Taq polymérase est non "proof reading" et fut utilisée lors de cette PCR. Cette ADN-polymérase, relativement peu fidèle, a inséré des mutations dans le gène *pdhS* à raison de 1,5/kB, effectuant un nombre moyen d'erreurs par amplicons compris

entre 1 et 3. Une banque d'environ 60000 clones était nécessaire. En effet, chaque nucléotide pouvait être substitué par les trois autres existant pour les 3105 nucléotides du gène *pdhS*. Le nombre de possibilités de mutations attendues dépassaient 9000. De plus, afin de faire face aux mutations redondantes, une couverture de 6 fois est statistiquement nécessaire. Le nombre de 60000 clones fut atteint et même dépassé car notre banque compte plus de 80000 clones.

Le but de cette expérience était d'identifier des résidus impliqués dans des domaines d'interaction avec la protéine PdhS et ses interactants. Dès lors, une mutation qui insérerait un codon terminateur dans le gène *pdhS* n'aurait fourni aucune information utile car la protéine aurait été tronquée et donc probablement mal repliée. De surcroît, une protéine dépliée aurait perdu également son interaction avec tous ses partenaires. Afin de parer à ces éventualités, la banque des produits PCR de *pdhS* mutés fut clonée dans le plasmide pDONR-Express qui permet, après une réaction BP, de mettre le gène de résistance à la kanamycine en fusion traductionnelle avec le gène *pdhS*. De ce fait, si un codon stop avait été inséré dans la séquence de *pdhS*, le gène de résistance n'aurait pas été traduit. De même, dans les cas où la mutation de certains acides aminés aurait engendré un dépliement majeur de cette protéine chez *Escherichia coli*, le produit de la fusion de PdhS-KanR est rendu dès lors non fonctionnel. Les souches possédant de tels allèles sont sensibles à la kanamycine alors que les souches résistantes à la kanamycine possèdent la protéine PdhS complète et repliée.

Les plasmides pDONR-Express contenant les allèles *pdhS* mutés ont été électroporés dans des souches d'*Escherichia coli* DH10B. Ces souches ont été étalées sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine, de la spectinomycine et de l'IPTG. Toutes ces colonies ont ensuite été raclées et homogénéisées dans un tube contenant du LB liquide (voir matériels et méthodes page 49). Cette étape d'homogénéisation était critique, chaque clone devant impérativement être représenté dans des proportions identiques pour les préparations de plasmides ainsi que les stocks glycérol. Une réaction LR entre les plasmides pDONR-Express-*pdhS* et pVV213 permettait de mettre en fusion traductionnelle les allèles de *pdhS* mutés avec la séquence du domaine de liaison du facteur de transcription Gal4p utilisé en double hybride. Ces produits LR furent électroporés dans des cellules d'*Escherichia coli*. Ces souches d'*Escherichia coli* furent étalées sur des boîtes de Petri contenant de l'ampicilline. De nouveau, plus de 80000 clones ont été obtenus. Une autre réaction LR, réalisée entre le plasmide pDONR201-*fumC* et le pVV212, permettait de placer en fusion traductionnelle la séquence *fumC* avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p. Les plasmides ainsi obtenus ont ensuite été électroporés dans les souches DH10B d'*Escherichia coli*. Ces souches ont ensuite été étalées sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline. L'obtention de ces constructions représente la dernière étape concernant cette manipulation dans le cadre de ce mémoire.

La prochaine étape consistera à transformer les levures avec les plasmides obtenus. D'un côté le plasmide pVV212-*fumC* dans la souche de levure MAV103 et de l'autre les plasmides pVV213 dans la souche de levure MAV203^(Walhout and Vidal, 2001). Les deux types de plasmides seront incorporés dans des souches de levures par mating. Une fois le nombre de clones nécessaire atteint, l'expérience de "reverse two hybrid" sera effectuée. Cette méthode utilise comme gène rapporteur le gène *URA3* codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'uracile. Ce test permet de réaliser une sélection positive pour détecter les clones où le rapporteur *URA3* n'est pas fonctionnel. Autrement dit, il permet de mettre en évidence des pertes d'interaction entre les interactants et PdhS. Concrètement, l'incorporation d'un composé toxique, l'acide 5-fluororotique (5FOA), dans la voie métabolique de l'uracile mène à la mort cellulaire. Si une interaction est gardée entre PdhS et FumC, le gène *URA3* sera transcrit et le 5FOA incorporé, menant à la mort cellulaire. Les souches possédant des allèles mutés se caractérisant par des pertes d'interaction pousseront donc et pourront être sélectionnées. Ensuite, des tests d'interactions avec les autres interactants seront effectués.

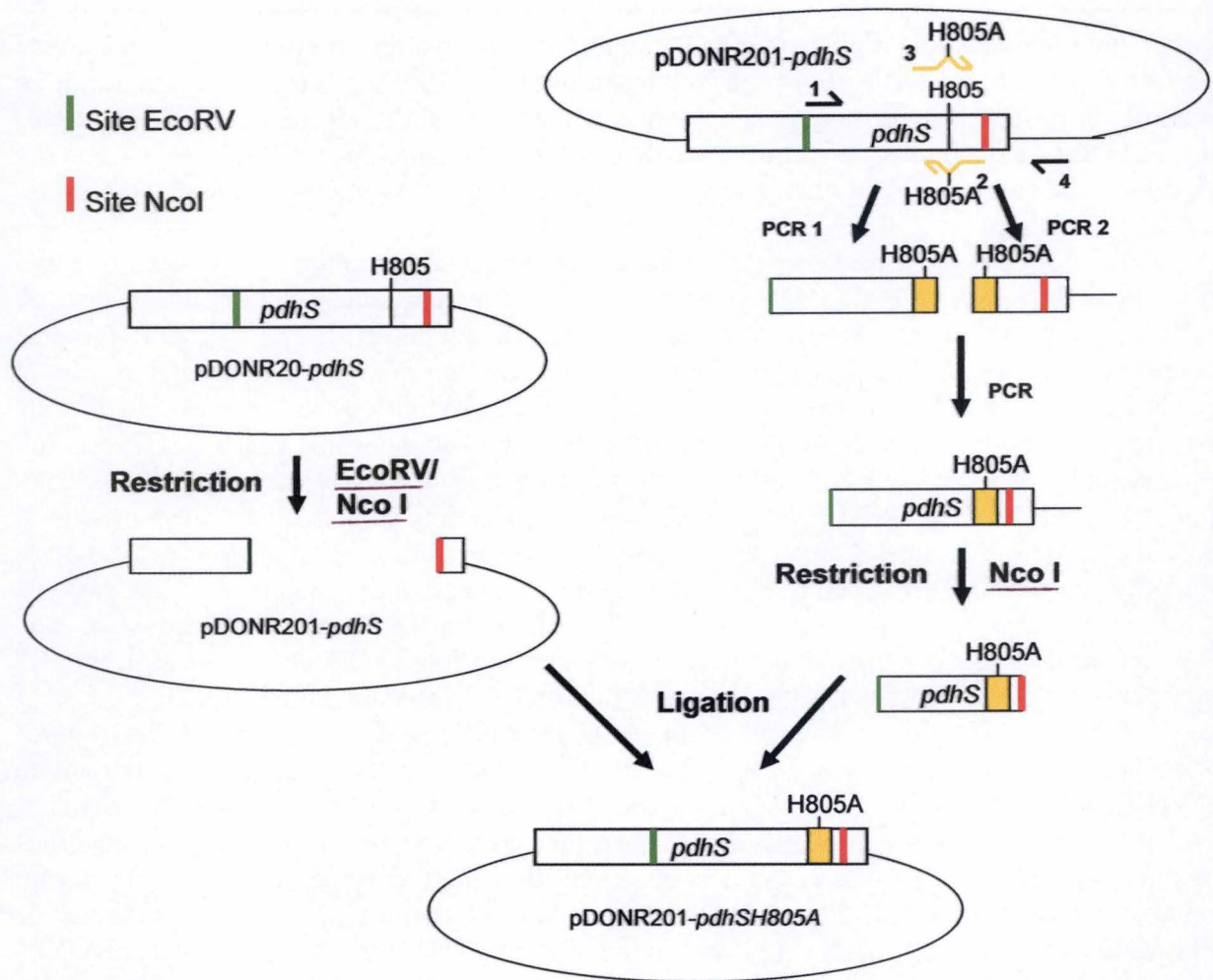


Figure 34 : Stratégie de substitution du résidu histidine conservé de PdhS en alanine. Les flèches en arçon (→) symbolisent les amorces PCR. Les flèches en arçon incurvé (↷) symbolisent les amorces présentant la mutation du codon correspondant, H805A représentant la substitution de l'acide aminé histidine (en position 805 de la protéine PdhS) par une alanine et H805 représentant le résidu histidine en position 805 de la protéine PdhS.

Des allèles mutés de *pdhS* permettant l'interaction avec tous les partenaires sauf FumC seront des "IDA". Les plasmides des différents clones ainsi sélectionnés seront séquencés et les mutations responsables des pertes d'interaction seront identifiées et cartographiées sur la structure de PdhS.

Substitution Histidine en Alanine

La phosphorylation des histidines kinases DivJ et PleC n'est pas essentielle à leur localisation chez *Caulobacter crescentus*. En effet, l'histidine kinase DivJ_{H338A}-YFP, où l'histidine phosphorylable est remplacée par une alanine, garde une localisation polaire au pôle pédonculé. Néanmoins, les phénotypes chez ce mutant sont les mêmes que ceux de mutants nulls $\Delta divJ$ (Lam et al., 2003). De même, la substitution de l'histidine en alanine de PleC ne modifie pas sa localisation. Cependant, cette phosphorylation est nécessaire pour la déphosphorylation de DivK ainsi que son relargage à partir du pôle flagellé (Lam et al., 2003). Autrement dit, la phosphorylation de PleC n'est pas responsable de sa localisation, mais la phosphorylation et la localisation sont toutes deux nécessaires à la fonction de cette histidine kinase. A l'opposé, la phosphorylation de DivK contrôle directement sa localisation (Lam et al., 2003). En effet, une souche portant un allèle *divK*_{D53A}-YFP, où l'aspartate accepteur est remplacé par une alanine, montre une importante délocalisation chez *Brucella abortus* (Hallez et al., 2007b).

La phosphorylation du résidu histidine conservé de PdhS influence-t-elle sa localisation chez *Brucella abortus* ? Pour répondre à cette question, l'histidine phosphorylable est substituée par une alanine.

Afin de réaliser cette substitution d'acide aminé, une mutagenèse dirigée fut réalisée par PCR sur le plasmide pDONR201-*pdhS* (Fig34). Deux couples d'amorces (1-2 et 3-4) furent conçus. Les séquences nucléotidiques caractérisant l'amorce 2 ainsi que l'amorce 3 sont anticcomplémentaires et contiennent les mutations responsables du remplacement de l'histidine en alanine. Le côté 5' de l'amorce 1 contenait la séquence d'un demi site de restriction *EcoRV*. Les deux PCR réalisées ont été suivies d'une troisième PCR afin de relier les deux produits PCR obtenus. Ensuite, deux restrictions furent réalisées. La première par deux enzymes de restriction, *EcoRV* et *NcoI*, excisait une partie du gène *pdhS* sur le plasmide pDONR201-*pdhS*. La deuxième restriction en *NcoI* sur les produits liés par la troisième PCR permettait de réaliser un clonage directionnel. En effet, le demi site *EcoRV* présent à l'extrémité des produits PCR se liait au site clivé *EcoRV* du plasmide pDONR201-*pdhS* restreint avec la même enzyme. La portion du gène *pdhS*_{H805A} qui portait la mutation fut ainsi clonée dans le pDON201-*pdhS*. Enfin, une réaction LR permettait de cloner le gène *pdhS*_{H805A} dans un vecteur de destination intégratif et/ou répliatif (pRH011 et pRH005, respectivement) en fusion traductionnelle avec l'YFP. Ces plasmides furent ensuite électroporés dans des souches d'*Escherichia coli* S17-1 et conjugués chez *Brucella abortus* 544.

Des cultures liquides de trois clones indépendants ont été réalisées et amenées à une DO⁶⁰⁰ de 0,5 pour l'observation au microscope.

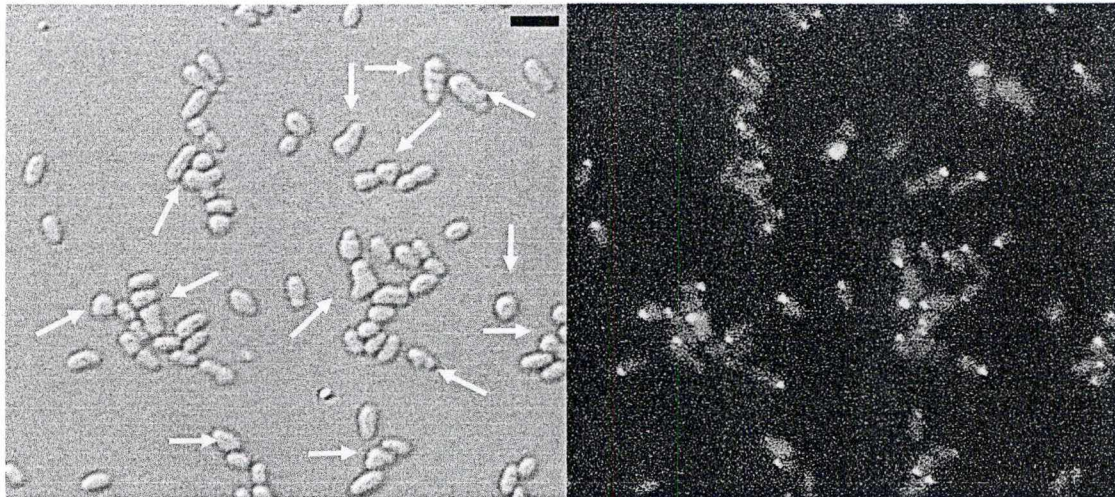


Figure 35 : Observation du phénotype de la souche *Brucella abortus* pMR10cat *pdhS*_{H805A}-*yfp* ainsi que la localisation de la fusion protéique PdhS_{H805A}-YFP. A gauche, micrographie en DIC. A droite, micrographie en épifluorescence. Les flèches blanches indiquent des défauts de division. La barre d'échelle représente 2µm.

L'observation de foci fluorescents suggère une localisation polaire de la fusion protéique PdhS_{H805A}-YFP dans la souche *Brucella abortus* pMR10cat-*pdhS*_{H805A}-*yfp* (**Fig35**). A l'instar des histidines kinases DivJ et de PleC chez *Caulobacter crescentus*, la phosphorylation de PdhS ne constitue pas un signal pour sa localisation. Néanmoins, l'apparition de modifications concernant la morphologie cellulaire est observée par rapport à la souche sauvage *Brucella abortus* 544 (**Fig18**) et également par rapport à la souche *Brucella abortus* pMR10cat-*pdhS*-*yfp* (**Fig19**). En effet les cellules sont déformées et présentent des aberrations morphologiques qui pourraient être dues à un défaut de division. Des bourgeonnements sont également visibles. Ces phénotypes sont rencontrés lors de la surexpression du gène *pdhS* ^(Hallez et al., 2007b).

Discussion

La manipulation de "reverse two hybrid" doit être poursuivie. Les deux plasmides contenant le domaine de liaison du facteur de transcription Gal4 en fusion traductionnelle avec FumC ainsi que PdhS en fusion traductionnelle avec le domaine de transactivation de Gal4 seront transformés en levure. Ces levures seront étalées sur un milieu sélectif sans tryptophane et sans leucine afin de sélectionner les cellules possédant ces deux plasmides d'intérêt. Le gène rapporteur utilisé lors de ce crible est *URA3*, encodant une enzyme de la voie métabolique menant à la production de l'uracile. Les levures seront étalées sur un milieu contenant de l'uracile ainsi que du 5FOA. Une perte d'interaction entre PdhS et FumC ne reconstituera pas le facteur de transcription Gal4, il n'y aura donc pas de transcription du gène *URA3* et le composé 5FOA ne sera pas toxique pour de telles cellules. En revanche, si l'interaction entre PdhS et FumC est conservée, la transcription du gène *URA3* rendra sensibles au 5FOA les cellules possédant ces allèles. Autrement dit, les levures qui pousseront seront celles possédant des protéines PdhS mutées ayant perdu l'interaction avec FumC. Ces allèles seront séquencés afin de mettre en évidence les résidus ou les domaines critiques à cette interaction entre PdhS et FumC.

Une stratégie inverse concernant les pertes d'interactions recherchées par la technique des "IDA" peut être utilisée. En effet, une banque de protéines FumC mutées peut être générée et les interactions testées avec la protéine PdhS non mutée. Des comparaisons de structure ainsi que le positionnement d'acides aminés clés pourraient être effectués avec la structure cristallographique disponible de FumC d'*Escherichia coli* (Weaver et al., 1995).

Afin de confirmer les interactions physiques entre PdhS et ses interactants, une technique de fluorescence *in vivo* nommée FRET (Fluorescence resonance energy transfert) peut être utilisée. Cette technique se base sur la capacité d'une molécule fluorescente excitée à transférer, par agitation moléculaire, de l'énergie à un second fluorochrome. Ce transfert d'énergie est rendu possible uniquement si les distances entre fluorochromes sont compatibles et donc suffisamment proches. La détection de l'émission de fluorescence du second fluorochrome met en évidence l'interaction effective entre les deux protéines d'intérêt.

La phosphorylation de PdhS, à l'instar des histidines kinases DivJ et PleC chez *Caulobacter crescentus*, ne semble pas constituer son signal de localisation polaire (Fig35). Cependant, dans la souche construite *Brucella abortus* pMR10cat *pdhS_{H805A}-yfp*, la copie sauvage du gène *pdhS* est toujours présente dans le génome sous le contrôle de son promoteur endogène. La localisation polaire observée pour PdhS_{H805A}-YFP pourrait être due à la localisation polaire de PdhS endogènes non-mutées, qui recruteraient les protéines PdhS mutées au pôle. En effet, d'après les données de double hybride en levure, PdhS peut former des multimères. Ces multimères de PdhS mutées/non-mutées permettraient à la bactérie de survivre, mettant en évidence un phénotype intermédiaire entre une situation sauvage et une situation dans laquelle toutes les protéines PdhS seraient mutées. Afin de tester cette hypothèse, une stratégie expérimentale possible consisterait à déléter le gène *pdhS* sauvage et amener une copie *pdhS_{H805A}* sur un plasmide répliatif. Notons que ceci ne serait possible que si la mutation H805A n'est pas létale. Il n'y aurait donc plus de copie de la protéine PdhS sauvage. Nous pourrions donc vérifier si PdhS_{H805A} montre une localisation polaire en l'absence de copie sauvage de PdhS. L'obtention d'une telle souche nous renseignerait sur le caractère non essentiel de la phosphorylation de PdhS ainsi que sur la fonction de cette phosphorylation dans la localisation de PdhS. Une alternative supplémentaire serait

d'observer le pattern de localisation de la protéine mutée PdhS_{H805A} chez *Caulobacter crescentus*, qui pour rappel ne possède pas d'homologue de PdhS et chez qui la protéine BaPdhS-CFP montre une localisation polaire ^(Hallez et al., 2007b).

Des aberrations morphologiques, pouvant correspondre à des défauts de division, sont observées chez la souche *Brucella abortus* pMR10cat pdhS_{H805A}-yfp. Le gène sauvage de *pdhS* est toujours présent dans le génome de cette souche. La protéine mutée PdhS_{H805A} semble jouer un rôle de dominant négatif partiel. La phosphorylation de PdhS pourrait donc être impliquée directement ou indirectement dans la division cellulaire. Afin de tester cette hypothèse, différents marquages membranaires et/ou du septum pourraient être utilisés.

Un test révélant l'état de phosphorylation de DivK dans une souche de *Brucella abortus* possédant la version mutée de la protéine PdhS (PdhS_{H805A}) permettrait de savoir si PdhS est responsable en partie ou en totalité de la phosphorylation de DivK.

De surcroît, il serait intéressant de voir l'effet de la présence de la version constitutivement active du régulateur de réponse DivK_{D51E} sur le caractère essentiel de PdhS.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

La division asymétrique dont fait preuve l' α -protéobactérie modèle *Caulobacter crescentus* souligne l'aspect adaptatif représenté par son cycle cellulaire complexe. La notion d'asymétrie sous-tend un phénomène de différenciation chez cette bactérie non pathogène. Deux questions restent posées concernant *Brucella abortus*. (1) Un évènement de différenciation, comparable à la phase de transition de la cellule flagellée en cellule pédonculée chez *Caulobacter crescentus*, existe-t-il chez *Brucella abortus* ? (2) La génération d'asymétrie à chaque division sous-tend-elle un phénomène d'asymétrie fonctionnelle ? Autrement dit, cette asymétrie morphologique implique-t-elle une asymétrie fonctionnelle ? Par exemple, dans le cas de *Brucella abortus*, les deux types cellulaires générés jouent-ils des rôles équivalents dans l'interaction avec l'hôte ?

Dans ce contexte, l'histidine kinase PdhS amène un élément de réponse en regard de son profil de localisation. La petite cellule acquiert PdhS, qui se localisera au vieux pôle, la croissance cellulaire se poursuivant, la petite cellule devient une grande cellule qui peut réengager un cycle de division cellulaire. Cet évènement pourrait mettre en évidence un évènement de différenciation de la phase petite cellule en grande cellule ou du moins un phénomène de maturation des pôles.

Un interactant potentiel de PdhS, une fumarase C, catalyse la conversion du fumarate en malate. Cette réaction du cycle de Krebs est également catalysée par la fumarase A. Cependant, une localisation unipolaire de FumC est mise en évidence, au contraire d'une localisation diffuse pour FumA. Quel serait l'avantage sélectif pour la bactérie de posséder plusieurs fumarases qui catalysent la même réaction et dont l'une d'elle possède, contrairement à l'autre, une localisation polaire ? Nous proposons que l'enzyme de maintenance cytoplasmique soit FumA. Cependant, cette fumarase possède un centre fer-soufre sensible aux chocs oxydatifs et/ou à une déplétion en fer du milieu et FumA pourrait être inactivée lorsque la bactérie rencontre ces conditions, par exemple dans des macrophages activés. L'activité de FumC ne requiert pas la présence de fer et est insensible au choc oxydatif, contrairement à FumA. FumC pourrait donc prendre le relais de FumA dans ces circonstances. Deux hypothèses parmi d'autres peuvent être envisagées, d'une part FumC serait réquisitionnée au pôle cellulaire car il est préférable qu'elle exerce son activité à cet endroit dans la bactérie. D'autre part, PdhS contribuerait à la séquestration de FumC au pôle en prévision de son relargage lors d'un stress.

Dans une première hypothèse, l'activité de FumC est réquisitionnée au pôle parce que nécessaire dans une situation où FumA ne pourrait pas réaliser la conversion du fumarate en malate à cet endroit. Dans des circonstances hypothétiques, il y aurait une concentration plus importante de radicaux superoxydes à ce pôle. L'activité de FumA y serait donc inhibée alors que l'activité de FumC est possible dans ces conditions. Une autre hypothèse, non-exclusive par rapport à la précédente, serait que FumC soit réquisitionnée au pôle car son activité est nécessaire à cet endroit précis. En effet, le produit de l'activité de FumC serait impliquée dans le métabolisme, la formation de composés et d'autres fonctions à caractère polaire^{(Montrone et al., 1998, (Prasad et al., 1998, (Gibson et al., 2006)}

Dans une seconde hypothèse, FumC est séquestrée à un pôle car son activité est requise dans le cytoplasme uniquement lors de conditions particulières. Il est proposé que FumC remplace FumA dans des conditions de carence en fer et/ou de stress oxydatif. *Brucella abortus* est une bactérie pathogène intracellulaire. Durant son processus d'infection, cette bactérie doit faire face au système immunitaire de l'hôte. Lorsque *Brucella abortus* est phagocytée par une cellule professionnelle comme le macrophage, cette bactérie subit, notamment, un choc oxydatif utilisé par le macrophage pour attaquer les pathogènes ainsi qu'une déplétion du milieu en fer. Or ces deux chocs inactivent la fumarase A. FumC est donc proposée pour se substituer à FumA afin de remplir leur fonction commune dans ces conditions de stress. Un pool préexistant de FumC serait donc à disposition à un pôle cellulaire de *Brucella abortus*. Afin de vérifier si FumC est séquestrée au pôle, sa localisation durant le processus d'infection de *Brucella abortus* nous informerait de la pertinence de ce modèle. Il serait attendu qu'après phagocytose par un macrophage activé, une fusion protéique FumC-YFP soit délocalisée chez *Brucella abortus* ; les fumarases C se substituant aux fumarases A inactivées. Cette observation pourrait nous éclairer sur la fonction senseur de PdhS ainsi que sur l'interaction potentielle entre PdhS et FumC chez *Brucella abortus*. Les signaux reconnus par PdhS pourraient être la carence en fer et/ou un choc oxydatif. Cette histidine kinase serait responsable d'une délocalisation de FumC, permettant à la bactérie de survivre aux deux situations de stress dans le macrophage en délocalisant rapidement le pool de FumC dans le cytoplasme. Enfin, notons que le domaine amino-terminal de PdhS porte un domaine PAS et deux domaines "PAS-like", qui sont connus pour permettre de sentir des changements de niveau rédox dans la cellule. Ces domaines pourraient être requis dans la signalisation évoquée ci-dessus.

La caractérisation du phénomène d'infection par le délétant *Brucella abortus* Δ fumC permettrait de tester en partie ces hypothèses. Concrètement, l'impossibilité de FumA à être remplacée par FumC ne permettrait pas à la bactérie de survivre dans le macrophage activé. Autrement dit, une atténuation de virulence de cette bactérie est donc attendue dans ce modèle d'infection. Un phénotype nouveau pourrait donc être attribué au mutant *Brucella abortus* Δ fumC dans ces conditions d'observation précises. La même expérience pourrait être réalisée avec la souche délétante *Brucella abortus* Δ pipP afin de mettre en évidence des phénotypes lors du processus d'infection de cette bactérie.

Il serait également intéressant de tester la virulence de la souche *Brucella abortus* pMR10cat-pdhS_{H805A}-yfp. Si PdhS joue le rôle de senseur kinase de déplétion en fer du milieu et/ou de stress oxydatif, conditionnant ainsi la délocalisation de FumC, une atténuation de la virulence serait attendue en macrophages activés. En effet, dans un macrophage activé, malgré que la protéine PdhS_{H805A} garde sa fonction de senseur et soit toujours capable de percevoir des conditions de stress, aucune réponse cellulaire adaptée ne pourrait s'initier étant donné l'impossibilité d'autophosphorylation de PdhS_{H805A}.

Le caractère essentiel du gène *pdhS* représente un obstacle quant à l'obtention d'une souche mutante délétée pour ce gène. Différents moyens sont envisageables afin de caractériser un gène essentiel. La surexpression du gène *pdhS* fut déjà réalisée (Hallez et al., 2007b). Les phénotypes résultant montraient des "monstres" caractérisés par des défauts de division cellulaire. Une manière alternative d'étudier ce gène essentiel serait de le placer sous le contrôle d'un promoteur inductible. Cependant, aucun promoteur régulable caractérisé (et donc utilisable comme tel) n'est disponible à ce jour. L'obtention d'un allèle conditionnel de *pdhS* constitue donc une voie alternative. Concrètement, la présence de mutations dans le

gène rendrait cette histidine kinase PdhS instable à température restrictive et pourrait entraîner l'apparition de phénotypes et/ou des changements dans les profils de localisations de ses interactants à température restrictive.

Le phénomène d'asymétrie chez *Caulobacter crescentus*, *Brucella abortus*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* semble être conservé chez ces bactéries par une pression de sélection. Un cycle de vie complexe montrant une adaptation à l'environnement dilué en nutriments est proposé chez *Caulobacter crescentus*. L'asymétrie commune caractérisant *Brucella abortus*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* serait donc potentiellement impliquée dans l'établissement de relations étroites avec les cellules hôtes. Concernant *Brucella abortus*, un nouvel élément de réponse nous est fourni. Une caractérisation accrue de l'histidine kinase PdhS est réalisée grâce à l'identification et la localisation d'un nouvel acteur, FumC. Des modèles ont été avancés en rapport avec la localisation polaire de FumC ainsi que l'intérêt d'une telle localisation, par exemple lors du cycle infectieux. La caractérisation plus poussée de PdhS et FumC, ainsi que l'identification d'autres fonctions polaires devraient permettre, dans le futur, de mieux comprendre la pression de sélection ayant poussé cette bactérie pathogène à garder un mode de division asymétrique tant du point de vue morphologique que fonctionnel.

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*) 80*lacZ*ΔM15 D*lacX74* *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 septinomucine et au triméthoprim.

Génotype : *recA* *thi* *pro* *hsdR*⁻ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogénisé avec le phage λpir.

***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 (Nal^R) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur.

Plasmides

pDONR201

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 *Escherichia coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplication (pUC ori) fonctionnelle chez *Escherichia 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.

pDONR-Express

Ce plasmide, est également conçu pour le clonage avec le système GatewayTM. 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 *Escherichia coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Il permet, après réaction BP, de cloner en fusion traductionnelle les CDS d'intérêt avec la séquence du gène de résistance à la kanamycine. Une sélection sur un milieu contenant de la kanamycine permet d'obtenir des CDS sans codon stop. De plus, la protéine résultant de cette CDS d'intérêt, si les clones possédant ce plasmide poussent sur kanamycine, n'aura probablement pas subi un dépliement majeur. La construction insérée se retrouve sous l'influence du *Plac*. Ce plasmide possède également le gène de résistance à la spectinomycine et une origine de réplication (pUC ori) fonctionnelle chez *Escherichia coli*.

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 GatewayTM. 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 réplication ; l'une fonctionnelle chez *Escherichia coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2 μ). La séquence codant le domaine de liaison à l'ADN (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 (Padh1).

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

Ce vecteur est dérivé du pACTII (Fromont *et al.*, 1997) dans lequel a été inséré une cassette de clonage GatewayTM. 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 réplication ; l'une fonctionnelle chez *Escherichia coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2 μ). La séquence codant le domaine de transactivation (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 (Padh1).

pMR10cat-GW-yfp (pRH005) (Hallez *et al.*, 2007a)

Ce plasmide est dérivé du pMR10-*cat* (Robertson *et al.*, 2000), 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 *Escherichia 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).

pKSoriT-GW-yfp -Kan^R (pRH011) (Hallez *et al.*, 2007a)

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript KS (Stratagène) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène *bla* (résistance à l'ampicilline) et une origine de répliation ColE1 (origine non fonctionnelle chez *Brucella* ; ce plasmide est dit suicide ou intégratif chez cette bactérie). 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. Il permet la fusion traductionnelle entre la protéine d'intérêt et la yellow fluorescent protein (YFP) sous le contrôle du Plac. Ce plasmide possède également une origine de transfert (oriT).

pJQ200-uc1

Ce plasmide est dérivé du plasmide pJQ200 (Quandt and Hynes, 1993). Un site multiple de clonage issu du pJQ254 est inséré en plus par rapport au pJQ200. Il contient le gène de résistance à la gentamycine et une origine de répliation pour *Escherichia coli*, une origine de transfert mais ne possède pas d'origine de répliation chez *Brucella abortus*. Le marqueur de contre sélection SacBR comprend un régulateur (SacR) induisant la transcription du gène encodant une enzyme appelée SacB. Cette enzyme nommée lévansucrase est responsable de l'ajout de monomères de fructose provenant du sucrose sur un polymère de fructose. Cette polymérisation induit la formation d'une substance gélifiée menant à la mort cellulaire

• Milieux de culture

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
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

Milieux riches pour *Brucella abortus* : milieu 2YT

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

Le milieu 2YT + sucrose 5% (5 gr de saccharose pour 100 ml de milieu) est utilisé pour sélectionner la désintégration du plasmide pJQ200-uc1 du génome de *Brucella abortus*.

Milieux SOC et SOB

SOB : pour un litre d'eau désionisée :

2% tryptone	2,5 mM chlorure de potassium	10 mM chlorure de magnésium
0,5% extrait de levure	10 mM chlorure de sodium	10 mM sulfate de magnésium

SOC : pour un litre d'eau désionisée

Sé référer à la préparation du milieu SOB et rajouter 20mM de glucose.

- **Tampons et solutions**

- **Fabrication du gel d'agarose**

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

- **Tampon PBS 20X**

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

- **Antibiotiques et autres**

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H ₂ O	50 mg/ml
Spectinomycine	Spect	H ₂ O	100mg/ml
Gentamycine	Genta	H ₂ O	50 mg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	H ₂ O	24 mg/ml

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

- **VALAP**

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

- **Tampons pour les mini-préparations de plasmides**

Préparation des tampons P1, P2 et P3

P1

- RNase A 100 µg/ml.
- TrisHCl 50 mM.
- EDTA 80 mM

Mettre à pH 8 et garder à 4°C.

P2

- NaOH 100 mM.
- SDS 1%.

P3

- KAc 3,0 M

Mettre à pH 5,5 et garder à 4°C.

- **Techniques relatives à l'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 (encore appelées primers) 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, l'Expand High Fidelity de Roche ou la Pfx Platinum de La 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 » (Expand High Fidelity) est utilisée dans les cas de clonage. Une autre enzyme, la Pfx Platinum est également utilisée pour des clonages ; elle n'ajoute pas de nucléotide A aux extrémités. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété de 25 à 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

Mix

Réactifs	Quantité
Tampon 5X _{Taq} , 10X _{HF} , 10X _{Pfx} correspondant à l'enzyme	10 µl ou 5 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	1,2 µl (si diagnostic) 4 µl (si constructions)
Amorce 1 (20 µM)	0,5 µl
Amorce 2 (20 µM)	0,5 µl
Taq polymérase ,High Fidelity ou Pfx Platinum	0,2 µl
Matrice d'ADN	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl (ou 30 µl pour une PCR diagnostique)

Lors d'une PCR dont les amorces sont bordées de site de recombinaison GWTM (*attB1* ou *attB2*), la concentration des primers utilisés est de 100 µM.

Programme

Dénaturation de 5 minutes à 94°C.

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

1. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles GatewayTM) à 94°C pour dénaturer.
2. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles GatewayTM) 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 ou à 68°C pour la Pfx Platinum.

En bonne approximation, la température d'hybridation (Tm) des amorces de moins de 20 pb égale le quadruple de la somme des bases G et C additionné du double de la somme des bases A et T. En bref, la $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$. Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence bordante en 5'.

Remarquons que l'ADN génomique 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 94°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 Biotools. 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

1. 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%).
2. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium pour 80 µl de gel d'agarose (6µl pour 120 µl).
3. Une fois que la température du flacon atteint ~60°C, couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
4. 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).

Restriction de plasmide

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique : elles reconnaissent des sites de restrictions, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 6 paires de bases. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des « bouts protrudants ». Dans le cas où cette coupure n'est pas décalée, la restriction génère des bouts francs.

- 1 µl Buffer 10X en fonction de l'enzyme (A, B, L, M ou H).
- Le volume (µl) d'enzyme de Restriction à ajouter est déterminé grâce à la formule : $Q(\text{unité}) = 48,5 * q * np / n\lambda * t$, où q est la quantité en µg du plasmide, np le nombre de sites dans le plasmide, t la taille du plasmide en kb et nλ le nombre de sites dans le phage λ. En général, les enzymes de restrictions sont conditionnées pour avoir 10U/µl. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ.
- X µl de plasmide à restreindre
- Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau distillée.

Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C. Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche.

Ligation

Mix pour un volume final 10µL	Protocole
<ul style="list-style-type: none"> - 1 µL de T4 DNA ligase - 2 µL de T4 DNA Buffer 5X - volume d'insert et de matrice à déterminer à partir du rapport des masses obtenu par la formule suivante : $\text{ng insert/ng matrice} = (\text{kb insert/kb matrice}) \cdot (\text{moles insert/moles matrices})$ rapport des moles : 1/1 pour clonage directionnel, 5/1 pour clonage non directionnel 	<ul style="list-style-type: none"> - Préparer le mélange et mettre à volume avec de l'eau désionisée. - Incuber o/n à 16°C.

Purification sur gel

Pour les purifications d'ADN à partir d'un gel, nous avons utilisé le kit QIAquick™ Gel Extraction Kit de Qiagen. Le protocole est prévu pour extraire et purifier de l'ADN de 70 bp à 10 Kb à partir d'un gel d'agarose standard.

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel et peser le morceau d'agar.
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN; passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant et ajouter au culot 500 µl de solution de lavage du kit
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant et conserver l'ADN à -20°C.

Purification sur colonne

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

Minipréparation de plasmide

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides présents chez les bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

En kit

L'ADN plasmidique est extrait à partir d'une culture bactérienne de 5 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s), en suivant les instructions du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel).

Méthode classique

- Inoculer une colonie isolée dans 5 ml de LB contenant l'antibiotique de sélection. Laisser pousser sur la nuit.
- Le lendemain, centrifuger à 12500 rpm 1 minute.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µl de tampon P1 (à 4°C) et resuspendre.

- Ajouter 300 µl de tampon P2 et retourner.
- Laisser 5' à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de tampon P3 et retourner.
- Laisser 10' sur glace.
- Centrifuger à 12500 rpm 15' à 4°C.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol (~ 630 µl) et retourner.
- Centrifuger à 12500 rpm 15' à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µl d'éthanol 70% (-20°C).
- Centrifuger à 12500 rpm 5' à 4°C.
- Eliminer délicatement le surnageant.
- Sècher.
- Ajouter 20 µl d'eau désionisée.

Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube de 100 µl :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles d'amorce.
- 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl₂.
- Le mélange de réaction est porté à un volume de 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles

1. Dénaturation de 1 minute à 96°C.
2. 25 cycles de :
 - a. 10 secondes à 96°C.
 - b. 10 secondes à 50°C.
 - c. 4 minutes à 60°C.

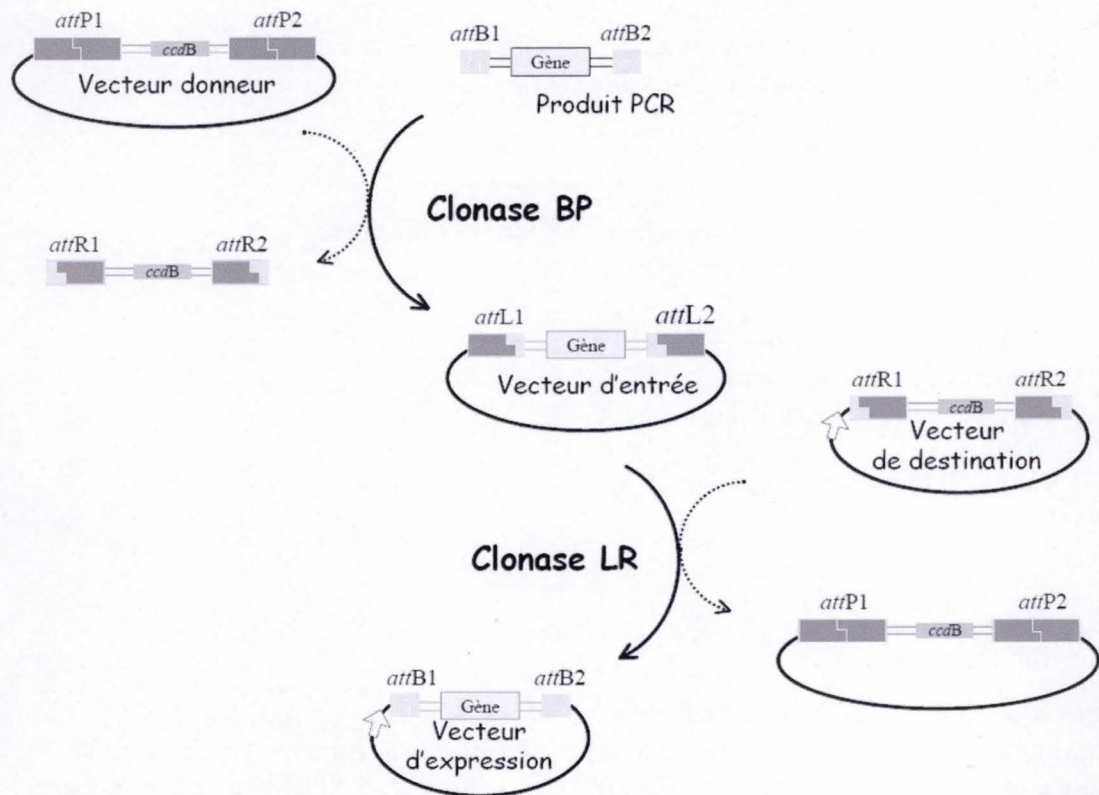


Figure 36 : Principe du système Gateway™ reposant sur une réaction BP suivie d'une réaction LR.

Clonage Gateway™ (Fig36)

Le système Gateway™ est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*Escherichia coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage λ 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 λ 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 pDONR201 restreint NcoI	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
2 µl d'enzyme clonase BP	0,8 µl d'enzyme clonase LR
2 µl d'H ₂ O distillée	1,2 µl d'H ₂ O distillée
Incubation à 25°C de 2 à 24h, puis la réaction est stoppée en incubant le mélange 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K	Incubation à 25°C de 2 à 24h.

• Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

Préparation de cellules Escherichia coli électro-compétentes (DH10B/S17-1)

Jour 1

1. Réveiller la souche à rendre compétente sur LB Agar à 37°C toute la nuit.

Jour 2

2. En fin de journée, lancer une préculture dans 5 ml de LB liquide en grattant si possible une seule colonie.

Jour 3

3. Au matin, verser la totalité de la préculture dans 1,2 L de LB liquide en erlen à contre-pals de type 5 L. Agiter à 37°C.
4. Surveiller la croissance de la culture en prenant la DO⁶⁰⁰ régulièrement. Quand la D.O. atteint plus ou moins 0,5, stopper la croissance sur glace pendant 10 minutes.
Remarque : à partir de cette étape, il faut rester en permanence à froid.
5. Répartir la culture dans 6 biberons stériles.
6. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C et retirer le surnageant.
7. Resuspendre dans de l'eau bidistillée stérile et froide (4°C) en répartissant 1,2 l de cette eau pour les 6 biberons.
8. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C et retirer le surnageant.
9. Resuspendre dans 300 ml d'eau bidistillée stérile et froide (4°C) et ensuite la répartir dans 6 falcons (50 ml chacun).
10. Resuspendre dans de l'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C) et porter à 20 ml dans 2 falcons.

11. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
12. Resuspendre chaque culot dans 2,5 ml d'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C).
13. Aliquoter en eppendorfs stériles posés sur glace.
14. Stocker à -80°C.

Remarque : tous les récipients utilisés sont placés à -20°C o/n.

Transformation bactérienne par électroporation

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

Les cellules électrocompétentes *E.coli* DH10B ou S17-1, gardées à -80°C, sont décongelées lentement sur la glace. Stérilement, de 50 à 100 µl de cellules électrocompétentes et 1 à 5 µl de plasmides sont mis dans un eppendorf. Le contenu de l'eppendorf est mélangé et mis immédiatement sur la glace. Ce même contenu est déposé dans une cuvette (^{BIORAD}) de 2 mm spécialement conçu pour l'électroporation. Une pulsion est donnée d'après les paramètres déterminés par l'appareil pour l'utilisation de cellules bactériennes *E.coli* et d'une cuvette de 2 mm : voltage de 2 kV, capacitance de 25 µF, résistance de 2 Ω. La valeur de "time constant" doit se situer idéalement entre 3 et 5. La pulsion terminée, 700 µl de milieu SOC doit être immédiatement ajouté aux cellules et le tout doit être transféré dans un eppendorf. Dans le cas des plasmides pDONR-Express, les cellules sont suspendues dans 500 µl de SOB auxquels sont ajoutés 5 µl d'IPTG. Les eppendorfs sont incubés à 37°C pour 1 heure maximum sous agitation. On étale ensuite 100 µl du contenu de l'eppendorf sur milieu LB solide contenant un antibiotique. Le reste est centrifugé (5' à 5000 rpm), resuspendu dans 100 µl de milieu SOC et étalées sur les milieux sélectifs.

Après chaque électroporation, les cuvettes sont lavées à l'eau, plongées dans de l'alcool o/n, séchées et passées sous UV pendant 3 minutes.

Contrôle négatif

À un même volume de cellules électrocompétentes utilisées est ajouté un volume d'eau équivalent au volume de plasmide ajouté. La démarche suivie pour l'électroporation 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

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. La souche donneuse (dans notre cas S17-1) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

1. Lancer en culture, la veille, les souches de *Brucella abortus* et d'*Escherichia coli* S17-1.
2. Mettre 1 ml de phase stationnaire de bactéries à transformer (ici *Brucella abortus*) dans un tube eppendorf.
3. A ce tube eppendorf, ajouter 50 µl de cellules *Escherichia coli* S17-1 contenant le plasmide d'intérêt.
4. Centrifuger les tubes eppendorf pendant 1 minute à 7000 rpm.
5. Enlever le surnageant.
6. Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu 2YT.
7. Centrifuger pendant 1 minute à 7000 rpm.
8. Enlever le surnageant en y laissant une petite quantité de liquide sur le culot (environ 50 µl).
9. Resuspendre le culot avec le liquide restant et spoter la préparation sur des petites boîtes de milieu 2YT.
10. Incuber pendant 4 heures à 37°C (plasmides réplicatifs) ou à température ambiante toute la nuit (plasmides intégratifs).
11. 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 boites. 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.
12. Incuber pendant 3 à 4 jours à 37°C.

Contrôle négatif

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

Protocole

1. Sur une lame de verre, mettre une goutte d'eau.
2. Toucher une colonie avec un cure-dents stérile et la déposer sur l'eau.
3. Sécher à la flamme.
4. Fixer les bactéries en ajoutant de l'alcool (Vel, Leuven, Belgium) et passer à la flamme.
5. Ajouter le bleu de gentiane (Merck, Darmstadt, Germany) sur la lame et attendre 1 minute.
6. Ajouter le lugol (Merck, Darmstadt, Germany) pour précipiter le bleu de gentiane et attendre 1 minute.
7. Rincer à l'alcool.
8. Rincer à l'eau.
9. Ajouter la safranine (Merck, Darmstadt, Germany) et attendre 1 minute.
10. Sécher la lame en tapotant avec un papier absorbant.

• Techniques relatives à l'utilisation de levures

Principe du double-hybride en levure

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 Gal4 (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.

• 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 microonde afin de dissoudre l'agarose.
3. Déposer 700 μ 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 μ 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

Molécules fluorescentes

Nom	λ excitation en nm	λ émission en nm	Révélation
CFP	440 (violet)	480 (cyan)	Protéine, chimérique ou non
YFP	480 (bleu)	535 (jaune)	Protéine, chimérique ou non

Bibliographie

- Ackermann, M., Stearns, S. C. & Jenal, U. (2003). Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* **300**, 1920.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-40.
- Ausmees, N. & Jacobs-Wagner, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-47.
- Barnett, M. J., Hung, D. Y., Reisenauer, A., Shapiro, L. & Long, S. R. (2001). A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**, 3204-10.
- Batut, J., Andersson, S. G. & O'Callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 933-45.
- Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2002). Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**, 945-60.
- Biondi, E. G., Reisinger, S. J., Skerker, J. M., Arif, M., Perchuk, B. S., Ryan, K. R. & Laub, M. T. (2006a). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* **444**, 899-904.
- Biondi, E. G., Skerker, J. M., Arif, M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S. & Laub, M. T. (2006b). A phosphorelay system controls stalk biogenesis during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **59**, 386-401.
- Bodenmiller, D., Toh, E. & Brun, Y. V. (2004). Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **186**, 1438-47.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64.
- Broughton, E. S. & Jahans, K. L. (1997). The differentiation of *Brucella* species by substrate specific tetrazolium reduction. *Vet Microbiol* **57**, 253-71.
- Cabeen, M. T. & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **3**, 601-10.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**, 93-8.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56.
- Chen, J. C., Hottes, A. K., McAdams, H. H., McGrath, P. T., Viollier, P. H. & Shapiro, L. (2006). Cytokinesis signals truncation of the PodJ polarity factor by a cell cycle-regulated protease. *Embo J* **25**, 377-86.
- Crymes, W. B., Jr., Zhang, D. & Ely, B. (1999). Regulation of podJ expression during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *J Bacteriol* **181**, 3967-73.
- Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A. & Southwick, F. S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6068-72.
- Dobrindt, U. & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 550-7.
- Domian, I. J., Quon, K. C. & 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**, 415-24.

- Domian, I. J., Reisenauer, A. & Shapiro, L. (1999). Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6648-53.
- Dricot, A., Rual, J. F., Lamesch, P., Bertin, N., Dupuy, D., Hao, T., Lambert, C., Hallez, R., Delroisse, J. M., Vandenhaute, J., Lopez-Goni, I., Moriyon, I., Garcia-Lobo, J. M., Sangari, F. J., Macmillan, A. P., Cutler, S. J., Whatmore, A. M., Bozak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Vidal, M., Hill, D. E., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**, 2201-6.
- Ebersbach, G. & Jacobs-Wagner, C. (2007). Exploration into the spatial and temporal mechanisms of bacterial polarity. *Trends Microbiol* **15**, 101-8.
- Errington, J. (1996). Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Trends Genet* **12**, 31-4.
- Errington, J., Daniel, R. A. & Scheffers, D. J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 52-65, table of contents.
- Evinger, M. & Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* **132**, 294-301.
- Figge, R. M., Divakaruni, A. V. & Gober, J. W. (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **51**, 1321-32.
- Gibson, K. E., Barnett, M. J., Toman, C. J., Long, S. R. & Walker, G. C. (2007). The Symbiosis Regulator CbrA Modulates a Complex Regulatory Network Affecting the Flagellar Apparatus and Cell Envelope Proteins. *J Bacteriol*.
- Gibson, K. E., Campbell, G. R., Lloret, J. & Walker, G. C. (2006). CbrA is a stationary-phase regulator of cell surface physiology and legume symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 4508-21.
- Gober, J. W. & Marques, M. V. (1995). Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* **59**, 31-47.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. & Jenal, U. (2001). Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4681-6.
- Hallez, R., Bellefontaine, A. F., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**, 361-5.
- Hallez, R., Letesson, J. J., Vandenhaute, J. & De Bolle, X. (2007a). Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in *Brucella abortus*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1375-9.
- Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhaute, J., Letesson, J. J., Jacobs-Wagner, C. & De Bolle, X. (2007b). The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**, 1444-55.
- Hassett, D. J., Howell, M. L., Sokol, P. A., Vasil, M. L. & Dean, G. E. (1997). Fumarase C activity is elevated in response to iron deprivation and in mucoid, alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of *fumC* and purification of native *fumC*. *J Bacteriol* **179**, 1442-51.
- Hecht, G. B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J. M. & Newton, A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **14**, 3915-24.
- Hinz, A. J., Larson, D. E., Smith, C. S. & Brun, Y. V. (2003). The *Caulobacter crescentus* polar organelle development protein PodJ is differentially localized and is required for polar targeting of the PleC development regulator. *Mol Microbiol* **47**, 929-41.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165-70.

- Holtzendorff, J., Hung, D., Brende, P., Reisenauer, A., Viollier, P. H., McAdams, H. H. & Shapiro, L. (2004). Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* **304**, 983-7.
- Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S. K. & Viollier, P. H. (2006). Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* **124**, 1025-37.
- Hung, D. Y. & Shapiro, L. (2002). A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13160-5.
- Iniesta, A. A., McGrath, P. T., Reisenauer, A., McAdams, H. H. & Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10935-40.
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-20.
- Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. (2001). Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4095-100.
- Jahans, K. L., Foster, G. & Broughton, E. S. (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* **57**, 373-82.
- Jazwinski, S. M. (1999). Molecular mechanisms of yeast longevity. *Trends Microbiol* **7**, 247-52.
- Jenal, U. & Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J* **17**, 5658-69.
- Lam, H., Matroule, J. Y. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**, 149-59.
- Lam, H., Schofield, W. B. & Jacobs-Wagner, C. (2006). A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell* **124**, 1011-23.
- Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2000). Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 859-64.
- Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2002). A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J Bacteriol* **184**, 913-8.
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4632-7.
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M. & Shapiro, L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**, 2144-8.
- Lawler, M. L. & Brun, Y. V. (2006). A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry. *Cell* **124**, 891-3.
- Lozada-Chavez, I., Janga, S. C. & Collado-Vides, J. (2006). Bacterial regulatory networks are extremely flexible in evolution. *Nucleic Acids Res* **34**, 3434-45.
- Lu, G., Jiang, L., Helikar, R. M., Rowley, T. W., Zhang, L., Chen, X. & Moriyama, E. N. (2006). GenomeBlast: a web tool for small genome comparison. *BMC Bioinformatics* **7 Suppl 4**, S18.
- Marczynski, G. T. & Shapiro, L. (1992). Cell-cycle control of a cloned chromosomal origin of replication from *Caulobacter crescentus*. *J Mol Biol* **226**, 959-77.
- Matroule, J. Y., Lam, H., Burnette, D. T. & 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**, 579-90.

- McGrath, P. T., Iniesta, A. A., Ryan, K. R., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2006). A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell* **124**, 535-47.
- Montrone, M., Eisenbach, M., Oesterhelt, D. & Marwan, W. (1998). Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate. *J Bacteriol* **180**, 3375-80.
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., Potocka, I., Nelson, W. C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N. D., Ely, B., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M. L., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Smit, J., Craven, M. B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S. L., Venter, J. C., Shapiro, L. & Fraser, C. M. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4136-41.
- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E. G., Sommer, J. M. & Newton, A. (1992). A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10297-301.
- Osiewacz, H. D. (2002). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res Rev* **1**, 425-42.
- Ouimet, M. C. & Marczyński, G. T. (2000). Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J Mol Biol* **302**, 761-75.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-24.
- Poindexter, J. S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* **45**, 123-79.
- Prasad, K., Caplan, S. R. & Eisenbach, M. (1998). Fumarate modulates bacterial flagellar rotation by lowering the free energy difference between the clockwise and counterclockwise states of the motor. *J Mol Biol* **280**, 821-8.
- Pugsley, A. P. & Buddelmeijer, N. (2004). Traffic spotting: poles apart. *Mol Microbiol* **53**, 1559-62.
- Quandt, J. & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21.
- Quon, K. C., Marczyński, G. T. & Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83-93.
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L. & Marczyński, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 120-5.
- Robertson, G. T., Reisenauer, A., Wright, R., Jensen, R. B., Jensen, A., Shapiro, L. & Roop, R. M., 2nd. (2000). The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J Bacteriol* **182**, 3482-9.
- Samartino, L. E. & Enright, F. M. (1993). Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **16**, 95-101.

- Sciochetti, S. A., Lane, T., Ohta, N. & Newton, A. (2002). Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **184**, 6037-49.
- Shapiro, L., McAdams, H. H. & Losick, R. (2002). Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**, 1942-6.
- Sheffery, M. & Newton, A. (1981). Regulation of periodic protein synthesis in the cell cycle: control of initiation and termination of flagellar gene expression. *Cell* **24**, 49-57.
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37.
- Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G. & Laub, M. T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**, e334.
- Smith, C. S., Hinz, A., Bodenmiller, D., Larson, D. E. & Brun, Y. V. (2003). Identification of genes required for synthesis of the adhesive holdfast in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **185**, 1432-42.
- Sommer, J. M. & Newton, A. (1988). Sequential regulation of developmental events during polar morphogenesis in *Caulobacter crescentus*: assembly of pili on swarmer cells requires cell separation. *J Bacteriol* **170**, 409-15.
- Steinhauer, J., Agha, R., Pham, T., Varga, A. W. & Goldberg, M. B. (1999). The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol* **32**, 367-77.
- Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G. & Taddei, F. (2005). Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* **3**, e45.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A. & Stock, J. B. (1996). Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **271**, 939-45.
- Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Jeannot, J. L., Dusart, G., Foulongne, V. & Simeon de Buochberg, M. (2003). [Species identification and molecular epidemiology of bacteria belonging to *Ochrobactrum* genus]. *Pathol Biol (Paris)* **51**, 5-12.
- Teyssier, C., Marchandin, H. & Jumas-Bilak, E. (2004). [The genome of alpha-proteobacteria: complexity, reduction, diversity and fluidity.]. *Can J Microbiol* **50**, 383-96.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Masnou, A., Jeannot, J. L., de Buochberg, M. S. & Jumas-Bilak, E. (2005). Pulsed-field gel electrophoresis to study the diversity of whole-genome organization in the genus *Ochrobactrum*. *Electrophoresis* **26**, 2898-907.
- Tseng, C. P., Yu, C. C., Lin, H. H., Chang, C. Y. & Kuo, J. T. (2001). Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J Bacteriol* **183**, 461-7.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhoute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**, 739-46.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002a). A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. *Embo J* **21**, 4420-8.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002b). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13831-6.

- Vohradsky, J., Janda, I., Grunenfelder, B., Berndt, P., Roder, D., Langen, H., Weiser, J. & Jenal, U. (2003). Proteome of *Caulobacter crescentus* cell cycle publicly accessible on SWICZ server. *Proteomics* **3**, 1874-82.
- Walhout, A. J. & Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**, 297-306.
- Wang, S. P., Sharma, P. L., Schoenlein, P. V. & Ely, B. (1993). A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 630-4.
- Weaver, T. M., Levitt, D. G., Donnelly, M. I., Stevens, P. P. & Banaszak, L. J. (1995). The multisubunit active site of fumarase C from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **2**, 654-62.
- Wheeler, R. T. & Shapiro, L. (1999). Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 683-94.
- Woods, S. A., Schwartzbach, S. D. & Guest, J. R. (1988). Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **954**, 14-26.
- Wu, J., Ohta, N. & Newton, A. (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1443-8.