

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Dissection de l'activité de l'histidine kinase PleC au cours du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

FINET , Olivier

Award date:
2014

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**Dissection de l'activité de l'histidine kinase PleC
au cours du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus***

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

Olivier FINET

Janvier 2014

Université de Namur
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@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Dissection de l'activité de l'histidine kinase PleC au cours du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

FINET Olivier

Résumé

L' α -protéobactérie *Caulobacter crescentus* est caractéristique des biomes aquatiques d'eau douce. Cette bactérie modèle est particulièrement bien adaptée à un environnement oligotrophe grâce à un processus de morphogenèse qui lui permet, par division asymétrique, de former deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement différentes ; une petite cellule flagellée mobile et une grande cellule sédentaire pédonculée. La cellule flagellée est caractérisée par un programme développemental de différenciation très finement régulé qui lui est propre, appelé « SwaPS » pour « Swarmer Progeny-Specific ». L'histidine kinase PleC prend largement part à cette régulation qui régit le cycle cellulaire de *Caulobacter*. PleC exhibe à la fois une activité kinase et phosphatase, chacune d'elles impliquée à leur manière dans l'asymétrie de *C. crescentus*. Ces activités catalytiques sont connues pour contrôler les régulateurs de réponse DivK et PleD, respectivement impliqués dans la supervision de la phase G₁ et dans la sédentarité bactérienne. Les mutants K-P- et K-P+ de PleC ont permis d'élucider une partie de la régulation du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Cependant, la proportion relative des deux activités de PleC au cours du cycle cellulaire n'a pas encore été investiguée. Dès lors, la découverte d'un mutant K+P- de PleC pourrait permettre de décoder ces changements d'activité. La création de ce mutant par mutagenèse aléatoire était le but de ce mémoire mais n'a pas abouti, conséquence de la difficulté d'isoler des mutants de PleC par une méthode sans *a priori*. Nous avons néanmoins caractérisé cinq nouvelles mutations qui pourraient permettre la création d'un mutant K+P- de PleC, et donc de comprendre avec précision le rôle de cette histidine kinase prenant place au cœur de la morphogenèse de l'espèce modèle *Caulobacter crescentus*.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

Promoteur: Prof. J.-Y. Matroule

« Nothing in biology makes sense except in the light of evolution »

T. Dobzhansky

« Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont »

Aristote

« No mountain too high, no river to deep »

À David

Remerciements

Haaaa le mémoire! Quelle étape dans la vie d'un étudiant! D'autant plus quand celui-ci s'articule autour de dix mois intenses de recherches, de vie en laboratoire! Il fut aussi exigeant qu'enrichissant, aussi frustrant que fort en apprentissage. Je me rappelle de mes premiers jours en URBM; cette fourmillière où j'étais complètement perdu entre toutes ces pièces, tous ces visages. Aujourd'hui, grâce au soutien d'innombrables personnes, cette fourmillière m'est un peu plus familière, tout comme le monde de la recherche scientifique. Ce sont toutes ces personnes que je voudrais ici remercier.

Mes premiers remerciements vont naturellement à M. Jean-Yves Matroule, promoteur de ce mémoire. Déjà en Bac3, il avait su attirer mon attention sur cette bactérie toute particulière qu'est *Caulobacter crescentus*. Ensuite, il m'a accueilli dans son laboratoire et m'a suivi, épaulé et aidé à construire une démarche tant intellectuelle que personnelle. Je voudrais aussi remercier grandement Lio, mon tuteur, qui a supporté mes maladresses, mes erreurs et mon attirail de questions quotidiennes. Il m'a soutenu dans ma prise d'indépendance et, il faut dire, a souvent animé notre paillasse de ses chansons paillardes !

Un grand merci également au reste de l'équipe BEAR* (Eme, Clem, Françoise et Aless pour un moment). *Bacterial and environmental adaptation regulation, donc rien à voir avec les nounours si jamais!

Je suis particulièrement reconnaissant envers Jérôme (alias M. l'Assistant Coppine) et Eme (alias Le Puits de Science de Beauté ou simplement Kelly) qui m'ont fourni un soutien incomensurable dans les pires moments de ce mémoire. Leurs conseils, leur aide et leur disponibilité ont été un socle sur lequel je me suis maintes fois appuyé! J'ai été ravi de manipuler à leur paillasse (avec Lio et Clem), souvent animée de moqueries, potins et franches rigolades! Merci pour ces belles journées/soirées et je vous dis "épicondyliiiiiite"!

Qu'aurait été cette expérience sans l'incroyable Mémos Team de l'URBM? Quel plaisir ce fut de partager ce bureau (gardé par notre Papy adoré Christian, que je salue au passage), si souvent le théâtre de nos angoisses mais surtout de nos fous rires et de notre entraide mutuelle! Merci à Cha à qui j'ai inculqué mon état d'esprit sain, pour nos discussions sur les hélicoptères pilotés par Lee, pour sa reconnaissance de ma drogue pour le papier-collant, pour ces jeux de passe-passe d'une extrémité à l'autre du bureau. Merci à Luca (et à sa maléole) pour ses vidéos toutes plus folles les unes que les autres, pour son partage de sa connaissance informatique et pour notre excitation commune face à notre stage. Merci à Jess, ma chère collègue, pour ce coin de bureau que nous avons partagé quelques mois, pour m'avoir fait connaître Soup Shop et Thanbichler. Merci à Katy(strophe) pour ta patience face à ma schizophrénie, pour ces craquages de dernières minutes, pour ces discussions très enrichissantes sur PleC et Brucella, pour ce "Aïcha" de soirée de rédaction. Merci à Val, mon amie de craquage, co toudis en ribote, pour sa joie de vivre incroyable, pour ces touché-coulé et pour son accueil dans son chaleureux appartement. Merci à Clément, d'avoir toujours cru en notre équipe de foot (hum hum), pour ses "c'est le weekeeeend" et "allez, feu", pour ses remarques piquantes qui m'ont si souvent fait rire. Merci à Alexandre de m'avoir "lol-customisé", pour ses photos des années 60 (?) et pour sa bonne intégration malgré son origine biomédicale!

L'URBM, c'est une ambiance de travail, certes, mais aussi une ambiance décontractée où chacun a toujours été prêt à m'aider! Merci à eux; Matt pour nos applaudissements mutuels, Miche-Miche pour ta folie (Wilson, Vicomte de la Brosse, Roger, et j'en passe), Franco pour ton humour si piquant, Séverin pour ta bonne humeur, ta disponibilité et pour nos (longues)

discussions "caulobactériennes", Arnaud (oui, ça pue le stress) et JF pour vos incursions dans le bureau mémo, Delphine pour avoir partagé tes angoisses de jeune jouteuse, Francesco pour ton dynamisme si italien (oui HEIN), Thibaut pour ta fausse méchanceté et surtout ta vraie gentillesse, Kevin pour ta bonne humeur et tes pétages de plomb, Nayla la Jouvence Exotique de ce labo pour ces cours d'arabe, Mike (pardon, Dr. Deghelt) pour ton humour si... euh... Mikéen (?), Simon pour ton attitude toujours si joviale et tes encouragements (au fait, mon nom de famille c'est Finet), etc. Je n'oublie pas mes amis de GEMO, organisateurs en or de la Beer Hour qui, du moins je l'espère, auront apprécié mes nombreuses visites en cette fin de mémoire; Clément et sa peluche *C. elegans* (Get 27, j'ai retenu), Mamy Val et ses méchancetés envers ma pauvre petite personne, Paul et son accueil toujours sincère en GEMO. Merci à tous!

Puis, il y a tous ces gens qui n'ont jamais rien compris de ce que je faisais, de pourquoi je le faisais mais qui n'en étaient pas moins intéressés. Je pense bien entendu à mes amis fidèles de l'IND, à mes cokotteurs du Kot68, de la Dodane, de l'ImproNam, du Kotéculture et de la Cellule. Merci également à mes nouvelles amitiés de mon Erasmus à Göteborg, à ces enrichissantes amitiés du Cercle Bio, à tous les kâpistes que j'ai pu cotoyer et à mes amis de l'AkâP. Votre soutien, mes amis, fut le plus cher à mes yeux !

Merci également à tous les Masters 2 BBMC/BOE pour ces incroyables années en votre compagnie! Bon vent pour votre stage, profitez-en bien et on se revoit tous très vite, diplôme (presque) en main!

Mais qu'est-on sans une famille ? Un grand merci à mes parents qui se sont toujours porté garants de ma réussite et de mon bien-être, qui m'ont poussé à faire ce que je voulais faire, souvent en se sacrifiant pour nous. Je leur en suis éternellement reconnaissant. Merci également à ma grand-mère pour tous ces dimanches après-midi où tu tentais de comprendre ce que je faisais dans ce laboratoire. Merci à mes sœurs et à mon beau-frère pour avoir toujours eu une oreille attentive.

Merci également à M. Bihin pour ses conseils en statistique.

Merci à Katy pour cette belle Figure 13, issue de longues et passionnantes discussions sur *Caulo vs Brubru* !

Enfin, merci aux membres de mon jury – Mme Van Doninck et MM. Piret, Hallez et De Bolle – qui prennent de leur précieux temps pour lire ce manuscrit qui, je l'espère de tout cœur, correspondra à leurs attentes.

Bonne lecture à tous !

Abréviations

Abréviation	Nom complet	Commentaire et/ou traduction
ADN	Acide désoxyribonucléique	Macromolécule supportant l'information génétique
Ala (A)	Alanine	Acide aminé
Arg (R)	Arginine	Acide aminé
Asn (N)	Asparagine	Acide aminé
Asp (D)	Acide aspartique	Acide aminé
ATP	Adénosine triphosphate	Biomolécule énergétique
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i> Poindexter, 1964	Nomenclature binomiale complète
CA	Catalytic and ATP binding domain	Domaine catalytique d'une HK
c-di-GMP	Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate	Di-guanosine monophosphate cyclique ; un messenger secondaire
CDS	Coding DNA sequence	Séquence codante d'un gène
CtrA~P	Phosphorylated cell cycle transcriptional regulator	Forme active, phosphorylée et dimérique de CtrA
DBD	DNA-binding domain	Domaine de liaison à l'ADN d'un RR
DGC	Diguanylate cyclase	Enzyme synthétisant du c-di-GMP
DHp	Dimerization and histidine phosphotransfer domain	Domaine d'une HK
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates	Acides nucléiques de l'ADN ; d(A/T/G/C)TPs
EMS	Ethylméthanesulfonate	Agent chimique mutagène
F778L	Mutant K-P+ de PleC	Le résidu 778 (phénylalanine) de la protéine est remplacé par un résidu leucine
G (Gly)	Glycine	Acide aminé
Gln (Q)	Glutamine	Acide aminé
Glu (E)	Acide glutamique	Acide aminé
H610A	Mutant K-P- de PleC	Le résidu 610 (l'histidine conservée de PleC) est remplacé par un résidu alanine
HK	Hybrid histidine kinase	HK possédant un domaine RD
His (H)	Histidine	Acide aminé
HK	Histidine kinase	Protéine senseur du TCS
HPT	Histidine phosphotransférase	Protéine intermédiaire d'un TCS complexe
Ile (I)	Isoleucine	Acide aminé
K(+ ou -)P(+ ou -)	Activités kinase et phosphatase d'une histidine kinase	Le symbole à la droite de la lettre caractérise l'activité enzymatique : (+) active, (-) inactive
Leu (L)	Leucine	Acide aminé
Lys (K)	Lysine	Acide aminé
Mb	Mégabase	Un million de paires de bases nucléotidiques
MCS	Multi-Component signal	Système signalétique à plusieurs

	transduction System	composantes
MCS	Multiple cloning site	Site multiple de clonage d'un vecteur
P1 _w	Weak P1 promoter	Promoteur faible de <i>ctrA</i>
P2 _s	Strong P2 promoter	Promoteur fort de <i>ctrA</i>
PCR	Polymerase chain reaction	Amplification en chaîne d'une séquence nucléotidique par polymérase
PDE	Phosphodiesterase	Enzyme dégradant le c-di-GMP
Phe (F)	Phénylalanine	Acide aminé
PleC _K	Activité kinase de PleC	/
PleC _P	Activité phosphatase de PleC	/
Pro (P)	Proline	Acide aminé
RD	Receiver domain	Domaine receveur d'un RR ou d'une HHK
rpm	Rotation par minute	/
RR	Régulateur de réponse	Protéine effectrice du TCS
RR*	Single domain response regulator	RR à domaine unique
Ser (S)	Sérinte	Acide aminé
SwaPS	Swarmer progeny-specific	Programme de développement spécifique de la cellule flagellée de <i>C. crescentus</i>
TCS	Two-component signal transduction system	Système signalétique à deux composantes
Thr (T)	Thréonine	Acide aminé
UVs	Rayons ultraviolets	Rayonnement électromagnétique mutagénique
Val (V)	Valine	Acide aminé
WT	Wild-type	Forme sauvage d'un gène ou d'une protéine
Φ	Bactériophage	/

Tables des matières

INTRODUCTION

I.	<i>Caulobacter crescentus</i> : une espèce modèle ?	13
II.	La division asymétrique : entre étonnement et ingéniosité	14
1.	Qu'est-ce que la division asymétrique ?	14
2.	Comment expliquer une division asymétrique ?	14
3.	Le programme de développement	15
III.	Acteurs moléculaires de la division asymétrique	15
1.	Le système à deux composants ou TCS	15
a.	<i>Le TCS dans le monde Vivant</i>	15
b.	<i>Fonctionnement d'un TCS ; aperçu général</i>	16
c.	<i>Complexification d'un TCS ; le MCS</i>	17
2.	CtrA ou comment un régulateur de réponse détermine le <i>cell fate</i>	17
a.	<i>Régulation transcriptionnelle de CtrA</i>	17
b.	<i>Phosphorylation de CtrA</i>	18
c.	<i>Protéolyse de CtrA</i>	19
3.	Le système PleC/DivK/DivJ.....	19
a.	<i>Division phenotype K ou DivK</i>	19
b.	<i>Pleiotropic phenotype C ou PleC</i>	19
i.	<u>Généralités</u>	19
ii.	<u>PodJ</u>	19
iii.	<u>PleC_K et PleC_P</u>	20
c.	<i>Division phenotype J ou DivJ</i>	20
d.	<i>En résumé</i>	20
4.	PleD et la sédentarité	21
5.	Quand tous ces acteurs se rencontrent.....	21
a.	<i>Division phenotype L ou DivL</i>	21
b.	<i>Il était une fois la morphogenèse de C. crescentus</i>	22
IV.	Objectifs de ce mémoire	24
1.	Champ de recherche	24
2.	Et le mutant K+P- ?	24

RÉSULTATS & DISCUSSION

I.	Constructions des souches contrôles exprimant les différents mutants <i>pleC</i> sur un plasmide à faible nombre de copies.....	36
1.	Généralités	36
2.	Construction <i>stricto sensu</i>	36
II.	Caractérisation des différentes souches contrôles (pMR20)	36
1.	Les souches n'initiant pas le SwaPS sont résistantes au phage CbK	37
2.	Les mutants PleC possèdent une mobilité différente par rapport à la souche « sauvage » CB15-pMR.....	38
3.	Les mutants K-P- et K-P+ ont une capacité d'attachement différente par rapport à la souche « sauvage » CB15-pMR.....	40
III.	Constructions des souches contrôles exprimant les différents mutants <i>pleC</i> sur un plasmide à nombre de copies moyen.....	42
IV.	Caractérisation des différentes souches contrôles (pJS14).....	42
1.	La souche Δ -pJS(K-P-) est sensible aux phages CbK	42
2.	La souche Δ -pJS(K-P-) apparaît plus mobile qu'attendu	43
3.	Le mutant Δ -pJS(K+P+) a une capacité d'attachement supérieure à ce qui a déjà été observé mais confirme le rôle supposé de PleC _K dans l'adhérence de <i>Caulobacter crescentus</i>	45
V.	Mutagenèse aléatoire de PleC et isolement du mutant K+P- par un crible génétique en deux étapes	46
1.	Des mutants résistants aux Φ CbK et capables d'attacher ont été isolés.....	46
2.	La discrimination d'un mutant K+P- par test de mobilité est une nouvelle piste dans le crible génétique	49
VI.	Une analyse <i>in silico</i> dévoile de nouvelles pistes intéressantes	49
1.	L'alignement de séquences protéiques comparant PleC à CheX, CheZ et CrdS n'a pas été concluant	49
2.	La comparaison bioinformatique avec l'histidine kinase EnvZ : une piste à exploiter.....	51

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1.	Des stratégies parallèles à l'approche présentée dans ce mémoire constituent des perspectives intéressantes	54
2.	Un mutant K+P- est-il réellement envisageable ?	55
3.	PleC _P et PleC _K jouent un rôle différent dans la morphogenèse de <i>Caulobacter crescentus</i>	55

4. Le débat n'est pas fini ; modèles du <i>pole-to-pole shuttling</i> et de la régulation allostérique.....	56
5. Conclusion générale	57

MATÉRIELS & MÉTHODES

Matériels	59
1. Souches utilisées.....	59
2. Plasmides utilisés.....	60
3. Milieux de culture bactériens	61
a. <i>Escherichia coli</i>	61
b. <i>Caulobacter crescentus</i>	61
c. <i>Stérilisation des milieux</i>	61
4. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les PCR.....	61
a. <i>Clonage de l'insert du pSK au pMR20</i>	62
b. <i>Clonage de l'insert du pMR20 au pJS14</i>	62
c. <i>Amorces utilisées pour les remplacements alléliques</i>	62
Méthodes	63
1. Techniques relatives aux acides nucléiques	63
a. <i>Electrophorèse en gel d'agarose</i>	63
b. <i>Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose</i>	63
c. <i>Purification d'ADN sur colonne</i>	63
d. <i>Restriction enzymatique</i>	63
e. <i>Ligation d'un insert dans un plasmide</i>	64
f. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	64
g. <i>PCR mutagène</i>	65
h. <i>Minipréparation d'ADN</i>	65
2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.....	66
a. <i>Transformation bactérienne</i>	66
b. <i>Courbe de croissance</i>	66
c. <i>Mutagenèse aléatoire</i>	66
3. Techniques relatives à la caractérisation de souches de <i>Caulobacter crescentus</i>	66
a. <i>Test de résistance aux bactériophages CbK</i>	66
b. <i>Test de mobilité</i>	67

<i>c. Test de mobilité tridimensionnel</i>	67
<i>d. Test d'attachement</i>	67
4. Techniques relatives à l'analyse bioinformatique	68
BIBLIOGRAPHIE	68

INTRODUCTION

Le monde du Vivant, dans toute sa richesse et sa complexité, fascine l'Homme depuis des siècles. Il a cependant fallu attendre le XVII^{ème} siècle pour qu'un savant néerlandais, A. van Leeuwenhoek, observe les premières bactéries. Mystérieuses en vertu de leur taille minuscule (quelques micromètres maximum), ces microorganismes ont longtemps souffert d'une image de « vulgaire sac à enzymes » n'étant, à vrai dire, pas dignes d'intérêt sinon pour les pathologies que certaines d'entre-elles provoquent.

Grâce à l'avènement des technologies de pointe élaborées durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, ces stéréotypes ont pu être nuancés et l'importance réelle de l'univers bactérien a dès lors été investiguée. Il s'est avéré que le monde procaryotique (incluant Eubactéries et Archées) se retrouve dans toutes les niches écologiques possibles et imaginables (de l'intestin d'un ours polaire aux sous-sols les plus pollués, en passant par les cheminées hydrothermales abyssales). Ce tropisme écologique est la preuve de leur diversité et de leur incroyable pouvoir d'adaptation, constituant un guide et un exemple d'évolution biologique.

Ce mémoire se base justement sur un microorganisme modèle d'adaptation: la bactérie *Caulobacter crescentus* (**Fig. 1**). Cette introduction tentera de présenter comment une cascade de signalisation complexe est capable d'engendrer une différenciation cellulaire dans le cadre d'un programme de développement.

I. *Caulobacter crescentus* : une espèce modèle ?

Dans la mythologie grecque, Protée est une divinité marine capable de se métamorphoser en n'importe quelle forme physique. Ayant marqué l'*Odyssee* d'Homère, ce nom est resté associé au polymorphisme. Ainsi, c'est ce *Viellard des Mers* qui est à l'origine du nom des *Protéobactéries* caractérisées par des formes très diverses (Stackebrandt et al., 1988). La classe des α -protéobactéries, dont font partie *Caulobacter crescentus*, les Rhizobiales (*Brucella* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, etc.) ou les Rickettsiales, est d'autant plus proche de ce nom. En effet, leur division asymétrique (voir point II) est source d'un polymorphisme, qu'il soit moléculaire ou purement phénotypique (Hallez et al., 2004; Lam et al., 2003).

En 1964, J.S. Poindexter résume dans *Bacteriological Reviews* l'état des connaissances sur les Caulobactérales, qui se limite en réalité à quelques observations microscopiques faites au début du siècle (Poindexter, 1964). Poindexter est la première microbiologiste à se rendre compte du potentiel de *Caulobacter crescentus* en tant que bactérie modèle. Elle dira d'ailleurs, en parlant de ces bactéries, que « la structure étrange et le dimorphisme fournissent un système précieux dans lequel les processus développementaux de cellules microbiennes peuvent être étudiés »¹ (Poindexter, 1964).

Caulobacter crescentus est une bactérie Gram négative oligotrophe, ubiquiste des milieux aquatiques. Il s'agit d'un organisme modèle puisqu'il est manipulable

¹ « [...] of these bacteria, whose peculiar structure and dimorphism provide a valuable system in which the developmental processes of microbial cells may be studied [...] » dans Poindexter, J.S. (1964). *Biological Properties and Classification of the Caulobacter Group*. *Bacteriological reviews* 28, page 233.

génétiqnement, croît rapidement dans des conditions de laboratoire aisément mises en œuvre, n'est pas pathogène pour l'Homme et son génome est séquencé depuis 2001 (Nierman et al., 2001). Ces éléments font donc de *C. crescentus* une bactérie de choix pour étudier et comprendre certains éléments de la physiologie des Gram négatives.

II. La division asymétrique : entre étonnement et ingéniosité

1. Qu'est-ce que la division asymétrique ?

Caulobacter crescentus est un organisme unicellulaire. Cette caractéristique pourrait faire croire qu'il s'agit d'un organisme peu adapté à des changements environnementaux, subissant le temps et les pressions externes sans réel pouvoir d'adaptation. Or, son dimorphisme pourrait être la clé de voûte de son ubiquité. En effet, chaque division cellulaire donne lieu à deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement distinctes; une cellule flagellée motile et une cellule pédonculée sédentaire, résultat d'un programme développemental élaboré (Curtis and Brun, 2010) (**Fig. 2**). Cette particularité morphologique permet aux scientifiques de synchroniser *Caulobacter crescentus* via une centrifugation en gradient de silicates. Cela signifie que les différents types cellulaires de cette α -protéobactérie peuvent être isolés et donc étudiés séparément (Goley et al., 2007).

Concrètement, la cellule pédonculée est véritablement collée à son substrat grâce au « holdfast » ; un exopolysaccharide principalement constitué de N-acétylglucosamine et synthétisé au pôle pédonculé (Bodenmiller et al., 2004; Merker and Smit, 1988). Lorsque la réplication de l'ADN est initiée dans la cellule pédonculée, celle-ci croît en cellule prédivisionnelle, synthétise un flagelle au pôle opposé et se prépare à la division asymétrique. La cellule flagellée est également caractérisée par des pili ; exopolymères de piline qui sont connus dans le monde bactérien pour leur rôle dans la formation de biofilms, la motilité non-flagellaire ou même l'attachement de bactéries pathogènes à leur tissu cible (Nagano, 2013; Skerker and Shapiro, 2000). Une fois la cytokinèse terminée, la cellule fille pédonculée reste attachée à son substrat et se prépare à un nouveau cycle de division (développement cyclique) tandis que la cellule flagellée, incompétente pour la réplication de son chromosome (Degnen and Newton, 1972; Laub et al., 2002; Quon et al., 1998), se meut jusqu'à une niche écologique la plus favorable possible pour s'y installer et s'y différencier en cellule pédonculée (voir II.3) par perte du flagelle, rétraction des pili et synthèse d'un holdfast et d'un pédoncule (développement non-cyclique) (Kirkpatrick and Viollier, 2012; Levi and Jenal, 2006).

2. Comment expliquer une division asymétrique ?

Dans un contexte environnemental rude, il est logique de se demander pourquoi un dimorphisme a-t-il été sélectionné au cours de l'évolution. *Caulobacter crescentus*, espèce pionnière des milieux aquatiques, évolue principalement dans des biotopes pauvres en nutriments (Curtis and Brun, 2010; Lawler and Brun, 2007). La cellule flagellée pourrait

donc permettre de perpétuer l'espèce en trouvant de nouvelles niches écologiques moins oligotrophes. Quant à la cellule sédentaire, son pédoncule serait un des éléments qui lui permettrait de faire face à la carence du milieu en nutriments. Ainsi, il a été observé que ce pédoncule s'allonge en conditions de carence en nutriments (et d'autant plus dans le cas d'une carence en phosphate) (Poindexter, 1964; Wagner and Brun, 2007). Cette élongation, par une augmentation du rapport surface/volume de la cellule, pourrait, par exemple, favoriser l'assimilation des nutriments. (Klein et al., 2013).

3. Le programme de développement

Dès la fin de la cytokinèse, la cellule flagellée subit un programme de développement qui lui est propre. Celui-ci est appelé SwaPS par l'équipe de C. Jacobs-Wagner en 2004 pour *Swarm Progeny-Specific* (Matroule et al., 2004). Le SwaPS consiste en une série de quatre étapes de transformations morphologiques majeures qui caractérisent ce type cellulaire jusqu'à sa différenciation en cellule pédonculée. Ces quatre étapes sont (i) la rotation du flagelle, (ii) la synthèse des pili et leur rétraction, (iii) la perte du flagelle et (iv) la formation du pédoncule. Afin d'être en accord avec la réalité biologique de cette transformation, il convient d'ajouter une étape; la synthèse du holdfast qui intervient avant la formation du pédoncule.

III. Acteurs moléculaires de la division asymétrique

Dans un premier temps, le mécanisme d'action de la voie signalétique qui régit la morphogénèse de *Caulobacter crescentus* sera détaillé au point 1. Ensuite, chaque acteur moléculaire sera présenté individuellement (points 2 à 4). Enfin, toutes ces entités moléculaires seront corrélées les unes aux autres afin d'être intégrées dans la voie signalétique qui détermine le programme développemental de cette α -protéobactérie (point 5).

1. Le système à deux composants ou TCS

a. Le TCS dans le monde Vivant

Le système à deux composants (TCS pour *Two-Component signal transduction System*) n'est pas exclusif au domaine des Eubactéries, bien qu'y étant le plus largement représenté et diversifié. La fonction principale de ce système signalétique, capable d'apporter une réponse appropriée, est d'agir comme un senseur pour une cellule. Le TCS peut répondre tout aussi bien à une modification extracellulaire qu'à un stimulus interne (Podgornaia and Laub, 2013).

Chez les Eucaryotes, le TCS est connu chez un nombre limité d'espèces telles que les levures, les champignons ou les plantes (Stock et al., 2000). La levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Candida albicans* utilisent un tel système pour réguler leur

osmolarité, respectivement par les systèmes SKN7 et CASLN1 (Kruppa and Calderone, 2006; Maeda et al., 1994; Nagahashi et al., 1998). La Brassicacée *Arabidopsis thaliana* module sa réponse au stress salin par un TCS (système EIN2 entre autres) (Lei et al., 2011). Chez les Animaux, aucun système à deux composants n'a encore été décrit bien que des formes d'histidine kinases (enzymes d'un TCS) semblent exister chez l'Homme (revu dans Attwood, 2013). Quoiqu'il en soit, le système immunitaire des mammifères est capable d'interférer avec le TCS de certaines bactéries telle que *Bacillus subtilis*. Dans cet exemple, les PGRPs (*Peptidoglycan Recognition Proteins*) mammaliennes activent fortement le système CsrR/CsrS, créant une réponse de stress exacerbée pour la bactérie qui meurt des conséquences de ce choc (dépolérisation des membres, production de radicaux libres, etc.) (Dziarski et al., 2012).

Concernant les Archées, les TCS sont beaucoup moins étudiés mais n'en restent pas moins importants. Ainsi, pour ne donner qu'un exemple, le régulateur de réponse CheY – élément du TCS connu pour son implication dans la chémotaxie – est à la fois présent chez les Eubactéries et les Archées et prouve donc l'existence de systèmes à deux composants dans ce domaine du vivant (Szurmant and Ordal, 2004).

Chez les Eubactéries, la diversité des TCS est telle qu'il ne sera possible d'en donner qu'un aperçu ici. L'abondance de ce système chez les bactéries et son absence chez l'Homme en font une cible de choix pour lutter contre un pathogène sans effets secondaires pour le patient (Stock et al., 2000). Cette particularité explique, en partie, pourquoi les TCS bactériens sont si largement étudiés. De plus, les gènes et opérons impliqués dans les TCS sont parmi les plus abondants d'un génome bactérien (**Fig. 3**) et constituent donc un pilier de la physiologie bactérienne (Galperin, 2005; Galperin et al., 2010). *Caulobacter crescentus* ne fait pas exception à la règle puisque sur ses 3767 protéines prédites, les régulateurs de réponse – éléments d'un TCS – constituent la famille protéique la plus représentée avec 71 protéines (Nierman et al., 2001).

b. Fonctionnement d'un TCS ; aperçu général

L'activité de base d'un TCS résulte d'un signal déclencheur, qu'il soit intra- ou extracellulaire. Le senseur capable de percevoir ce signal est une histidine kinase (HK) possédant au minimum (i) un ou plusieurs domaines transmembranaires – 13 maximum, (ii) un domaine de dimérisation et de phosphotransfert (DHp), et (iii) un domaine à activité catalytique capable de lier de l'ATP (CA). Il existe des HKs plus complexes, possédant des domaines à activités catalytiques diverses (phosphodiesterase, adénylase cyclase, phosphatase, etc.) (Galperin et al., 2001). Lorsque le signal est perçu par l'histidine kinase (**Fig. 4**), celle-ci est activée par autophosphorylation (dans la plupart des cas) de son résidu histidine ultra-conservé présent dans le domaine DHp. Cette phosphorylation est l'œuvre du domaine CA, captant le phosphate- γ d'une molécule d'ATP.

Le transfert de phosphate d'un élément à un autre du TCS est la condition *sine qua non* pour apporter une réponse au signal de départ. Le groupement phosphate lié à l'histidine de l'HK est transféré au deuxième composant du TCS ; le régulateur de réponse (RR) et son domaine receveur (RD) arborant un résidu aspartate conservé. Le RR possède souvent (mais pas obligatoirement) un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et constitue donc la protéine

effectrice du TCS, agissant comme un facteur stimulateur ou inhibiteur de l'expression génique ou d'une activité enzymatique (Aldridge et al., 2003; Gao et al., 2007).

c. Complexification d'un TCS ; le MCS

Une HK hybride (HHK) possède, en plus des domaines classiques, un domaine receveur caractéristique des RRs. Dans ce cas, le groupement phosphate ne peut être transféré directement de l'HHK à un RR. Un intermédiaire est nécessaire ; une histidine phosphotransférase (HPT), possédant un résidu histidine conservé. Dans un TCS à plusieurs composants, le transfert de phosphate se déroule comme suit ; His (DHp_{HHK}) → Asp (RD_{HHK}) → His (HPT) → Asp (RD_{RR}). Ce système plus complexe est alors appelé MCS (*Multi-Component signal transduction System*) (Capra and Laub, 2012).

2. CtrA ou comment un régulateur de réponse détermine le *cell fate*

CtrA (*Cell cycle Transcriptional Regulator*) est un régulateur de réponse essentiel pour la viabilité de *Caulobacter crescentus* et est largement conservé au sein des α -protéobactéries. Aussi dénommé le *master regulator*, CtrA régule l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans des événements du cycle cellulaire et de la morphogenèse : méthylation de l'ADN, réplication du chromosome, biosynthèse du flagelle et de l'holdfast, synthèse de la paroi cellulaire, etc. (**Fig. 5**) (Laub et al., 2002). Au vu de son implication centrale dans le *cell fate*, CtrA est très finement régulé par trois processus majeurs ; sa transcription, sa (dé)phosphorylation et sa protéolyse (**Fig. 6**).

a. Régulation transcriptionnelle de CtrA

La transcription de *ctrA* est régulée par deux promoteurs dont la force d'action est différente ; P1 est un promoteur faible (P1_w pour *weak*) et P2 est un promoteur fort (P2_s pour *strong*).

Dans la cellule prédivisionnelle précoce, la réplication du chromosome est en cours et une partie du néo-génome est donc sous forme hémiméthylée. C'est uniquement sous cette forme que le promoteur P1_w est actif et permet donc une première vague – certes très minime – de transcription de *ctrA* (Domian et al., 1999; Reisenauer and Shapiro, 2002). CtrA, fraîchement traduit, est phosphorylé (voir ci-dessous) et dimérise. La forme phosphorylée et dimérique de CtrA correspond à une forme active du RR (CtrA~P) (Siam and Marczyński, 2003).

Alors que la réplication du chromosome avance pas à pas, simultanée à la croissance de la cellule prédivisionnelle, la concentration en CtrA~P augmente dans le cytoplasme jusqu'à inhiber P1_w et activer P2_s par une interaction directe avec son propre promoteur (Domian et al., 1999). Le promoteur fort étant actif, *ctrA* est transcrit à haut débit et la cellule prédivisionnelle accumule du CtrA~P. Cette accumulation a quatre conséquences majeures ;

- (i) la transcription intensive de *ccrM*, un gène essentiel à la viabilité. CcrM est une méthylase ciblant les sites GANTC des brins néosynthétisés et est, tout au long du cycle cellulaire, dégradée par la protéase Lon. La transcription

intensive induite par CtrA~P compense cette protéolyse et permet à CcrM de remplir sa mission de méthylation (Berdis et al., 1998; Reisenauer et al., 1999; Wright et al., 1996; Zweiger et al., 1994).

- (ii) le blocage des deux *Coris* (*Caulobacter Origins of Replication*), et donc l'impossibilité d'initier un nouveau cycle de réplication, le premier n'étant même pas achevé. La cause de ce blocage est la liaison de CtrA~P sur cinq sites (nommés de A à E) des origines de réplication (Bastedo and Marczyński, 2009; Brassinga and Marczyński, 2001; Marczyński and Shapiro, 1992; Quon et al., 1998).
- (iii) la transcription du gène de la piline. La piline est une protéine de structure des pili ; appendices caractéristiques de la cellule flagellée (Skerker and Shapiro, 2000).
- (iv) l'activation des gènes de classe I impliqués dans la biosynthèse du flagelle. Les produits de ces gènes activeront, à leur tour, les gènes de classe II codant, entre autres, pour la protéine FlbD. Une fois phosphorylée par une kinase inconnue, FlbD activera les gènes de classes III et IV codant pour les protéines structurales du flagelle (Huguenel and Newton, 1982; Muir et al., 2005; Muir and Gober, 2001).

b. Phosphorylation de CtrA

La forme active de CtrA est phosphorylée et dimérique (CtrA~P). Cette phosphorylation est le résultat du MCS (voir III.1.c pour rappel) CckA/ChpT. CckA (*Cell-Cycle Kinase A*) est une HHK essentielle à la viabilité cellulaire dont l'activité kinase joue son rôle au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle, aussi appelé nouveau pôle (Biondi et al., 2006; Jacobs et al., 2003; Jacobs et al., 1999). Une fois activée (par un signal explicité au point III.5.a), CckA s'autophosphoryle et transmet son phosphate à ChpT, une HPT qui relaie le groupement phosphate à CtrA. Autrement dit, quand CckA est kinase-active, CtrA est actif. Au contraire, l'hypothétique activité phosphatase de CckA inhiberait CtrA~P en inversant le phosphorelais (Chen et al., 2009; Jacobs et al., 2003).

Pourquoi serait-il logique que CckA soit kinase-active au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle ? Pour rappel, seule la cellule pédonculée est capable de répliquer son chromosome. Par ailleurs, une fois la réplication de l'ADN entamée, il faut à tout prix éviter qu'une nouvelle réplication ne soit initiée ; c'est le rôle de CtrA~P. Avec l'activité kinase de CckA au pôle flagellé (et une hypothétique activité phosphatase de CckA au pôle pédonculé), la concentration de CtrA~P est plus importante dans la partie de la cellule prédivisionnelle qui deviendra la cellule flagellée à la fin du cycle. Ainsi, une fois la cytokinèse achevée, la cellule flagellée emporte avec elle une CckA kinase-active, et donc un pool de CtrA~P, d'où une impossibilité pour la cellule flagellée de répliquer son chromosome. À l'inverse, la cellule pédonculée hériterait d'un CckA phosphatase-active et donc d'un phénomène croissant de déphosphorylation de CtrA~P, ce qui permettrait à la cellule pédonculée d'initier un nouveau cycle de réplication (pour ce dernier point, l'inversion du *pathway* de phosphorylation de CtrA n'est qu'une hypothèse et est donc à prendre avec précaution) (**Fig. 7**).

c. Protéolyse de CtrA

La déphosphorylation de CtrA n'est pas le seul moyen utilisé par la cellule pédonculée pour se débarrasser du pool de CtrA~P. Ainsi, la protéase ATP-dépendante ClpXP dégrade CtrA~P (Jenal and Fuchs, 1998). Cette protéolyse – localisée au pôle pédonculée – n'est possible que si le régulateur de réponse CpdR interagit avec ClpXP. Cette interaction est, à son tour, régulée par la phosphorylation de CpdR. S'il est phosphorylé, CpdR ne ciblera pas ClpXP. Or, CpdR est un RR de la voie CckA/ChpT (Biondi et al., 2006; Iniesta et al., 2006). En résumé, CckA serait phosphatase-active (ou du moins kinase-inactive, voire absente) au pôle pédonculé, empêchant dès lors la phosphorylation de CpdR qui peut de ce fait interagir avec ClpXP pour dégrader CtrA~P (Chen et al., 2009).

Enfin, le régulateur protéolytique RcdA permet de localiser le complexe ClpXP-CpdR au pôle pédonculé, ce qui rend la polarisation de dégradation de CtrA~P possible (McGrath et al., 2006). Nous reviendrons au point 4 sur ce qui permet la localisation de RcdA.

3. Le système PleC/DivK/DivJ

a. Division phenotype K ou DivK

Le régulateur de réponse à domaine unique (RR*) DivK est une protéine essentielle de 125 acides aminés produite continuellement au cours du cycle cellulaire. Son état de phosphorylation est déterminé au moins par les HKs PleC et DivJ (Cabantous et al., 2002; Hecht et al., 1995).

b. Pleiotropic phenotype C ou PleC

i. Généralités

Les mutants délétés pour *pleC* ne produisent ni pédoncule, ni holdfast, ni pili et arborent un flagelle paralysé (Smith et al., 2003; Sommer and Newton, 1989). PleC est donc indubitablement impliqué dans la morphogenèse de *Caulobacter crescentus*. Cependant, *pleC* est transcrit constitutivement sous l'influence du facteur σ (Malakooti et al., 1995). L'abondance de la protéine ne semble dès lors pas l'élément qui détermine son rôle dans le programme développemental, bien que certaines études – restées largement ignorées jusqu'à aujourd'hui – tendent à montrer une variation de l'abondance de PleC tout au long du cycle cellulaire (Chen et al., 2005; Viollier et al., 2002). La clé de l'action de PleC pourrait donc résider dans sa localisation au **pôle flagellé** via la protéine PodJ (Hinz et al., 2003).

ii. PodJ

podJ est négativement régulé par CtrA~P. C'est la raison pour laquelle la transcription de ce gène débute dans la cellule prédivisionnelle précoce, lorsque l'abondance de CtrA~P est minimale (Holtendorff et al., 2004).

PodJ localise PleC au pôle flagellé et existe sous deux formes : longue (PodJ_L) et courte (PodJ_S). La protéolyse de cette « protéine de localisation » se divise en deux grandes phases. Premièrement, la protéase PerP (dont la transcription est positivement régulée par CtrA~P)

clive le domaine périplasmique de PodJ_L. L'initiation de la rotation du flagelle est concomitante à ce clivage (Chen et al., 2006). Plus tard, la métalloprotéase MmpA dégrade PodJ_S durant la transition cellule flagellée → cellule pédonculée, délocalisant dès lors PleC du pôle flagellé (Chen et al., 2005).

iii. PleC_K et PleC_P

L'histidine kinase PleC possède deux activités enzymatiques ; kinase (PleC_K) et phosphatase (PleC_P) (Hecht et al., 1995). PleC_P est principalement actif dans la cellule flagellée, avec une localisation régulée au pôle. L'activité phosphatase de PleC permet la déphosphorylation du RR DivK~P (Hecht et al., 1995; Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008).

PleC_K joue son rôle dans la cellule pédonculée où il active PleD. Cette HK est largement impliquée dans la forme sessile de *C. crescentus* (voir point 4). De plus, il a été prouvé *in vitro* que PleC_K peut également phosphoryler DivK, tout comme le fait DivJ (Hecht et al., 1995).

PleC fait débat quand il s'agit de la coordination de ses activités enzymatiques. Des modèles inconciliables, basés cependant sur des observations rigoureuses, sont au cœur de ce mémoire et seront présentés au point III.5.b.

c. Division phenotype J ou DivJ

Tout comme pour PleC, la localisation de DivJ est primordiale pour la régulation du cycle cellulaire. Grâce à la « protéine de localisation » SpmX, DivJ est localisé au **pôle pédonculé** (Radhakrishnan et al., 2008).

SpmX possède, en plus de deux domaines transmembranaires, un domaine muramidase périplasmique qui lui permet de se lier au peptidoglycane (Lawler and Brun, 2006). La transcription du gène *spmX* est positivement régulée par TacA, une protéine dont la transcription est à son tour induite par CtrA~P. *spmX* est donc transcrit dans la cellule flagellée mais la traduction ne s'opère que plus tard, lorsque DivJ doit être localisé; c'est-à-dire durant la différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée (Radhakrishnan et al., 2008).

L'activité kinase de DivJ opère sur DivK au pôle pédonculé. Il s'agit ici d'une boucle d'activation puisque DivJ promeut DivK~P qui à son tour, agit comme activateur allostérique de DivJ (**Fig. 8**) (Paul et al., 2008).

d. En résumé...

Le mode de fonctionnement de ce système réside principalement dans la localisation polarisée et antagoniste de PleC et DivJ. PleC est au pôle flagellé ce que DivJ est au pôle pédonculé, ce qui ne les empêche pas d'être délocalisées. Ces deux HKs agissent sur le RR à domaine unique DivK. Mais comment ce système permet-il une régulation morphologique à l'échelle d'un organisme ? La réponse à cette question est l'objet du point 5.

4. PleD et la sédentarité

Pleiotropic phenotype D ou PleD est un régulateur de réponse caractérisé par un domaine GGDEF qui lui confère une activité diguanylate cyclase (DGC) (Hecht et al., 1995; Paul et al., 2007; Paul et al., 2004). Cette activité enzymatique lui permet de synthétiser du diguanylate cyclique ou c-di-GMP (*bis-(3'-5')-Cyclic Dimeric Guanosine MonoPhosphate*), un messenger secondaire impliqué, entre autres, dans la transition entre formes bactériennes motiles et sédentaires (**Fig. 9**) (revu dans Hengge, 2009). Chez *Caulobacter crescentus*, PleD est largement associé au pôle pédonculé (Abel et al., 2011; Paul et al., 2004).

La forme dimérique et phosphorylée de PleD synthétise du c-di-GMP (de concert avec DgcB, une autre DGC) qui se liera à des protéines effectrices telles que PopA et DgrA (**Fig. 10**). PopA est un analogue de PleD dans le sens où il possède un domaine de liaison au c-di-GMP (site I) mais ne présente pas d'activité DGC (Chan et al., 2004; Christen et al., 2006). PopA localise au pôle pédonculé lorsqu'il interagit avec le c-di-GMP, ce qui lui permet de recruter RcdA (voir III.2.c) et donc de cibler la dégradation de CtrA~P au pôle pédonculé (Duerig et al., 2009). D'une manière tout à fait surprenante, PopA localise également au pôle flagellé (Taylor et al., 2009). Cependant, la présence de la phosphodiesterase (PDE) TipF (**Fig. 11**) – possédant un domaine EAL, antagoniste des domaines GGDEF – à ce pôle permet de dégrader le c-di-GMP (Huitema et al., 2006). La preuve en est le gradient de c-di-GMP observé le long de la cellule prédivisionnelle, avec une concentration jusqu'à cinq fois supérieure de messenger secondaire dans la partie pédonculée de la cellule en cours de division (Christen et al., 2010). Enfin, une autre protéine effectrice, DgrA, est connue pour inhiber des composants flagellaires cytoplasmiques et de ce fait empêche une synthèse incongrue du flagelle (Christen et al., 2007).

5. Quand tous ces acteurs se rencontrent

Nous avons introduit toute une série de notions propres à des MCS de *Caulobacter crescentus*; le master regulator CtrA en aval de la voie CckA/ChpT, le système PleC/DivK/DivJ et le régulateur de réponse un peu particulier qu'est PleD. Mais qu'est-ce qui uni tous ces acteurs et comment déterminent-ils le destin d'une bactérie ?

a. *Division phenotype L ou DivL*

DivL est une histidine kinase essentielle non orthodoxe puisque son résidu histidine conservé est modifié en un résidu tyrosine (Wu et al., 1999). DivL ne joue donc pas un rôle standard dans un quelconque phosphorelais chez *C. crescentus*. En effet, le rôle de DivL est d'unir les deux MCS impliqués dans la morphogenèse de la bactérie; PleC/DivK/DivJ et CckA/ChpT (**Fig. 12**).

Lorsque DivK est sous forme phosphorylée, il inhibe (par une interaction protéique) DivL. Or, DivL promeut l'activité kinase de CckA (également par une interaction protéine-protéine) (Iniasta et al., 2010; Tsokos et al., 2011). Cela signifie que DivK~P inhibe indirectement la phosphorylation de CtrA.

b. Il était une fois la morphogenèse de *C. crescentus*

Il ne s'agit pas seulement de comprendre et caractériser les acteurs moléculaires individuellement (comme cela a été fait jusque maintenant dans cette introduction) mais surtout de les intégrer dans un système, dans le fonctionnement d'un organisme.

La cellule pédonculée est le centre névralgique de l'initiation de la réplication du chromosome. C'est pourquoi DivJ localise au pôle pédonculé et phosphoryle DivK qui, par l'intermédiaire de DivL, inhibe la voie CckA/ChpT/CtrA. Cette inhibition empêche la phosphorylation de CtrA, mais favorise également la dégradation de celui-ci par l'interaction rendue possible entre ClpXP et CpdR non-phosphorylé (voir III.2.c pour rappel). L'absence de CtrA permet dès lors l'initiation de la réplication du chromosome dans la cellule pédonculée.

Alors que la réplication suit son cours, la cellule croît ; c'est la cellule prédivisionnelle précoce. Ici, PleC et DivJ localisent respectivement aux pôles flagellé et pédonculé. DivJ phosphoryle DivK qui est dès lors localisé aux deux pôles. La suite est plus complexe puisque deux modèles sont proposés dans la littérature, complémentaires bien que profondément différents (**Fig. 13**);

- (i) Hypothèse du *pole-to-pole shuttling* (équipe de C. Jacobs-Wagner) (Matroule et al., 2004);

Dans la cellule prédivisionnelle, il existe un véritable « ping-pong » dont la « balle » est DivK et les « joueurs » sont PleC et DivJ. DivK délocalise partiellement du pôle pédonculé où il est phosphorylé par DivJ, traverse le corps cellulaire jusqu'au pôle flagellé où PleC_P le déphosphoryle. Une fois déphosphorylé, DivK retourne au pôle pédonculé où il sera rephosphorylé par DivJ. Il en résulte un mouvement de DivK(~P) d'un pôle à l'autre de la cellule prédivisionnelle avec, en plus, une localisation de DivK~P aux deux pôles. Tant que la cellule croît, cet échange continue. Mais lors de la cytokinèse, une barrière physique empêche ce « ping-pong ». Dans la future cellule pédonculée, DivK~P reste localisé au pôle (grâce à l'action de DivJ) alors que DivK délocalise dans la future cellule flagellée puisque PleC_P le déphosphoryle. Cette délocalisation de DivK dans la cellule flagellée serait à l'origine de l'initiation du SwaPS (voir II.3 pour rappel).

- (ii) Hypothèse de la régulation allostérique (équipe d'U. Jenal) (Paul et al., 2008);

Comme déjà explicité à la figure 8, le RR* DivK est capable de réguler allostériquement PleC et DivJ. Dans cette seconde hypothèse, c'est cette régulation allostérique qui est au cœur de la compréhension du mécanisme de morphogenèse. Dans la cellule prédivisionnelle, DivJ et PleC sont ici aussi localisés respectivement aux pôles pédonculé et flagellé mais la localisation (également bipolaire) de DivK~P favorise PleC_K (là où l'hypothèse de C. Jacobs-Wagner met en avant une dominance de l'activité phosphatase de PleC). Il n'est pas question dans cette hypothèse d'un *pole-to-pole shuttling* de DivK(~P). Une fois la cytokinèse achevée, la cellule flagellée arbore un PleC_P empêchant la phosphorylation de PleD et donc une impossibilité

d'initier la biogenèse du holdfast et du pédoncule. Lors de la transition cellule flagellée → cellule pédonculée, DivJ (qui était absent de la cellule flagellée) relocalise au pôle (qui se caractérise en fait uniquement par le holdfast) et phosphoryle donc le pool de DivK cellulaire. Une fois de plus, DivK~P – par allostérie – favorise l'activité kinase de PleC. À son tour, PleC_K phosphoryle PleD et permet donc la sédentarisation de la bactérie.

Ces deux hypothèses contiennent, il n'est pas permis d'en douter, chacune leurs vérités mais également leurs zones d'ombre à investiguer. Ainsi, la localisation des HKs PleC et DivJ et du RR* DivK aux pôles, le rôle de PleD et du c-di-GMP sont un fait. Mais qu'en est-il du changement d'activité de PleC ? Le pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle arbore-t-il PleC_P ou PleC_K ? Y-a-t-il effectivement un changement d'activité de l'histidine kinase après cytokinèse ? Comment celle-ci régule-t-elle (de concert avec d'autres acteurs) les différentes étapes du SwaPS ?

Quoi qu'il en soit, le système DivJ/PleC est au cœur de la régulation de deux événements de la différenciation en contrôlant, d'une part, les phases G₁/S par DivK et, d'autre part, la transition cellule flagellée → cellule pédonculée par PleD (Curtis and Brun, 2010).

IV. Objectifs de ce mémoire

1. Champ de recherche

Dans un mutant *ApleC*, le SwaPS est inhibé. Cette observation est confirmée par une version déficiente de PleC où les activités kinase et phosphatase sont toutes deux perturbées (K-P- ou PleC_{H610A}). Au contraire, dans un mutant où seule l'activité phosphatase est fonctionnelle (K-P+ ou PleC_{F778L}), les étapes précoces du SwaPS se déroulent sans perturbation (rotation du flagelle et synthèse des pili) (Matroule et al., 2004).

En ce qui concerne la capacité d'attachement à un substrat (**Fig. 14**), un mutant *ApleC* perd presque totalement cette fonction. Il est logique de voir le même résultat avec un mutant K-P-. Cependant, un mutant K-P+ retrouve partiellement sa capacité à s'attacher, suggérant que l'activité kinase de PleC est, en partie du moins, impliquée dans l'attachement de *C. crescentus* (Paul et al., 2008). Cette expérience est la raison pour laquelle la souche CB15 sera utilisée dans ce mémoire. Cette souche «sauvage» a la capacité d'attacher, contrairement à la souche CB15N, préférentiellement utilisée en laboratoire.

En résumé, l'activité phosphatase de PleC semble être impliquée dans les étapes les plus précoces du SwaPS, là où il est suggéré un rôle de l'activité kinase dans les étapes les plus tardives.

2. Et le mutant K+P- ?

L'analyse bioinformatique a permis la création des mutants H610A et F778L de PleC. Cependant, cette approche n'a pas porté ses fruits lorsqu'il a fallu créer le mutant K+P- de PleC. Pourtant, celui-ci permettrait de comprendre la valeur intrinsèque de chacune des activités de cette histidine kinase au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Quand le changement de fonction intervient-il exactement et dans quelle(s) mesure(s) est-il impliqué dans la morphogénèse ? Au vu de la divergence existant entre les modèles du *pole-to-pole shuttling* et de la régulation allostérique, il est logique de se questionner sur le rôle exact de PleC, notamment dans la cellule prédivisionnelle. L'obtention du mutant K+P- de PleC par un crible en deux étapes est l'objectif de ce mémoire.

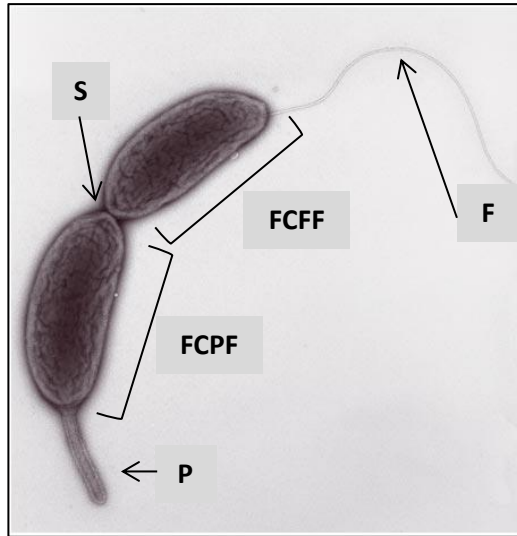


Figure 1 – Image en microscopie électronique à transmission d’une cellule prédivisionnelle de *Caulobacter crescentus*. Flagelle (**F**), pédoncule (**P**), septum (**S**), future cellule pédonculée (**FCP**), future cellule flagellée (**FCF**). (Microscopie adaptée de Jones, 2006).

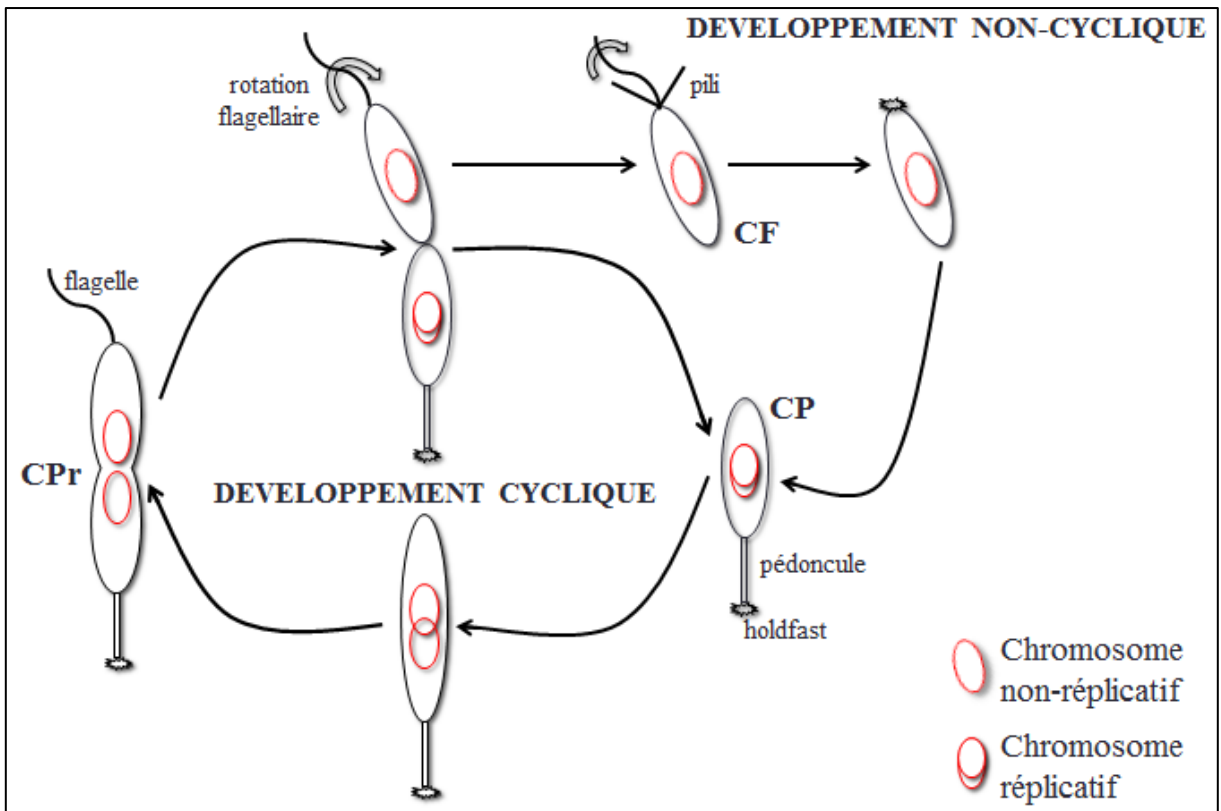


Figure 2 – Cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*. La cellule pédonculée (**CP**) est capable de répliquer son chromosome (**cercle rouge**) et est caractérisée par son pédoncule, fine extension du cytoplasme au bout de laquelle se trouve l’holdfast. Lorsque la cellule pédonculée entre en phase S, la cellule croît et est dès lors appelée cellule prédivisionnelle (**CPr**). À la fin de la cytokinèse, la cellule prédivisionnelle est divisée en deux compartiments asymétriques correspondant à deux types cellulaires distincts ; les cellules

pédunculée et flagellée (**CF**). Alors que la cellule pédunculée reste attachée à son substrat et initie un nouveau cycle de réplication (**développement cyclique**), la cellule flagellée débute un programme développemental qui lui est propre (SwAPS). On parle ici de **développement non-cyclique** puisque la cellule flagellée est incompétente pour la réplication de son chromosome et doit d'abord se différencier en cellule pédunculée afin de pouvoir initier un nouveau cycle de réplication.

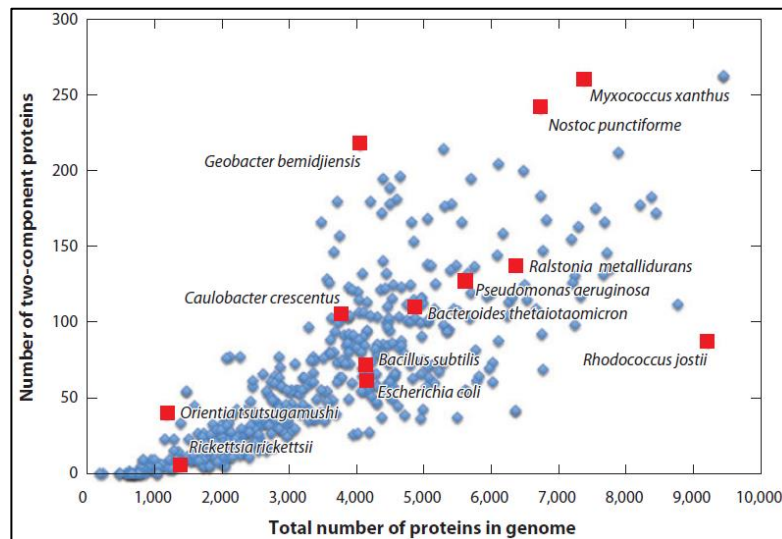


Figure 3 –Graphique représentant le rapport entre le nombre de protéines impliquées dans un système à deux composants (**en ordonnée**) et le nombre total de protéines prédites sur le génome (**en abscisse**) de 504 espèces bactériennes. **Les carrés rouges** correspondent à des espèces d'intérêt majeur (Capra and Laub, 2012).

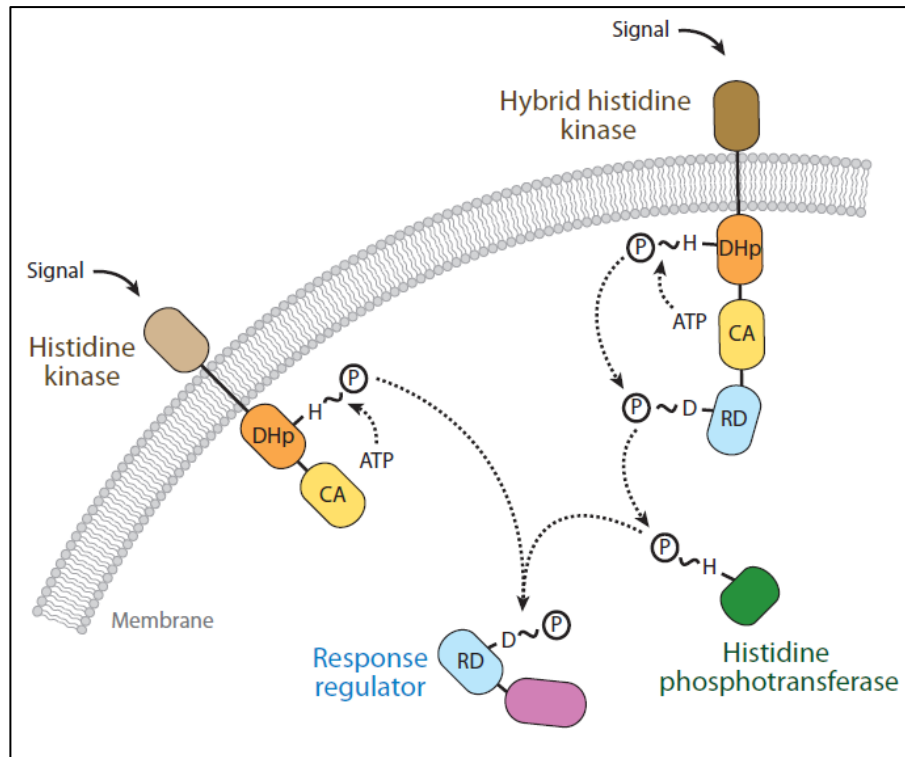


Figure 4 – Aperçu du fonctionnement général d'un TCS (à gauche) et d'un MCS (à droite), basés ici sur un signal périplasmique. Les flèches pointillées correspondent au transfert du groupement phosphate (**P entouré**). Domaine de dimérisation et de phosphotransfert (**DHp**), domaine catalytique liant l'ATP (**CA**), domaine receveur (**RD**), domaine de liaison à l'ADN (**mauve**), résidu histidine (**H**), résidu aspartate (**D**) (Capra and Laub, 2012).

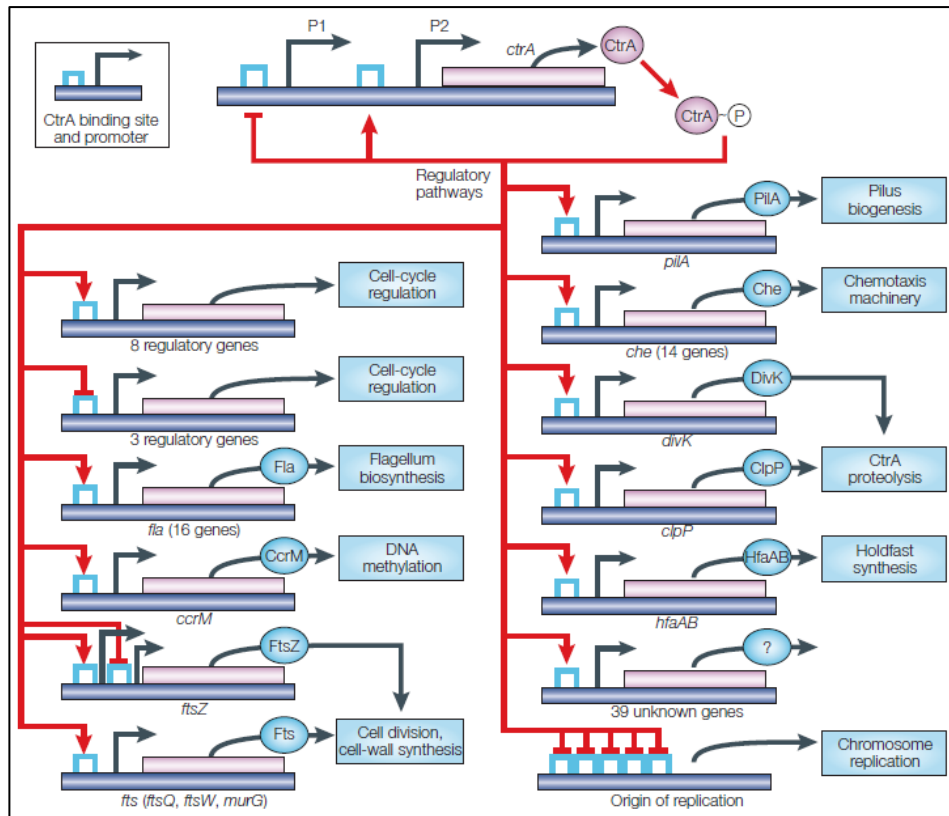


Figure 5 – Représentation de quelques gènes connus pour être régulés positivement (**flèche rouge**) ou négativement (**barre rouge**) par CtrA sous sa forme active. Les encadrés bleus correspondent à la fonction cellulaire majeure du produit du gène en question (Skerker and Laub, 2004).

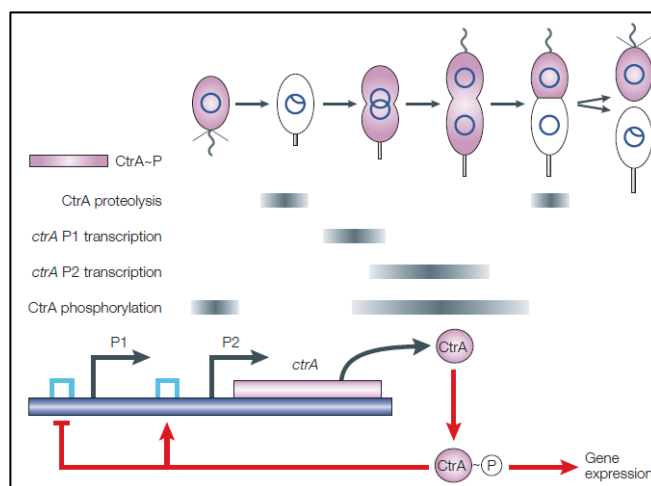


Figure 6 – Représentation des trois niveaux de régulation du *master regulator* CtrA au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*. La protéolyse de CtrA est caractéristique de la cellule pédonculée. L'absence de ce régulateur de réponse permet la réplication du chromosome (**cercle bleu**). Dans les autres types cellulaires, CtrA dimérise et est phosphorylé (**CtrA~P**),

lui permettant de réguler sa propre transcription en activant le promoteur fort en amont de *ctrA* (**P2**) et d'inhiber l'activité de son promoteur faible (**P1**) (Skerker and Laub, 2004).

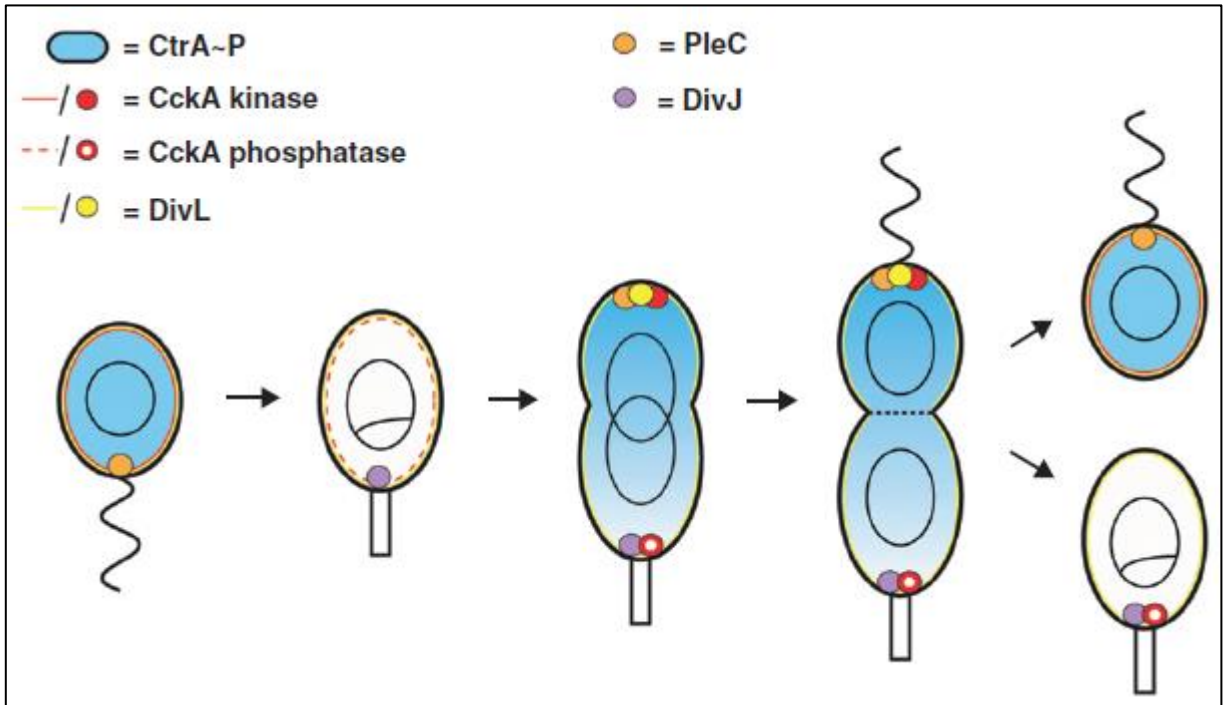


Figure 7 – Localisation cellulaire de quelques acteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus*. Alors que le gradient de **CtrA~P** s'intensifie dans la cellule prédivisionnelle, avec une concentration moindre au pôle pédonculé, l'HHK **CckA** localiserait aux deux pôles, exhibant deux fonctions enzymatiques : kinase au pôle flagellé et phosphatase hypothétique au pôle pédonculé. Cette asymétrie explique, en partie, l'absence de CtrA dans les cellules pédonculées (Tsokos and Laub, 2012).

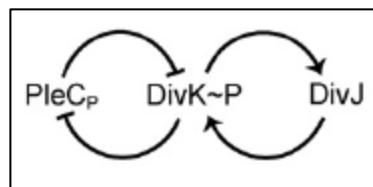


Figure 8 – Régulation allostérique de DivK phosphorylé (**DivK~P**) sur l'activité phosphatase de PleC (**PleC_p**) et sur **DivJ**. Par son activité phosphatase, PleC_p inhibe DivK~P qui, à son tour, inhibe cette activité enzymatique de PleC par allostérie. Inversement, DivJ favorise la présence de DivK~P en phosphorylant DivK. DivK~P, toujours par allostérie, favorise l'activité de DivJ (Paul et al., 2008).

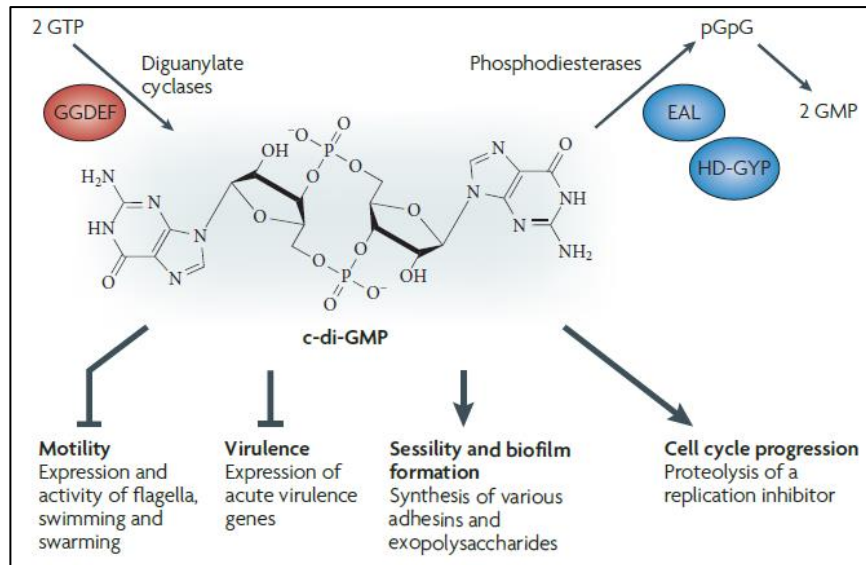


Figure 9 – Structure biochimique et rôles majeurs du di-guanosine monophosphate cyclique (**c-di-GMP**). Une DGC, caractérisée par un domaine GGDEF (**rouge**) synthétise du **c-di-GMP** à partir de deux molécules de guanosine triphosphate (**2 GTP**). À l'inverse, les phosphodiéstérases ou PDE (caractérisées par un domaine EAL ou HD-GYP, en **bleu**) dégradent le **c-di-GMP** en 5'-phosphoguanilyl-(3-5)-guanosine (**pGpG**), lui-même dégradé par des phosphodiéstérases non-spécifiques en deux molécules de guanosine monophosphate (**2 GMP**) (Hengge, 2009).

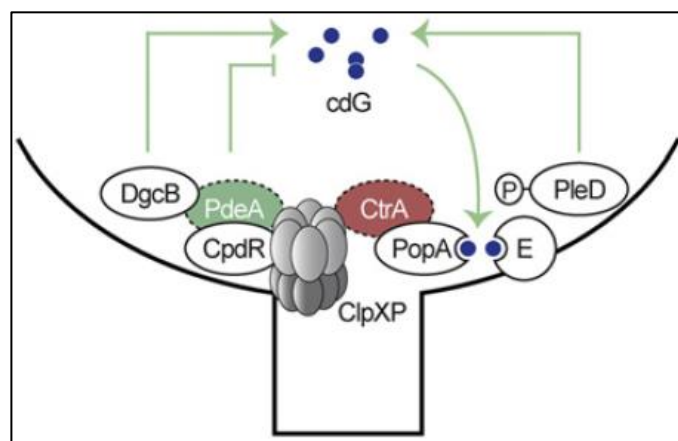


Figure 10 – Modèle expliquant la synthèse du pédoncule lors de la transition cellule flagellée → cellule pédonculée. Durant cette transition, la PDE **PdeA**, spécifique de la cellule flagellée, est dégradée par **ClpXP** (dont l'activité est permise par le RR **CpdR**). Cette dégradation est simultanée à l'activation des DGCs **DgcB** et **PleD**, favorisant la fonctionnalité de protéines effectrices (**E**, **PopA**) grâce au **c-di-GMP (cdG)**. PopA localise la dégradation de **CtrA** au nouveau pôle pédonculé (Abel et al., 2011).

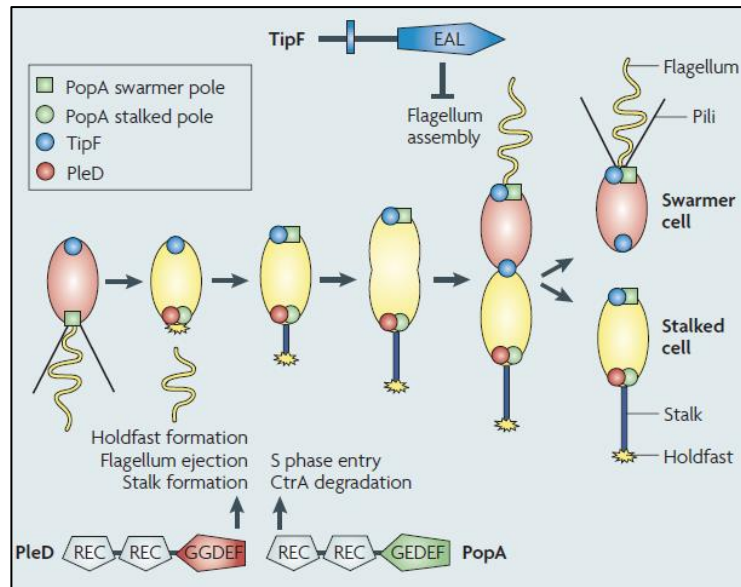


Figure 11 – Localisation d’enzymes impliqués dans le métabolisme du c-di-GMP au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*. La DGC PleD (**rond rouge**) localise au pôle pédonculé, toujours opposée à la PDE TipF (**rond bleu**). Lors de la transition cellule flagellée → cellule pédonculée, TipF disparaît du pôle flagellé et permet dès lors à PleD d’être phosphorylé et de dimériser (grâce à son *two-component RECeiver domain REC*). La protéine effectrice PopA localise, quant à elle, aux deux pôles (**rond et carré verts**) (Hengge, 2009).

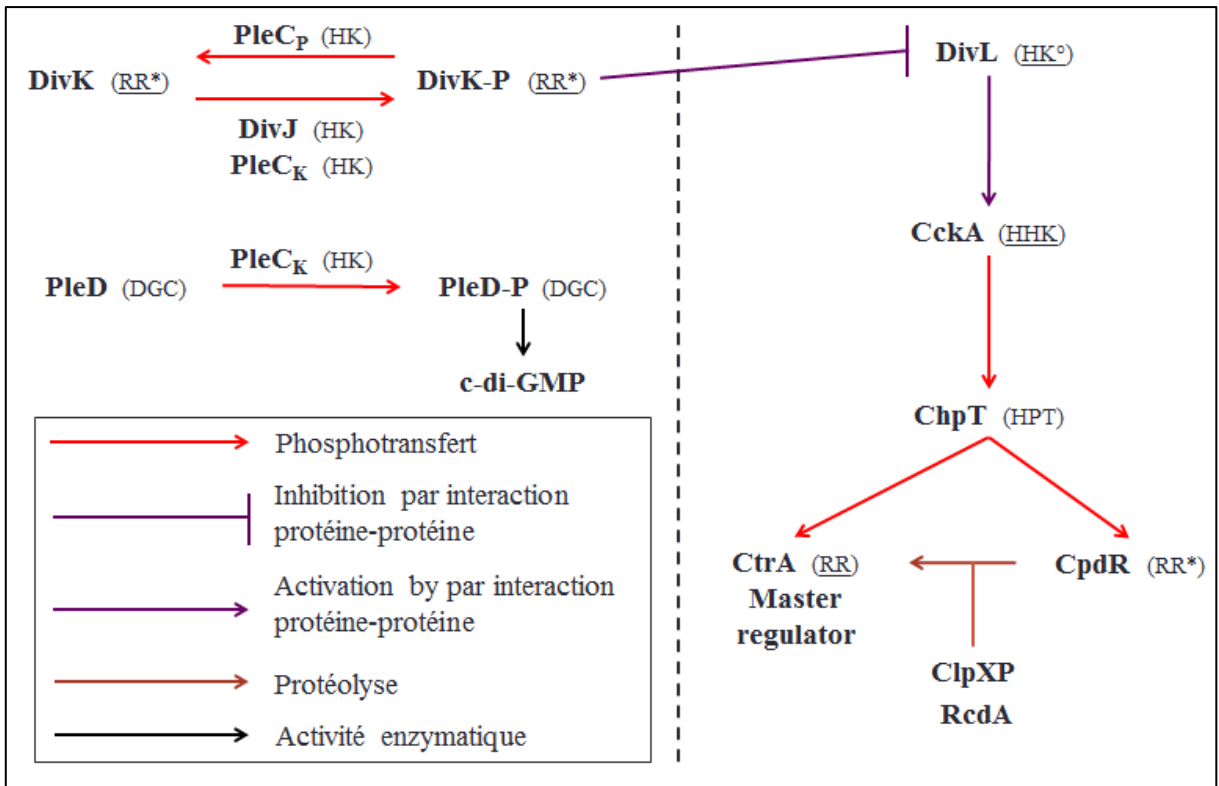


Figure 12 – Phosphorelais impliqués dans le programme développemental de *Caulobacter crescentus*. Le système PleC/DivK/DivJ (**gauche**) interagit avec le système CckA/ChpT (**droite**) grâce à une interaction protéique entre DivK~P et DivL. Histidine kinase (HK), histidine kinase modifiée (HK°), histidine kinase hybride (HHK), régulateur de réponse (RR), régulateur de réponse à domaine unique (RR*), diguanylate cyclase (DGC), histidine phosphotransférase (HPT), di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), protéine essentielle pour la viabilité (**souligné**).

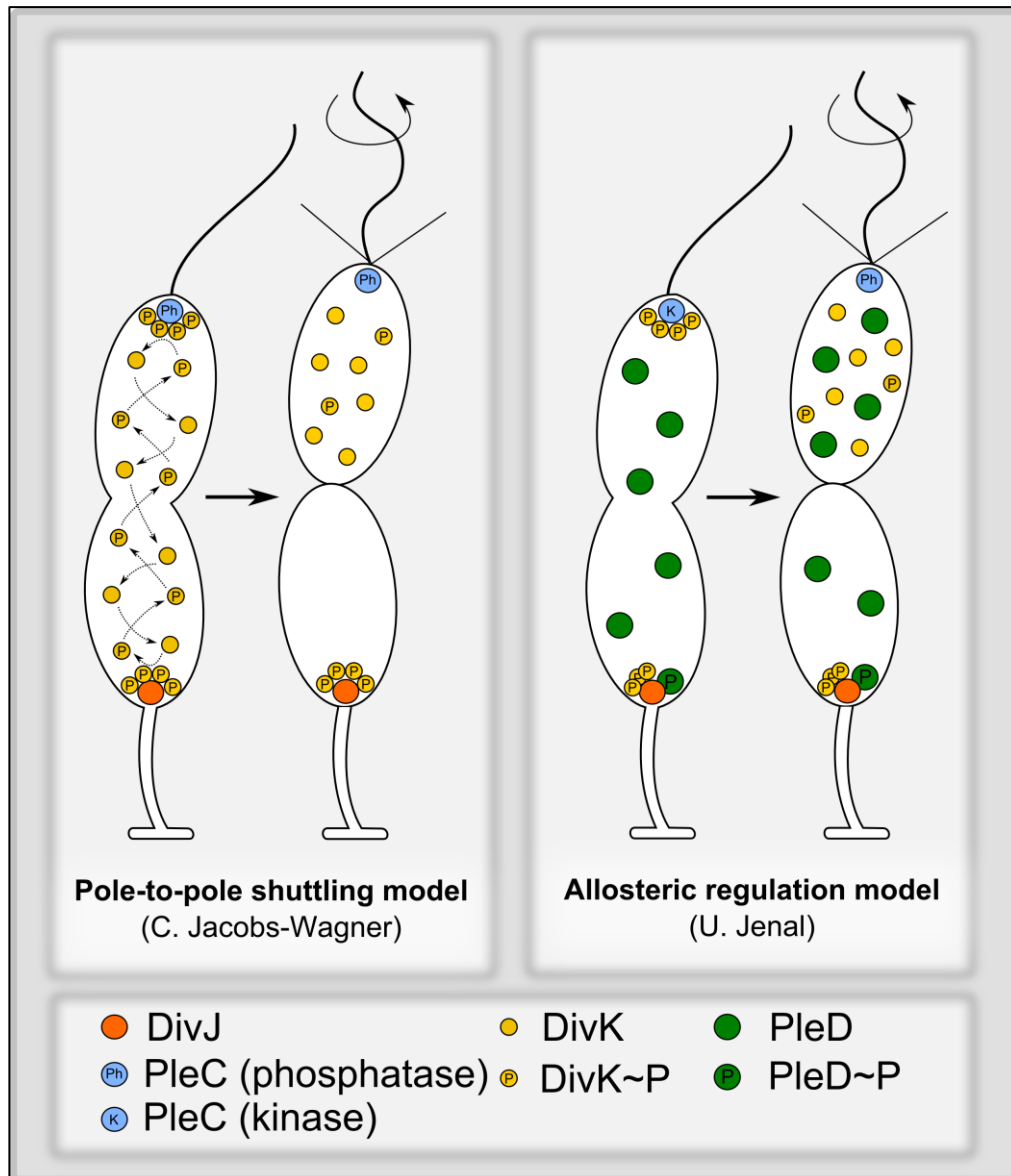


Figure 13 – Schéma comparant les deux hypothèses (*pole-to-pole shuttling* à gauche et régulation allostérique à droite) concernant la régulation spatiale de la morphogenèse chez *Caulobacter crescentus*. **(i)** la cellule prédivisionnelle est polarisée entre le pôle DivJ et le pôle PleC (avec un flagelle immobile). DivJ induit la localisation de DivK~P aux pôles grâce à son activité kinase alors que PleC_P relâche du pôle flagellé des entités de DivK déphosphorylé. Cet échange (**flèches pointillées**) est bloqué en fin de cytokinèse puisque qu'une barrière physique est créée entre les deux pôles. Il en résulte une délocalisation de DivK dans la cellule flagellée, cause de l'initiation du SwaPS. Au même moment, la cellule pédonculée garde un pool de DivK~P localisé. **(ii)** le pool de DivK~P du pôle flagellé favorise PleC_K. Au pôle pédonculé, PleD~P localise et synthétise du c-di-GMP. Après cytokinèse, la cellule flagellée est coupée de la pression induite par DivJ, et l'activité phosphatase de PleC est favorisée, déphosphorylant le pool de DivK~P qui délocalise dès lors. Par ailleurs, la cellule pédonculée hérite d'un pool de PleD actifs (Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008; K. Poncin).

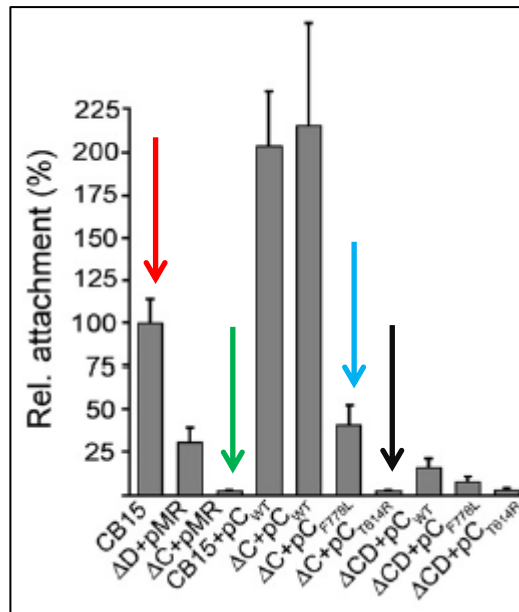


Figure 14 – Attachement relatif (en %) de plusieurs mutants *pleC* de *Caulobacter crescentus*, comparés à la souche sauvage CB15 (**flèche rouge**). Le mutant délété pour *pleC* (**flèche verte**), tout comme le mutant K-P- (**flèche noire**) semblent ne pas attacher. Le mutant K-P+ (**flèche bleue**) restaure partiellement cet attachement, d'où le rôle présumé de l'activité kinase de PleC dans un phénotype d'attachement (Paul et al., 2008).

RÉSULTATS
&
DISCUSSION

I. Constructions des souches contrôles exprimant les différents mutants *pleC* sur un plasmide à faible nombre de copies

1. Généralités

Dans le cadre de notre crible génétique visant à isoler le mutant K+P- de PleC, plusieurs souches contrôles précédemment caractérisées dans la littérature (Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008; Subramanian et al., 2013) doivent être utilisées comme points de comparaison. Il s'agit ici de mutants déjà publiés de PleC (K-P- et K-P+), de la souche sauvage de *Caulobacter crescentus* (CB15), d'une souche délétée pour PleC (CB15 $\Delta pleC$) ainsi que d'une version plasmidique sauvage de PleC dans un background $\Delta pleC$ (K+P+).

Dans un premier temps, le pMR20 – un plasmide répliatif à faible nombre de copies – a été choisi dans le but de s'approcher le plus possible du niveau d'expression endogène de *pleC*.

2. Construction *stricto sensu*

Les différentes formes de PleC (K-P-, K-P+ et K+P+) ont toutes été intégrées dans un pMR20 sous le contrôle de leur promoteur hypothétique (*ppleC*), consistant en une séquence de 586 paires de bases directement en amont de la séquence codante de *pleC*.

Les fragments de *ppleC-pleC* (H610A ou K-P-, F778L ou K-P+, sauvage ou WT), amplifiés par PCR à partir du pBluescript II SK (pSK)-*ppleC-pleC*_{H610A, F778L} et WT ont été digérés par les enzymes de restriction XbaI et KpnI et clonés dans le MCS (*Multiple Cloning Site*) du pMR20 préalablement digéré par les mêmes enzymes. Ces fragments ont tous été insérés de manière à être dans l'orientation inverse du *pLac*, promoteur fort du gène *lacZ*.

Ces trois vecteurs (pMR20-*ppleC-pleC*_{H610A, F778L} et WT) ont ensuite été chacun transformés dans un background génétique dépourvu de *pleC* (CB15 $\Delta pleC$). Nous utiliserons désormais les abréviations suivantes ; Δ -pMR(K-P-), Δ -pMR(K-P+) et Δ -pMR(K+P+), correspondant respectivement aux souches CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-*ppleC-pleC*_{H610A}, CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-*ppleC-pleC*_{F778L} et CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-*ppleC-pleC*_{WT}.

Par ailleurs, dans le but de normaliser nos résultats par rapport à l'utilisation d'un antibiotique (oxytétracycline dans ce cas), le vecteur pMR20 vide a été électroporé dans les souches CB15 et CB15 $\Delta pleC$. Les abréviations **CB15-pMR** et Δ -pMR correspondront désormais aux souches CB15-pMR20 et CB15 $\Delta pleC$ -pMR20.

II. Caractérisation des différentes souches contrôles (pMR20)

Trois niveaux de caractérisation ont été précédemment évalués dans la littérature (Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008) afin de discriminer les souches contrôles Δ -pMR(K-P-), Δ -pMR(K-P+), Δ -pMR(K+P+), CB15-pMR et Δ -pMR à savoir ; leur résistance à

l'infection par le bactériophage CbK, leur mobilité et leur attachement relatif à une surface abiotique.

1. Les souches n'initiant pas le SwaPS sont résistantes au phage CbK

Un test de résistance au phage (Φ) CbK a été mis en œuvre pour évaluer la synthèse de pili dans les souches Δ -pMR(K-P-), Δ -pMR(K-P+) et Δ -pMR(K+P+). En effet, les pili constituent le point d'entrée des Φ CbK et leur synthèse fait, pour rappel, partie intégrante du SwaPS (Matroule et al., 2004; Skerker and Shapiro, 2000). Une résistance aux Φ CbK signifie donc l'absence de pili, ou autrement dit, la perturbation d'une des étapes précoces du SwaPS.

La souche sauvage CB15 est naturellement sensible aux Φ CbK. La présence du vecteur vide dans la souche CB15-pMR ne change rien à la sensibilité de cette souche, indiquant que le plasmide n'interfère pas avec la production de pili. Parallèlement, les souches Δ -pMR et Δ -pMR(K-P-), supposées ne pas initier le SwaPS (PleC étant absent ou défectif), sont effectivement sensibles aux Φ CbK. Enfin, la souche Δ -pMR(K-P+) a été décrite comme étant sensible aux Φ CbK, indiquant dès lors que l'activité kinase de PleC n'est pas essentielle à la production des pili. Cependant, nos observations ont mis à jour une résistance intermédiaire de la souche Δ -pMR(K-P+) puisque les plaques de lyse – caractéristiques de la lyse des bactéries par les phages – n'étaient pas aussi marquées pour la souche Δ -pMR(K-P+) que pour les autres souches résistantes (**Fig. 15**). Ce phénotype intermédiaire pourrait être expliqué par l'environnement plasmidique de *pleC*_{F778L}, où le promoteur hypothétique *p_{pleC}* ne serait pas suffisant pour initier le taux transcriptionnel basal du gène. Cette perturbation pourrait trouver son origine dans l'absence de régions régulatrices en amont de *pleC*, nécessaires à sa transcription. Le faible nombre de copies du plasmide par bactérie pourrait donc ne pas être suffisant pour compenser la faiblesse hypothétique de ce promoteur. Par ailleurs, il serait logique de se demander si cette mutation (F778L) n'interfère pas avec la stabilité de la protéine en jouant sur sa conformation. Cette hypothèse est cependant peu probable puisque les études précédentes – utilisant un autre vecteur – n'ont pas mis en évidence de résistance intermédiaire. Un autre point de vue, intégrant le cycle cellulaire de *C. crescentus*, nous ramène à l'hypothèse d'Urs Jenal (modèle de la régulation allostérique) où PleC exhibe une fonction kinase au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle. Avec ce mutant K-P+, le taux de CtrA~P pourrait être modifié à la hausse via la diminution de DivK~P qui, dès lors, interagirait moins avec DivL, connu pour bloquer la voie de phosphorylation du *master regulator* CtrA (Iniesta et al., 2010; Tsokos et al., 2011). Cette augmentation de CtrA~P pourrait altérer à son tour la transcription de *podJ*. Or, PodJ est connu pour jouer un rôle dans l'assemblage et l'extrusion des pili via les protéines CpaE et PleA (Skerker and Shapiro, 2000; Viollier and Shapiro, 2003). Le fait d'avoir une expression de *pleC* perturbée, couplée au nombre variable de copies du vecteur par cellule, pourrait expliquer pourquoi certaines cellules seraient résistantes et d'autres sensibles aux Φ CbK dans la souche Δ -pMR(K-P+).

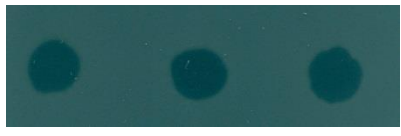
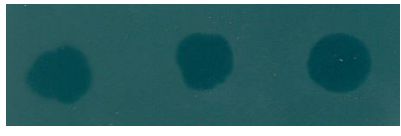
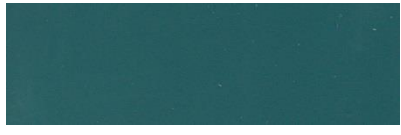
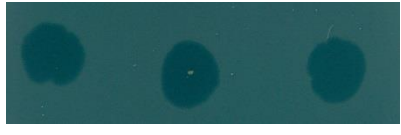
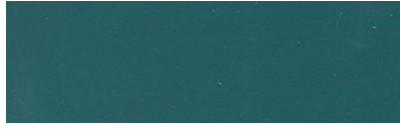
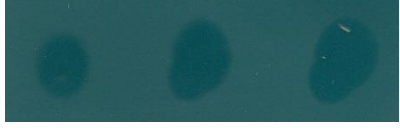
<i>Tests de résistance aux ΦCbK</i>	<i>Souches</i>	<i>Résistance aux ΦCbK ?</i>
	CB15	✗
	CB15-pMR	✗
	Δ -pMR	✓
	Δ -pMR(K+P+)	✗
	Δ -pMR(K-P-)	✓
	Δ -pMR(K-P+)	±

Figure 15 – Effet létal ou non des phages CbK sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Les souches sensibles (✗), résistantes (✓) et présentant une résistance intermédiaire (±) révèlent (ou non) des plaques de lyse.

2. Les mutants PleC possèdent une mobilité différente par rapport à la souche « sauvage » CB15-pMR

La mobilité de *Caulobacter crescentus* est principalement corrélée (i) à l'édification d'appendices et (ii) à la chémotaxie intrinsèque de la bactérie. Nous ne considérerons ici que le premier point, à savoir la synthèse et la fonctionnalité du flagelle.

Un test de mobilité est principalement qualitatif dans le sens où la taille des halos bactériens n'est pas une mesure aisément quantifiable. En effet, la mesure du diamètre des halos formés par les différentes souches est généralement biaisée par la forme irrégulière de celui-ci et par le manque de précision (mm) quant à son estimation. Ces deux raisons expliquent pourquoi nous nous en tiendrons à une comparaison purement qualitative de la taille des halos.

La taille du halo de la souche CB15N (incapable d'attacher à un substrat) est nettement supérieure à celle de la souche CB15 (**Fig. 16**), suggérant que le phénotype d'attachement et la capacité à nager sont corrélés, ce qui n'est pas surprenant au vu du déroulement du programme développemental de *C. crescentus* qui lie en partie pili et initiation de l'attachement (Li et al., 2012). Par ailleurs, le halo formé par la souche CB15-pMR est inférieur à celui formé par une souche CB15 sauvage. Cette observation ne signifie pas que la présence d'oxytétracycline altère la mobilité mais plutôt que l'antibiotique provoque un retard de croissance de la souche soumise à cette pression externe (données non montrées). Par ailleurs, les souches Δ -pMR(K-P-) et Δ -pMR forment des halos de taille très réduite par rapport à CB15-pMR puisque le SwaPS n'y est pas initié. Ces souches sont connues pour posséder un flagelle paralysé, empêchant leur mobilité (Matroule et al., 2004; Wang et al., 1993). Enfin, les souches Δ -pMR(K+P+) et Δ -pMR(K-P+), censées arborer un flagelle mobile, ont toutes deux un halo de taille largement inférieur à celui de la souche CB15-pMR. La taille de leur halo est en réalité plus proche de souches PleC-défective que de la souche sauvage. Il semble donc que la complémentation n'est que partielle lorsque *pleC* est exprimé à partir du pMR20. Une fois de plus, l'absence de l'environnement génomique de *pleC*, couplée au faible nombre de copies du pMR20, pourrait être à l'origine de ce problème.

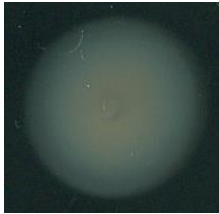
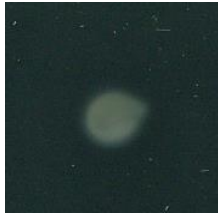
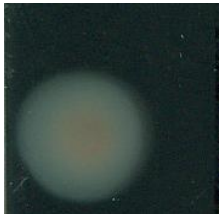

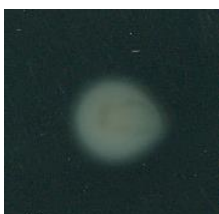
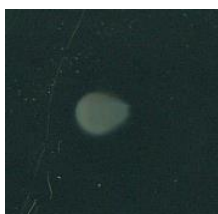

<i>Halo bactérien</i>	<i>Souches</i>	<i>Halo bactérien</i>	<i>Souches</i>
	CB15N		Δ -pMR(K+P+)
	CB15		Δ -pMR(K-P-)
	CB15-pMR		Δ -pMR(K-P+)
	Δ -pMR		

Figure 16 – Tests de mobilité sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Un halo bactérien par souche est présenté. Les souches CB15N et CB15 ont été testées sans pression d'antibiotique.

3. Les mutants K-P- et K-P+ ont une capacité d'attachement différente par rapport à la souche « sauvage » CB15-pMR

Si des souches de *C. crescentus* sont capables d'adhérer de manière irréversible à un substrat, cela signifie qu'elles complètent le SwaPS. Il est proposé dans la littérature (Paul et al., 2008) que le phénotype d'attachement est en partie favorisé par l'activité kinase de PleC. Le test d'attachement a pour but d'estimer l'adhérence moyenne de différentes souches.

L'attachement relatif de la souche sauvage CB15 est ramené à l'unité pour qu'il puisse être facilement comparable (**Fig. 17**). L'analyse statistique (test de Mann-Whitney) comparant les moyennes entre-elles montre que l'attachement de CB15 est (très) significativement différent de celui des souches CB15-pMR et Δ -pMR(K+P+), résultant d'un retard de croissance (données non montrées), certainement dû à la présence d'un plasmide et d'un antibiotique dans le milieu de culture. Par ailleurs, l'attachement de la souche CB15-pMR est significativement supérieur à celui de la souche Δ -pMR(K+P+), probablement dû à la sous-expression de *pleC* exprimé à partir d'un pMR20. Une fois de plus, nous sommes suspicieux quant à l'efficacité du pMR20 comme vecteur d'expression pour *pleC*. Cependant, cette large différence statistique entre CB15, CB15-pMR et Δ -pMR(K+P+) n'est pas intéressante au vu des différences proportionnelles avec les autres souches. Il semble donc que la complémentation phénotypique par expression extra-génomique de *pleC* est satisfaisante en terme d'attachement. Les souches supposées ne pas attacher (CB15 Δ *pleC*, Δ -pMR et Δ -pMR(K-P-)) puisque dépourvues de PleC (ou du moins d'une version fonctionnelle de la protéine), exhibent un attachement réduit statistiquement comparable entre elles. Le mutant Δ -pMR(K-P+) est quant à lui capable de restaurer partiellement le phénotype d'attachement (> 50%), étant en plus très significativement différent de toutes les autres souches. Cette observation confirme des résultats publiés précédemment (Paul et al., 2008) et suppose le rôle de PleC_K dans l'adhérence de *C. crescentus* par activation de la diguanylate cyclase PleD.

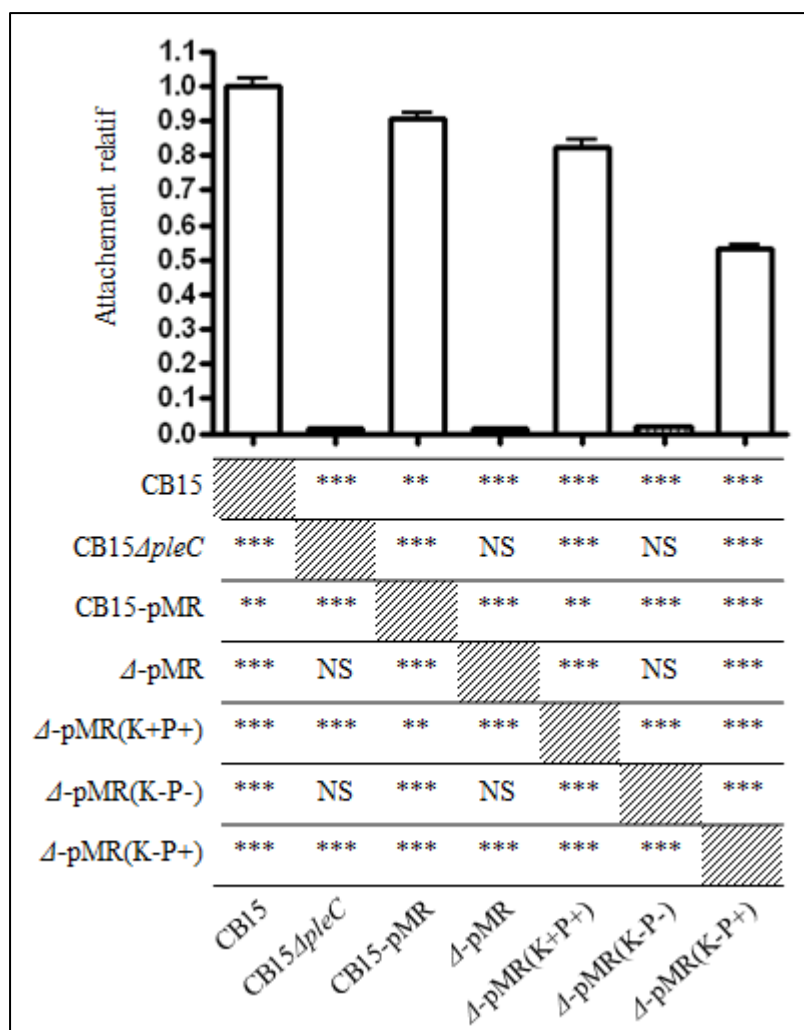


Figure 17 – Test d’attachement sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Les barres représentent l’écart-type. La différence entre deux moyennes (test de Mann-Whitney) peut être non significative (NS), significative (* si $\alpha = 0,05$; ** si $\alpha = 0,01$) ou très significative (***) si $\alpha = 0,001$). Les valeurs obtenues pour chaque condition sont rapportées à la moyenne générale des absorbances de la souche CB15.

Au vu de la littérature et de ce que nous avons confirmé expérimentalement jusqu’ici, l’activité phosphatase de PleC semble être impliquée dans les étapes précoces du SwaPS alors que l’activité kinase semble jouer un rôle prépondérant dans les étapes plus tardives du programme développemental (Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008). C’est la raison pour laquelle notre crible génétique se déroulera en deux étapes après mutagenèse aléatoire de *pplC-pleC*. Premièrement, une sélection des clones résistants au bactériophage CbK nous permettra d’isoler les mutants K-P- et K+P- de PleC puisque les vecteurs pMR20-pplC-pleC* (* pour mutation(s) aléatoire(s)) auront été électroporés dans une souche CB15 Δ pleC. Dans un second temps, les mutants K+P- seront discriminés des mutants K-P- par un test d’attachement, puisqu’il est suggéré que PleC_K joue un rôle dans l’adhérence de la bactérie (Paul et al., 2008).

Suite à nos résultats préliminaires concernant la caractérisation des mutants de PleC exprimés sur un pMR20, notre stratégie a été quelque peu modifiée. En effet, le fragment *pplC-pleC* a été exprimé à partir d'un plasmide à nombre de copies moyen ; le pJS14, notamment utilisé par l'équipe de C. Jacobs-Wagner. Dans le cadre de la première partie de ce mémoire, ce vecteur avait été abandonné car il induit une différence morphologique chez *C. crescentus*. C'est donc la version de *pplC-pleC* exprimée à partir d'un pJS14 qui sera aléatoirement mutée dans la souche *Escherichia coli* XL1-red, connue pour son haut pouvoir mutagène (Agilent Technologies). Enfin, il est à noter que la mutagenèse aléatoire et la première étape du crible (à savoir la sélection en présence de phages CbK) avaient déjà été effectuées avec le pMR20-*pplC-pleC* mais n'avaient pas été concluantes (données non montrées).

III. Constructions des souches contrôles exprimant les différents mutants *pleC* sur un plasmide à nombre de copies moyen

Tout comme pour les constructions effectuées dans le pMR20, les différents mutants de PleC (K-P-, K-P+ et K+P+) ont été intégrés dans un pJS14 sous le contrôle de leur promoteur hypothétique *pplC*. Les fragments de *pplC-pleC* (K-P-, K-P+ et K+P+), amplifiés par PCR à partir du pMR20-*pplC-pleC*_{H610A, F778L} et WT et digérés par les enzymes de restriction SpeI et HindIII ont été clonés dans le MCS (*Multiple Cloning Site*) du pJS14 préalablement digéré par les mêmes enzymes. Ils ont ensuite été chacun transformés dans un background génétique dépourvu de *pleC* (CB15 Δ *pleC*). Les abréviations suivantes seront désormais utilisées ; Δ -pJS(K-P-), Δ -pJS(K-P+), Δ -pJS(K+P+), CB15-pJS et Δ -pJS, correspondant respectivement aux souches CB15 Δ *pleC*-pJS14-*pplC-pleC*_{H610A}, CB15 Δ *pleC*-pJS14-*pplC-pleC*_{F778L}, CB15 Δ *pleC*-pJS14-*pplC-pleC*_{WT}, CB15-pJS14 et CB15 Δ *pleC*-pJS14.

IV. Caractérisation des différentes souches contrôles (pJS14)

1. La souche Δ -pJS(K-P-) est sensible aux phages CbK

Les souches CB15, CB15-pJS, Δ -pJS(K+P+) et Δ -pJS(K-P+) sont toutes sensibles aux phages CbK (**Fig. 18**). Ce résultat est en accord avec ce qui était attendu puisque ces souches sont toutes censées initier le SwaPS et donc former des pili (Matroule et al., 2004). De manière étonnante, et contrairement aux souches Δ -pJS et Δ -pMR(K-P-), la souche Δ -pJS(K-P-) est également sensible aux phages CbK. Ayant une version non-fonctionnelle de PleC, cette souche est pourtant censée ne pas produire de pili car elle est bloquée dans l'initiation d'une des étapes les plus précoces du programme développemental spécifique de la cellule flagellée. Le triplicat biologique ne permet pas de douter de cette donnée. La souche, bien que vérifiée par séquençage, PCR et restriction diagnostiques, montre un phénotype inattendu et inexplicable.

Par ailleurs, le mutant Δ -pJS(K-P+) montre une sensibilité complète aux phages CbK, contrairement à ce qui a été observé lorsque *pleC_{F778L}* était exprimé à partir d'un pMR20 (Fig. 15). Nous estimons donc que le pJS14, étant un vecteur à nombre de copies moyen, est capable de compenser l'absence des éléments régulateurs nécessaires à l'expression endogène de *pleC*.


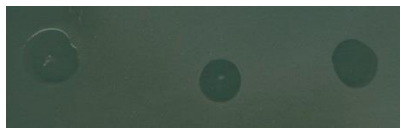

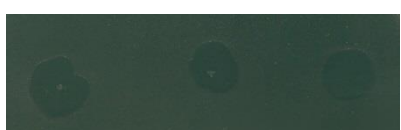
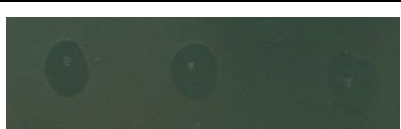
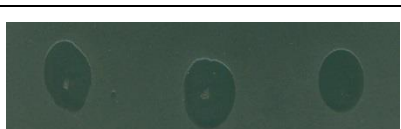
<i>Tests de résistance aux ΦCbK</i>	<i>Souches</i>	<i>Résistance aux ΦCbK ?</i>
	CB15	✗
	CB15-pJS	✗
	Δ -pJS	✓
	Δ -pJS(K+P+)	✗
	Δ -pJS(K-P-)	✗
	Δ -pJS(K-P+)	✗

Figure 18 – Effet létal ou non des phages CbK sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Les souches sensibles (✗), résistantes (✓) révèlent (ou non) des plaques de lyse.

2. La souche Δ -pJS(K-P-) apparaît plus mobile qu'attendu

Le halo formé par la souche CB15-pJS est visiblement supérieur à celui de la souche Δ -pJS(K+P+), censée compléter le background Δ *pleC* (Fig. 19). Il a été observé que la souche Δ -pJS(K+P+) présente un retard de croissance (donnée non quantifiée) qui pourrait s'expliquer par la surexpression de *pleC*. En effet, certains éléments indiquent une possible absence de PleC (du moins partielle) pendant la phase S du cycle cellulaire (Chen et al., 2005; Viollier et al., 2002). La surabondance de PleC pourrait contrecarrer cette déficience et perturber le contrôle du développement.

Ensuite, on pourrait s'attendre à ce que le mutant K-P+ (ayant un flagelle fonctionnel) restaure lui aussi la mobilité. La halo de la souche Δ -pJS(K-P+) est inférieur à celui de la souche Δ -pJS(K+P+), certainement dû au fait de l'absence de l'activité kinase de PleC qui, même si elle n'a pas un rôle direct sur la mobilité du flagelle, perturbe très certainement le développement tout entier. Cette interprétation est d'autant plus vraie si l'on considère le modèle de la régulation allostérique où le pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle exhibe un PleC_K. Parallèlement à cela, la souche Δ -pJS(K-P-) forme, de manière inattendue, un halo, contrairement aux souches Δ -pJS et Δ -pMR(K-P-). L'explication est dans ce cas très difficile à trouver dans le sens où PleC est non-fonctionnel et Δ -pJS(K-P-) ne peut donc mouvoir son flagelle et n'a pas de pili (connus pour intervenir également dans la mobilité bactérienne).

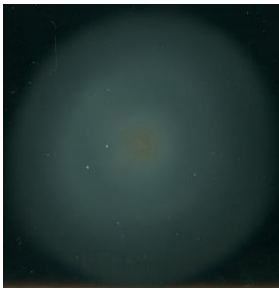
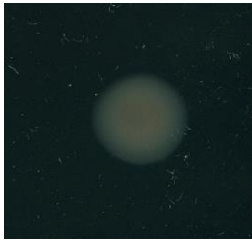
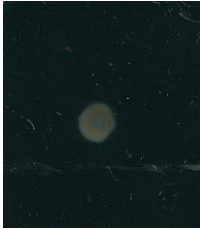
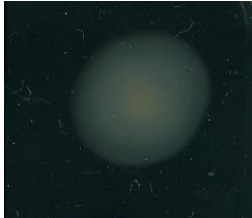
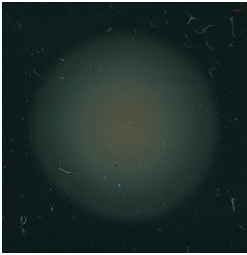
<i>Halo bactérien</i>	<i>Souches</i>	<i>Halo bactérien</i>	<i>Souches</i>
	CB15-pJS		Δ -pJS(K-P-)
	Δ -pJS		Δ -pJS(K-P+)
	Δ -pJS(K+P+)		

Figure 19 – Tests de mobilité sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Un halo bactérien par souche est présenté. L'échelle est respectée pour chaque image mais n'est pas la même que pour la figure 16.

3. Le mutant Δ -pJS(K+P+) a une capacité d'attachement supérieure à ce qui a déjà été observé mais confirme le rôle supposé de PleC_K dans l'adhérence de *Caulobacter crescentus*

L'attachement relatif de la souche CB15 est très significativement moindre que celui des souches CB15-pJS et Δ -pJS(K+P+), alors que celles-ci ont un attachement comparable (Fig. 20). Cela suggère que le pJS14 permet effectivement de restaurer le phénotype de PleC_{WT} mais que la surexpression de PleC induit un attachement plus important. De manière inattendue, la souche Δ -pJS(K-P-) montre une capacité d'adhérence très significativement supérieure par rapport à la souche Δ -pJS. Cette observation est la troisième concernant la souche Δ -pJS(K-P-) (après la sensibilité aux phages et la mobilité) qui n'est pas en accord avec la littérature. C'est la raison pour laquelle nous concluons que notre souche présente des problèmes phénotypiques liés à sa construction – malgré les différents contrôles effectués – et est à reconstruire. Enfin, même s'il n'existe pas de différence statistique entre les attachements de la souche sauvage CB15 et du mutant Δ -pJS(K-P+), l'adhérence relative de cette dernière est très significativement inférieure par rapport à la souche « sauvage » Δ -pJS(K+P+). Cette observation confirme, une fois de plus, le rôle supposé de l'activité kinase de PleC dans l'attachement. Nous pourrions néanmoins être craintifs par rapport à cette différence entre la souche CB15 et les souches électroporées avec un pJS14, surtout dans le cadre de notre crible où l'attachement constitue l'étape finale de sélection. Cependant, les biais observés semblent être conservés entre toutes les souches possédant un plasmide, permettant donc de les comparer. Enfin, l'attachement du mutant Δ -pJS(K-P+) est supérieur à celui observé par l'équipe d'Urs Jenal (< 50%), tandis que l'adhérence de la souche Δ -pJS(K+P+) est inférieure par rapport à cette même étude (> 200%). Nous ne savons toutefois pas avec certitude quel vecteur cette équipe a utilisé (pMR20 ou pJS14) en raison d'une incohérence dans la présentation de leurs résultats (Paul et al., 2008). Quoiqu'il en soit, nous expliquons cet attachement supérieur de la souche Δ -pJS(K+P+) par rapport à CB15 grâce à la surexpression de *pleC_K* (puisque porté par un plasmide à nombre de copies moyen) qui, à son tour, active fortement la DGC PleD, connue pour son rôle dans l'attachement (Abel et al., 2011; Paul et al., 2007; Paul et al., 2004). En conclusion, nous confirmons ici que l'activité kinase de PleC est nécessaire mais pas suffisante à l'adhérence de *Caulobacter crescentus*.

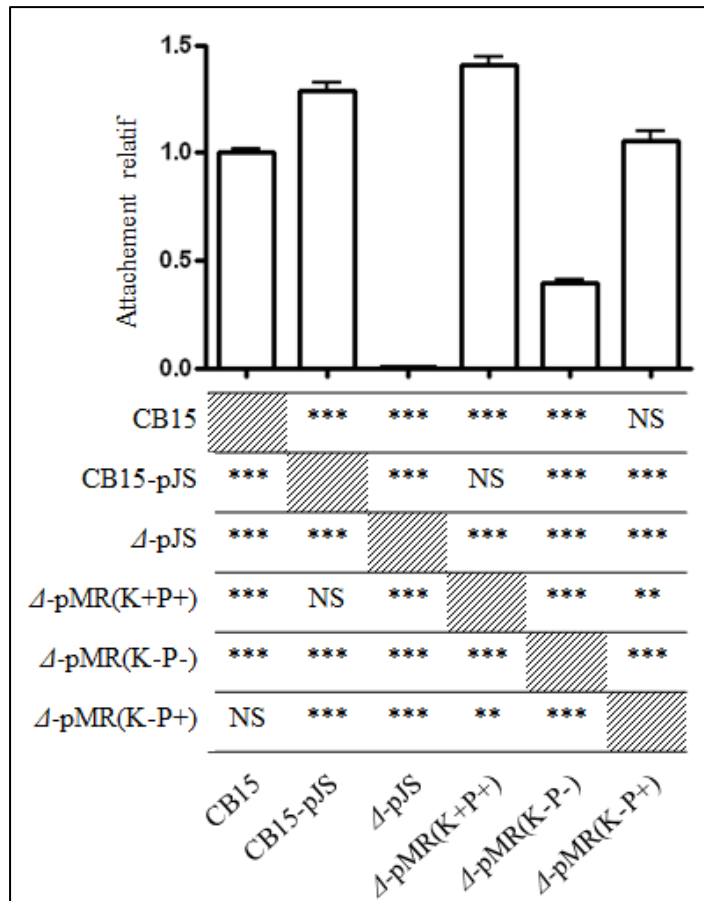


Figure 20 – Test d’attachement sur différentes souches de *Caulobacter crescentus*. Les barres représentent l’écart-type. La différence entre deux moyennes (test de Mann-Whitney) peut être non significative (NS), significative (* si $\alpha = 0,05$; ** si $\alpha = 0,01$) ou très significative (***) si $\alpha = 0,001$). L’attachement relatif de la souche Δ -pJS(K+P+) reste à confirmer en triplicat biologique. Les valeurs obtenues pour chaque condition sont rapportées à la moyenne générale des absorbances de la souche CB15.

V. Mutagenèse aléatoire de PleC et isolement du mutant K+P- par un crible génétique en deux étapes

1. Des mutants résistants aux Φ CbK et capables d’attacher ont été isolés

La capacité d’attachement (sur une surface abiotique) a été testée pour tous les clones préalablement définis comme étant résistants aux phages CbK (**Fig. 21**). Les clones dont l’attachement relatif – comparé à la souche sauvage CB15 servant de référence – était supérieur à 40% ont été sélectionnés. Le fragment *pplcC-pplcC* a été séquencé pour les sept clones concernés. De manière surprenante, aucune mutation (substitution, insertion, délétion) n’a été détectée sur ces fragments *pplcC-pplcC*. Il faut noter que la souche XL1-red d’*E. coli* – utilisée pour la mutagenèse aléatoire – est très sensible une fois sortie du congélateur à -80°C (Agilent Technologies). Cependant, cette sensibilité ne peut pas expliquer à elle seule cette absence de mutations. A titre de comparaison, nous avons séquencé quatre autres clones

issus du crible mais qui ne présentaient pas un attachement supérieur à 40%. Les résultats du séquençage ont montré qu'une mutation au maximum était présente par clone *pplC-pleC*. Dès lors, le crible en tant que tel a été remis en cause et nous suspectons que des mutations adaptatives induites par la pression de sélection (Φ CbK) soient apparues sur le chromosome et aient permis aux sept mutants testés de résister aux Φ CbK. Même si les études de ce type n'en sont qu'à leurs balbutiements, il semblerait que le taux de mutations adaptatives – c'est-à-dire de mutations ayant un impact favorable sur le fitness de l'organisme – serait supérieur à ce qui était admis jusqu'alors. Ainsi, il serait de l'ordre de 10^{-5} par génome par génération chez *E. coli* (Perfeito et al., 2007). Dans notre cas, cette/ces mutation(s) pourrai(en)t affecter des gènes tels que *pilA* (sous-unité de la piline), *cpaA* à *F* (cluster de gènes essentiels à l'assemblage des pili), *pleA* (codant pour une transglycosylase lytique impliquée dans l'assemblage des pili), etc. (Skerker and Shapiro, 2000; Viollier and Shapiro, 2003).

<i>Numéro du candidat</i>	<i>Résistance aux ΦCbK</i>	<i>Attachement relatif (%)</i>	<i>Numéro du candidat</i>	<i>Résistance aux ΦCbK</i>	<i>Attachement relatif (%)</i>
9	✓	5,1	547	✓	1,4
11	✓	5,6	550	✓	6,5
35	✓	0,9	555	✓	72,9
41	✓	1,4	557	✓	0,9
82	✓	0,9	559	✓	1,4
296	✓	2,8	561	✓	0,5
302	✓	2,3	562	✓	1,4
309	✓	1,4	568	✓	1,4
311	✓	0,5	570	✓	0,9
312	✓	0,5	576	✓	3,7
314	✓	2,8	577	✓	0,0
321	✓	1,4	583	✓	0,5
362	✓	3,3	586	✓	14,5
367	✓	0,5	590	✓	2,3
393	✓	3,3	591	✓	0,0
394	✓	4,2	595	✓	0,5
404	✓	22,0	608	✓	1,4
407	✓	7,9	609	✓	2,3

418	✓	22,9	610	✓	1,4
422	✓	0,5	619	✓	3,7
424	✓	0,9	620	✓	4,7
434	✓	0,0	630	✓	31,3
436	✓	2,8	631	✓	11,2
440	✓	1,4	633	✓	0,9
469	✓	12,6	635	✓	0,5
482	✓	110,3	636	✓	113,6
496	✓	1,4	638	✓	1,9
498	✓	1,9	639	✓	0,0
503	✓	0,5	640	✓	102,3
510	✓	0,9	641	✓	77,6
517	✓	86,4	644	✓	105,6
519	✓	3,7	649	✓	2,3
521	✓	4,7	652	✓	3,7
526	✓	25,2	654	✓	5,6
542	✓	8,4	656	✓	5,6
546	✓	4,2	659	✓	12,6

CB15	×	100
<i>ΔpleC</i>	×	2,8
<i>Nom la souche</i>	<i>Résistance aux ΦCbK</i>	<i>Attachement relatif (%)</i>

Figure 21 – Tableau reprenant tous les candidats CB15 $\Delta pleC$ -pJS14-ppleC-pleC* résistants aux phages CbK (✓). L'attachement relatif, en pourcentage, est normalisé à la valeur de la souche sauvage CB15 ramenée à 100%. La souche contrôle CB15 $\Delta pleC$ (*ΔpleC*) est sensible au phage CbK (×). Les cases grisées (■) correspondent aux sept clones résistants aux phages CbK et caractérisés par un attachement relatif supérieur à 40%.

2. La discrimination d'un mutant K+P- par test de mobilité est une nouvelle piste dans le crible génétique

L'émergence d'une/de mutation(s) adaptative(s) est le résultat d'une pression externe aussi forte que la présence de phages CbK, létaux pour la souche sauvage de *C. crescentus*. De plus, cette observation a également été réalisée dans le cadre d'un autre crible, impliquant DivK (thèse de L. Schille). C'est la raison pour laquelle la résistance aux phages CbK comme première étape du crible a été abandonnée.

L'initiation de la rotation flagellaire constitue la première étape du SwaPS. Nous avons dès lors décidé de considérer la mobilité comme première étape du crible génétique après mutagenèse aléatoire de *pplc-pleC*. En sélectionnant des colonies présentant un halo réduit, nous espérons isoler des mutants K-P- et K+P-, le caractère phosphatase-inactif de PleC étant lié à un flagelle paralysé (Wang et al., 1993).

Nous avons commencé les tests et avons isolé huit candidats (avec pJS14 comme vecteur). Après un test de mobilité classique, nous avons sélectionné quatre clones qui ne formaient effectivement pas de halo. Les premiers résultats du séquençage n'ont pas été concluants pour le clone n°4. Les clones n°5, 7 et 9 présentaient tous la même mutation, à savoir Q364X. Ces trois clones (dont le plasmide est très certainement issu de la même population clonale lorsqu'il était en *E. coli* XL1-Red) ne retiennent pas notre attention car il s'agit plus que probablement de mutants Δ -pJS(K-P-) au vu de la position du codon stop. Pour rappel, l'histidine conservée de PleC est en position 610 et est essentielle aux deux fonctions enzymatiques de l'HK (Matroule et al., 2004; Viollier et al., 2002).

VI. Une analyse *in silico* dévoile de nouvelles pistes intéressantes

1. L'alignement de séquences protéiques comparant PleC à CheX, CheZ et CrdS n'a pas été concluant

Au sein du monde bactérien, les phosphatases présentent fréquemment des domaines conservés. Nous avons procédé à une analyse comparative de la séquence protéique de PleC avec l'histidine kinase CrdS de *Myxococcus xanthus* et les protéines chémotaxiques CheX de *Borrelia burgdorferi* et CheZ d'*Escherichia coli*. Des motifs spécifiques de l'activité phosphatase ont été isolés pour chacune de ces trois enzymes.

CrdS (MXAN_5184) est une HK agissant sur le RR CrdA (Willett and Kirby, 2011). Willett et Kirby ont montré qu'un résidu conservé (Asn) en position 375 de la protéine est impliqué dans l'activité phosphatase de CrdS, sans affecter son activité kinase (Willett and Kirby, 2012). L'alignement de séquences (**Fig. 22**) a permis de corrélérer ce résidu conservé de CrdS au résidu thréonine en position 614 de PleC. Le mutant T614R de PleC a déjà été créé (Matroule et al., 2004) et exhibe un phénotype K-P-, ce qui ne nous intéresse pas dans le cadre de ce mémoire.

PleC	572	GLERSQEQLAELAR-----KYETEKVKAESANKAKSEFLANMSHELRTPLNAINGFSEIMM--NEMFGPLG	635
CrdS	326	V--KASGEVGEVLRVTFNRMTSELKATTERLMASERIAAWQEVARRLAHEIKNPLTPIRMSLETLQAAQEAKHPRF	398

Figure 22 – Alignement des séquences protéiques de PleC (*Caulobacter crescentus*) et CrdS (*Myxococcus xanthus*). L’encadré cible les résidus thréonine (T) en position 614 (PleC) et asparagine (N) en position 375 (CrdS). Le résidu histidine hautement conservé des HKs est situé quatre résidus en amont de l’encadré (Di Tommaso et al., 2011; Notredame et al., 2000; Willett and Kirby, 2012).

Chez *Borrelia burgdorferi*, CheX est une phosphatase faisant partie de la famille CXY, connue pour agir sur CheY~P. CheY~P est capable de lier le rotor flagellaire et de modifier le sens de rotation du flagelle (Sircar et al., 2013). CheX possède un motif (Glu-X-X-Asn) conservé et corrélé à son activité enzymatique (Pazy et al., 2010). Ce motif ne semble pas être conservé dans la séquence de PleC puisque le motif (E₉₆-X-X-N₉₉) de CheX devient (D₇₆₁-X-X-I₇₆₄) (**Fig. 23**). Bien que les résidus D et E soient biochimiquement très semblables (puisque’étant tous deux des acides dicarboxyliques), il ne semble pas intéressant de s’intéresser à ce « motif » chez PleC car l’asparagine et l’isoleucine n’ont pas du tout les mêmes propriétés.

PleC	745	EVRRDPFGDLIKVSVTDTGIGIAGEDLARLAKPFEQVESQFSKTTQGTGLGLALTKSLITMHDGVLEMHSTPGEQ	819
CheX	92	-----ATLIEVGNIT-----IAGNFVTTLHAKGFVFDITPPAF-IHGENMKISNKGSEA	138

Figure 23 – Alignement des séquences protéiques de PleC (*Caulobacter crescentus*) et CheX (*Borrelia burgdorferi*). L’encadré cible le motif (E₉₆-X₉₇₋₉₈-N₉₉) de CheX où X est un résidu quelconque (V et G dans ce cas). PleC exhibe, de manière parallèle, un « motif » (D₇₆₁-X₇₆₂₋₇₆₃-I₇₆₄) (Di Tommaso et al., 2011; Notredame et al., 2000; Pazy et al., 2010).

CheZ est un homologue de CheX retrouvé chez *E. coli*. Il s’agit également d’une phosphatase agissant sur CheY~P. (Asp-X-X-X-Asn) est le motif corrélé à l’activité phosphatase de CheZ est n’est que partiellement retrouvé dans PleC. Le motif (D₁₄₃-X-X-X-Q₁₄₇) de CheZ correspond, selon l’alignement, à la séquence (P₆₃₃-X-X-X-Q₆₃₇) chez PleC (**Fig. 24**) (Pazy et al., 2010; Willett and Kirby, 2012). De manière intéressante, le résidu glutamine est conservé entre les deux protéines. Cependant, alors que la proline est un acide aminé polaire, l’asparagine ne l’est pas, reléguant l’intérêt de ce motif au second plan.

PleC	600	AKSEFLANMSHELRTPLNAINGFSEIMMNMFGPLGDORYKGYSDIHSSGQHLALINDILDMSKI EAGKMNLK	674
CheZ	113	DTRQFLADVPAHT-SFTNA--QLLEIMMAQDFQDLTGQVIKRMMDVIQEIERQLLM-----	165

Figure 24 – Alignement des séquences protéiques de PleC (*Caulobacter crescentus*) et CheZ (*Escherichia coli*). L’encadré cible le motif (D₁₄₃-X₁₄₄₋₁₄₅₋₁₄₆-Q₁₄₇) de CheZ où X est un résidu quelconque (L, T et G dans ce cas). De ce motif, PleC possède le résidu glutamine conservé en position 637 (Di Tommaso et al., 2011; Notredame et al., 2000; Pazy et al., 2010; Willett and Kirby, 2012).

2. La comparaison bioinformatique avec l’histidine kinase EnvZ : une piste à exploiter

L’analyse *in silico* menée par l’équipe de C. Jacobs-Wagner était basée sur l’HK EnvZ d’*E. coli*. EnvZ œuvre comme un osmosenseur pour la bactérie et agit sur le RR OmpR qui, à son tour, régule l’expression de gènes codant pour des porines (Zhu et al., 2000). C’est à partir de la dissection de l’activité d’EnvZ que différents mutants de PleC ont pu être caractérisés (**Fig. 25**) (Matroule et al., 2004).

<u>EnvZ</u>			<u>PleC</u>		
<i>Résidu de la protéine</i>	<i>Substitution opérée</i>	<i>Phénotype résultant</i>	<i>Résidu correspondant</i>	<i>Substitution opérée</i>	<i>Phénotype résultant</i>
H243 His conservée	H243V	K-P-	H610 His conservée	H610A	K-P-
F390	F390L	K+P-	F778	F778L	K-P+
T247	T247R	K+P-	T614	T614R	K-P-
S242	S242D	K+P-	S609	S609D	K-P+/-

Figure 25 – Résidus d’acides aminés conservés entre EnvZ et PleC. Différentes substitutions ont été introduites dans PleC, corrélées aux données fournies par EnvZ. Ces différentes substitutions affectent soit l’activité kinase (K-P+), soit l’activité phosphatase (K+P-), soit les deux à la fois (K-P-). Le phénotype P+/- fait référence à une perte partielle de l’activité de l’activité phosphatase (Hsing and Silhavy, 1997; Matroule et al., 2004).

De manière surprenante, des résidus d’acide aminé conservés entre les deux histidine kinases semblent jouer un rôle différent dans l’/les activité(s) catalytique(s) de PleC et EnvZ. En effet, là où les mutations F390L, T247R et S242D d’EnvZ génèrent un mutant K+P-, les mêmes mutations sur PleC n’aboutissent pas au même phénotype.

Cependant, d’autres mutations caractérisées sur EnvZ et donnant lieu à une activité kinase-active / phosphatase-inactive (revu dans (Tomomori et al., 1999) n’ont pas été testées par l’équipe de C. Jacobs-Wagner. Nous ne nous attarderons ici qu’aux résidus parfaitement

conservés entre EnvZ et PleC (**Fig. 26**). Les substitutions L23R, P248K, N343K et T402K, ainsi que la délétion du résidu A239 ont aboli l'activité phosphatase d'EnvZ, sans en affecter l'activité kinase (Hsing et al., 1998; Hsing and Silhavy, 1997; Tomomori et al., 1999; Zhu et al., 2000). C'est exactement le type de mutant que nous recherchons pour PleC. Selon l'alignement, les correspondances de ces résidus sont respectivement L41, P615, N721, T792 et A606 sur PleC. Nous avons donc mis à jour cinq nouvelles mutations potentiellement intéressantes pour obtenir un mutant K+P- de PleC.

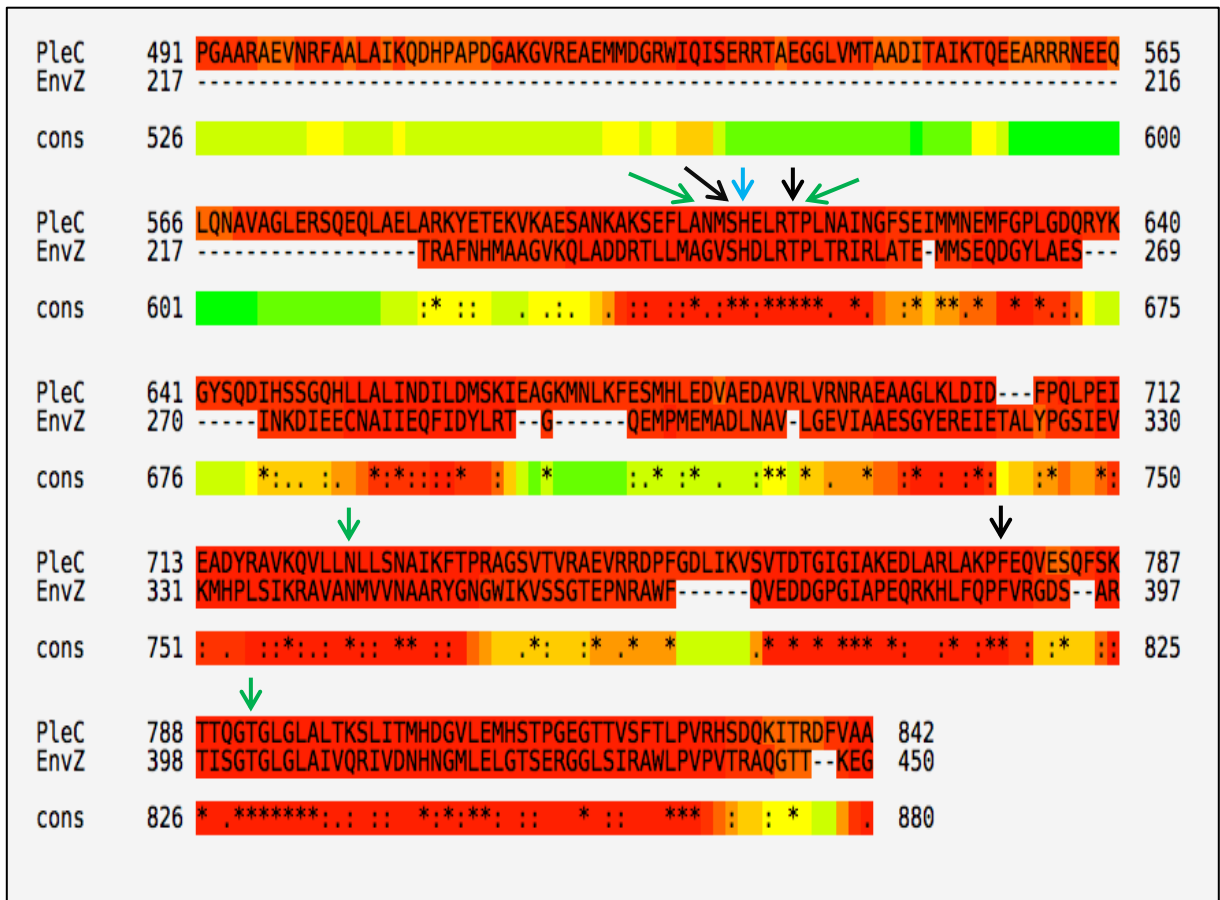


Figure 26 – Alignement des séquences protéiques de PleC (*Caulobacter crescentus*) et EnvZ (*Escherichia coli*). La **flèche bleue** indique le résidu histidine conservé (H610 et H243). Les **flèches noires** correspondent aux autres résidus déjà mutés dans PleC sur base des informations fournies par l'analyse d'EnvZ (voir figure 25). Les **flèches vertes** pointent les résidus susceptibles d'être mutés ou délétés pour obtenir un mutant K+P- de PleC (P615, N721, T792, A606 [et L41]). Les lignes nommées **cons** correspondent à l'indice CORE (*Consistency of the Overall Residue Evaluation*) qui évalue la fiabilité de l'alignement (plus la couleur est foncée, plus la fiabilité dans l'alignement est grande). Les astérisques (*) pointent deux résidus identiques, là où les points (. et :) indiquent une homologie plus ou moins forte des résidus (Di Tommaso et al., 2011; Hsing et al., 1998; Hsing and Silhavy, 1997; Matroule et al., 2004; Notredame et al., 2000; Tomomori et al., 1999; Zhu et al., 2000).

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

La division cellulaire asymétrique est un mécanisme conservé dans de nombreuses branches phylogénétiques pourtant relativement éloignées (revu dans (Li, 2013). L'Homme (*Homo sapiens*), la levure bourgeonnante (*Saccharomyces cerevisiae*), le bacille du charbon (*Bacillus anthracis*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou l'Arabette des Dames (*Arabidopsis thaliana*) sont autant d'espèces qui témoignent de cette asymétrie fonctionnelle et/ou morphologique. Grâce à un réseau moléculaire très complexe, *Caulobacter crescentus* est, elle aussi, capable de se différencier asymétriquement et est de ce fait particulièrement bien adaptée à son environnement (revu dans (Curtis and Brun, 2010). Au cœur du programme développemental de cette α -protéobactérie, se trouve le *master regulator* CtrA qui contrôle l'expression d'au moins cent gènes (voir Introduction) et dont l'activation par phosphorylation est indirectement corrélée à l'activité de l'histidine kinase PleC. Cependant, le timing précis des deux activités de PleC (kinase et phosphatase) au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus* reste à déterminer. Actuellement, deux modèles antagonistes tentent d'expliquer la coordination des activités de cette histidine kinase (Matroule et al., 2004; Paul et al., 2008). Le but de ce mémoire était de confirmer ou d'infirmer ces modèles par la création et la caractérisation d'un mutant kinase-active / phosphatase-inactive de PleC. En effet, avec les mutants K-P- et K-P+ déjà caractérisés, ce mutant K+P- aurait permis l'étude approfondie du rôle de chacune des activités dans le cadre du développement de la Caulobactériale. Malgré nos efforts, la création du mutant K+P- de PleC n'a pas abouti mais des éléments intéressants ont cependant pu être dégagés.

1. Des stratégies parallèles à l'approche présentée dans ce mémoire constituent des perspectives intéressantes

En ce qui concerne la mutagenèse aléatoire de PleC, une méthode sans *a priori* autre que la transformation en *E. coli* XL1-Red pourrait être envisagée. Par exemple, la PCR mutagène est un outil largement utilisé pour créer des mutations dans une séquence nucléotidique. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons testé et modifié un protocole de PCR mutagène dont les conditions expérimentales induisent l'ADN polymérase en erreur (voir Matériels & Méthodes). Ce type de PCR mutagène n'a pas été concluant pour *pleC*, sans doute dû à sa taille (> 2500 pb), trop importante pour ce type de protocole. Cependant, il existe des kits commerciaux (Clontech, Stratagene) qui jouent sur les concentrations en sels et/ou en dNTPs, sur les temps d'hybridation et d'élongation, etc. Nous pourrions nous baser sur ces informations pour améliorer le protocole de base et l'accorder à un gène de la taille de *pleC*. Par ailleurs, l'utilisation de facteurs physiques tels que les UVs (Gopinath et al., 2009) ou de facteurs chimiques (EMS, acide nitreux, etc.) (Encell et al., 1998; Lai et al., 2004) connus pour leur pouvoir mutagène pourrait également être envisagée. A ces méthodes sans *a priori* peuvent s'ajouter les résultats de notre analyse bioinformatique proposant les mutations suivantes pour obtenir un mutant K+P- de PleC ; L41R, P615K, N721K, T792K et Δ A606.

Ensuite, il s'avère qu'un crible incluant une pression de sélection trop forte n'est pas opportun car l'apparition de mutations spontanées biaise la sélection du phénotype recherché. C'est la raison pour laquelle la sélection par résistance aux phages CbK a été abandonnée au profit d'un crible basé sur la mobilité de candidats aléatoirement mutés. Ce

crible en deux étapes [(i) test de mobilité, (ii) test d'attachement] reste largement à exploiter puisque nous n'avons fait qu'initier cette nouvelle stratégie durant ce mémoire.

Enfin, il convient de rappeler que la deuxième étape de notre crible est basée sur la conclusion suivante ; l'activité kinase de PleC serait impliquée dans la capacité d'attachement de *C. crescentus* (Paul et al., 2008). Cependant, il ne faut pas oublier que le mutant K+P- recherché n'est pas censé synthétiser de pili (puisque les étapes précoces du SwaPS seraient inhibées par inactivation de PleC_P). Or, ces appendices sont connus pour initier l'attachement, du moins dans sa phase réversible (Li et al., 2012). Un mutant K+P- serait-il dès lors capable d'attacher ? La réponse tient dans le phénotype d'un mutant *ΔpilA* (PilA étant la sous-unité structurelle des pili chez *C. crescentus*) qui, bien que l'initiation de l'attachement soit fortement réduite, est capable d'attacher. Un mutant K+P- de PleC devrait donc bel et bien être capable d'attacher.

2. Un mutant K+P- est-il réellement envisageable ?

Il convient d'argumenter pourquoi nous pensons qu'il serait possible d'isoler un mutant K+P- de PleC. En premier lieu, un mutant délété pour *pleC* est viable chez *Caulobacter crescentus* (Hecht et al., 1995), signifiant qu'aucune des deux activités n'est essentielle à la survie de la bactérie. Par ailleurs, le mutant K-P+ a prouvé que le découplage des activités enzymatiques est possible. Cependant, nous pourrions imaginer que tous les domaines impliqués dans l'activité phosphatase de PleC sont également essentiels à l'activité kinase de l'HK. Cela signifierait que dès qu'une mutation affecte l'activité phosphatase (P-), l'activité kinase est également touchée (K-). Autrement dit, seuls des mutants K-P- et K-P+ seraient possibles. Cependant, au vu de notre analyse *in silico* et de la structure globale des HKs bactériennes, cette hypothèse est peu plausible (Capra and Laub, 2012; Zhu et al., 2000).

3. PleC_P et PleC_K jouent un rôle différent dans la morphogénèse de *Caulobacter crescentus*

Grâce à la caractérisation des mutants K-P+ et K-P- de PleC, nous avons pu confirmer que l'activité phosphatase de l'HK est principalement impliquée dans les étapes précoces du SwaPS, c'est-à-dire la synthèse des pili et la fonctionnalité du flagelle, tandis que l'activité kinase semble nécessaire mais pas suffisante pour l'adhérence de *Caulobacter crescentus*. La confirmation la plus intéressante passerait pas une construction au locus de ces différents mutants. Nous avons commencé les constructions dans ce sens (voir Matériels & Méthodes) mais attendions d'obtenir le mutant K+P- pour les finaliser. Ces constructions constituent une suite essentielle à ce mémoire.

4. Le débat n'est pas fini ; modèles du *pole-to-pole shuttling* et de la régulation allostérique

Pour rappel, la différence majeure qui oppose les deux modèles réside dans l'activité enzymatique de PleC au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle (voir Introduction, Figure 13). Le modèle du *pole-to-pole shuttling* suggère que PleC exhiberait une activité phosphatase provoquant un « décrochage » de DivK du pôle flagellé, compensé par l'activité kinase de DivJ. Lors de la cytokinèse, lorsqu'une barrière physique sépare ces deux activités enzymatiques antagonistes, l'absence de DivK polaire permettrait l'initiation du SwaPS dans la nouvelle cellule flagellée (Matroule et al., 2004).

Le modèle d'U. Jenal (Paul et al., 2008) ne fait pas référence à ce *shuttling* de DivK(~P). En effet, seule la localisation bipolaire de DivK~P leur permet d'avancer que PleC exhiberait son activité kinase au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle, DivK~P agissant comme un activateur allostérique sur l'activité kinase de DivJ et PleC. La faiblesse de ce modèle réside dans le manque d'arguments qui expliquent le changement d'activité de PleC après cytokinèse. L'équipe d'U. Jenal explique qu'avec la séparation des deux cellules filles, la « pression » provoquée par DivJ (en phosphorylant DivK) sur PleC disparaîtrait. Ils ajoutent à cela que l'activité phosphatase « résiduelle » reprendrait le dessus, permettant le changement d'activité de PleC_K à PleC_P. Parallèlement à cela, leurs observations *in vitro* et *in vivo* concernant DivK confirment que celui-ci agit comme un activateur allostérique des activités kinases de PleC et DivJ. Cette régulation prouvée apporte de sérieuses preuves en faveur du modèle d'U. Jenal. Le mutant K+P- aurait permis de confirmer ou d'infirmer définitivement ce modèle. De plus, cette boucle d'activation liant DivJ et PleC par l'intermédiaire de DivK(~P) a l'avantage d'expliquer la biogenèse du pédoncule (voir Introduction III.5.b pour rappel). Enfin, l'équipe de J. Tyson (Subramanian et al., 2013) a pu confirmer cette hypothèse par une analyse *in silico* basée sur une modélisation mathématique.

Malgré les divergences existantes, les deux modèles convergent vers une même conclusion, confirmée *in silico* par l'étude de Tyson (Subramanian et al., 2013) ; c'est l'histidine kinase DivJ qui, par l'intermédiaire de DivK(~P), agit sur l'activité de PleC et donc, de manière plus générale, sur la réponse morphologique de *Caulobacter crescentus*. Cette conclusion nous ramène à des considérations environnementales, à savoir le signal qui active ce TCS. En effet, tout au long de ce mémoire, nous avons évoqué l'interactome impliqué dans le cycle cellulaire de cette espèce modèle, sans nous attarder au signal le plus fondamental qui active le système PleC/DivK/DivJ. Sachant que le domaine senseur de PleC n'est pas essentiel à sa fonction (Hecht et al., 1995) et partant du principe selon lequel la phase G₁ a tendance à être allongée en conditions oligotrophes (Boutte and Crosson, 2013; Boutte et al., 2012), le scénario suivant, bien que très simplifié, est tentant ; dans un milieu pauvre, la cellule flagellée de *C. crescentus* n'a aucun intérêt à se sédentariser. Elle interprète donc des signaux de carence et inhibe sa transition G₁ → S. Cela signifie que DivJ ne localise pas au pôle et que donc, en tant que potentielle « *starter kinase* » du système PleC/DivK/DivJ, n'agit pas sur la voie CckA/ChpT qui favorise la continuité de la phase G₁.

5. Conclusion générale

Les pistes dégagées lors de ce mémoire permettent des perspectives à plus ou moins long terme afin d'investiguer la coordination catalytique de PleC au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Cette histidine kinase conservée chez de nombreuses α -protéobactéries (Brilli et al., 2010) joue un rôle certain dans la morphogenèse de l'organisme modèle *Caulobacter crescentus*, bien que la coordination de son activité ne soit pas encore très claire. La littérature de ces dernières années tend à favoriser l'hypothèse de la régulation allostérique menée par DivK. Il est à noter que si effectivement PleC_K est caractéristique de la cellule prédivisionnelle, cela signifie qu'au minimum deux kinases agissent sur DivK en même temps (PleC_K et DivJ), réduisant considérablement la concentration de DivK non phosphorylé. Cette omniprésence de DivK~P bloquerait donc fortement la phosphorylation de CtrA (voir figure 12), événement logique dans la cellule prédivisionnelle qui ne doit surtout pas ré-entamer un nouveau cycle de réplication du chromosome (revu dans (Skerker and Laub, 2004)). L'hypothèse du *pole-to-pole shuttling* reste néanmoins séduisante dans le sens où l'activité de PleC est directement corrélée au SwaPS. Cependant, ce modèle propose peut-être une conclusion trop hâtive en voulant unir une activité catalytique de PleC et le développement non-cyclique de *Caulobacter crescentus*. Quoiqu'il en soit, l'étude de la coordination des activités de PleC reste une question ouverte.

MATÉRIELS
&
MÉTHODES

Matériels

1. Souches utilisées

<i>Souches</i>	<i>Caractéristique(s) majeure(s)</i>	<i>Références</i>
<u>C. crescentus</u>		
CB15	Souche sauvage de <i>Caulobacter crescentus</i>	(Poindexter, 1964)
CB15N	Variant synchronisable de la souche CB15	(Evinger and Agabian, 1977)
CB15 $\Delta pleC$	Souche sauvage délétée pour le gène <i>pleC</i>	L. Schille
Δ -pMR	CB15 $\Delta pleC$ -pMR20	O. Finet
Δ -pJS	CB15 $\Delta pleC$ -pJS14	O. Finet
CB15-pMR	CB15-pMR20	O. Finet
CB15-pJS	CB15-pJS14	O. Finet
Δ -pMR(K+P+)	CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-ppleC-pleC _{WT}	O. Finet
Δ -pMR(K-P-)	CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-ppleC-pleC _{H610A}	O. Finet
Δ -pMR(K-P+)	CB15 $\Delta pleC$ -pMR20-ppleC-pleC _{F778L}	O. Finet
Δ -pJS(K+P+)	CB15 $\Delta pleC$ -pJS14-ppleC-pleC _{WT}	O. Finet
Δ -pJS(K-P-)	CB15 $\Delta pleC$ -pJS14-ppleC-pleC _{H610A}	O. Finet
Δ -pJS(K-P+)	CB15 $\Delta pleC$ -pJS14-ppleC-pleC _{F778L}	O. Finet
<u>E. coli</u>		
DH5 α	Souche d'expression au génotype (<i>recA1</i> $\Delta lacZ$)	Invitrogen
DH10B	Souche d'expression au génotype (F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara leu)$ 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ^-)	GibcoBRL
XL1-Red	<i>mutD5</i> <i>mutS</i> <i>mutT</i> Tn10 (Tet)	Agilent Technologies

2. Plasmides utilisés

<i>Plasmides</i>	<i>Caractéristique(s) majeure(s)</i>	<i>Références</i>
pBluescript II SK	Vecteur de clonage répliatif portant une cassette de résistance à l'ampicilline	Stratagene
pMR20	Vecteur répliatif à faible nombre de copies portant une cassette de résistance à l'oxytétracycline	(Roberts et al., 1996)
pJS14	Vecteur répliatif à nombre de copies moyen portant une cassette de résistance au chloramphénicol	J. Skerker
pMR20-ppleC-pleC _{WT}	Vecteur pMR20 portant le gene <i>pleC</i> et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet
pMR20-ppleC-pleC _{H610A}	Vecteur pMR20 portant le gene <i>pleC</i> (mutation H610A) et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet
pMR20-ppleC-pleC _{F778L}	Vecteur pMR20 portant le gene <i>pleC</i> (mutation F778L) et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet
pJS14-ppleC-pleC _{WT}	Vecteur pJS14 portant le gene <i>pleC</i> et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet
pJS14-ppleC-pleC _{H610A}	Vecteur pJS14 portant le gene <i>pleC</i> (mutation H610A) et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet
pJS14-ppleC-pleC _{F778L}	Vecteur pJS14 portant le gene <i>pleC</i> (mutation F778L) et son promoteur hypothétique <i>ppleC</i> dans l'orientation inverse au <i>pLac</i>	O. Finet

3. Milieux de culture bactériens

a. *Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* ont toutes été cultivées en milieu riche Luria-Bertani (LB) à 37°C, additionné si nécessaire d'ampicilline 100 µg/ml, d'acide nalixidique 15 µg/ml, de chloramphénicol 20 µg/ml ou d'oxytétracycline 20 µg/ml.

Pour 1 L de LB :

<i>Produits solides</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Hydrolysate de caséine (peptone)	10
NaCl	5
Yeast Extract	5
Agar (si milieu solide)	5

Mettre à volume avec de l'eau désionisée

b. *Caulobacter crescentus*

Les souches de *C. crescentus* ont toutes été cultivées en milieu riche Peptone Yeast Extract (PYE) (Poindexter, 1964) à 30°C, additionné si nécessaire de chloramphénicol 2 µg/ml ou d'oxytétracycline 20 µg/ml. La souche CB15(N) est naturellement résistante à l'ampicilline et à l'acide nalidixique.

Pour 1 L de PYE :

<i>Produits solides</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Bacto Peptone	2
Yeast Extract	1
Agar (si milieu solide)	15
Agar (si Top Agar)	3
Agar (si Swarmer Agar)	2,5
<i>Produits liquides</i>	<i>Quantité</i>
MgSO ₄ 1 M	1 ml
CaCl ₂ 1M	500 µl
H ₂ O désionisée	998,5 ml

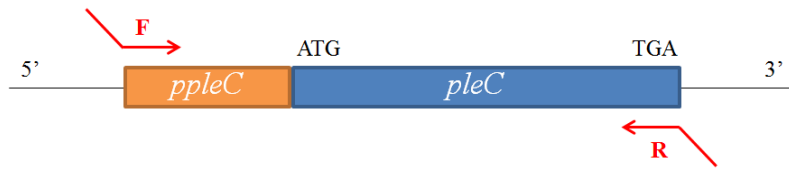
c. *Stérilisation des milieux*

Les milieux LB et PYE sont autoclavés 20 minutes à 120°C sous une pression de 20 bars.

4. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les PCR

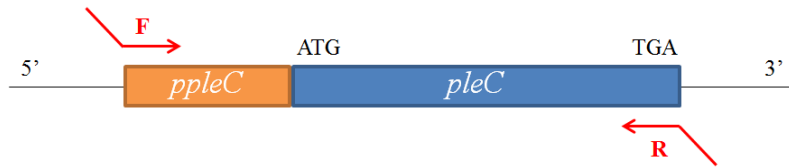
Dans la section suivante, *ppeC* correspond aux 586 pb en amont de l'ATG du gène *pleC* alors que *pleC_{amont}* et *pleC_{aval}* correspondent respectivement à 500 pb en amont et en aval de la CDS.

a. Clonage de l'insert du pSK au pMR20



<i>Amorces</i>	<i>Séquence nucléotidique</i>	<i>Site de restriction</i>
F(oward)	5'- TCTAGATCGAGAGCTTCCACCATGCCTGGC - 3'	XbaI
R(everse)	5'- GGTACCTCAGGCCGCCACGAAGTCGCGAGTG -3'	KpnI

b. Clonage de l'insert du pMR20 au pJS14



<i>Amorces</i>	<i>Séquence nucléotidique</i>	<i>Site de restriction</i>
F(oward)	5'- ACTAGTTCGAGAGCTTCCACCATGCCTGGCG -3'	SpeI
R(everse)	5'- AAGCTTTCAGGCCGCCACGAAGTCGCGAGTG -3'	HindIII

c. Amorces utilisées pour les remplacements alléliques



<i>Amorces</i>	<i>Séquence nucléotidique</i>	<i>Site de restriction</i>
A (forward)	5'- GCGGCCGCGGGCCCTGCGCT GGAACGCGTAATCGCCCTG-3'	NotI <i>ApaI</i>
B (forward)	5'- TCTAGAATGGGCAGACACGGGGGGCCGGCGG -3'	XbaI
C (forward)	5'- GGTACCGGCGAGACCTTCCCTGGGGCGGCCT -3'	KpnI
X (reverse)	5'- TCTAGAGCCCTTGCTCAACGCGCCCGACTCC -3'	XbaI
Y (reverse)	5'- GGTACCTCAGGCCGCCACGAAGTCGCGAGTG -3'	KpnI
Z (reverse)	5'- AAGCTTGCGGCCTCGCACAGCAGCATCGCCT -3'	HindIII

Méthodes

1. Techniques relatives aux acides nucléiques

a. *Electrophorèse en gel d'agarose*

Principe : technique permettant la séparation de fragments d'ADN en fonction de leurs poids moléculaires. La migration de ces fragments au sein d'un gel d'agarose 1% est permise grâce à l'application d'un champ électrique. La taille des fragments peut être estimée par un marqueur de taille connue (Fermentas). L'ADN est révélé via un agent intercalant (bromure d'éthidium) visible sous rayons UVs. L'intensité de fluorescence de la bande est corrélée à la quantité d'ADN de l'échantillon.

Fabrication du gel : le gel d'agarose (1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X) préalablement dissous par la chaleur est coulé dans un support adéquat et additionné d'une solution de bromure d'éthidium 2 mg/ml. Après polymérisation du gel, les échantillons peuvent être chargés.

<i>Solution d'alourdisseur</i>	<i>Tampon TAE 50X</i>
Glycérol 50%	Tris-HCl pH 8,0 – 40 mM
EDTA 100 mM	EDTA 50 mM
SDS 1%	CH ₃ COOH glacial 57,1 ml/l
Bleu de bromophénol 0,25%	

b. *Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose*

Principe : il s'agit d'extraire du gel d'agarose un fragment d'ADN d'intérêt isolé par électrophorèse. L'ADN adhère à un filtre de silice qui ne retient pas les impuretés (agarose, bromure d'éthidium, sels, etc.). L'ADN sera finalement élué au contact d'eau désionisée.

Protocole : l'extraction a été effectuée d'après le protocole du kit Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

c. *Purification d'ADN sur colonne*

Principe : il s'agit de purifier de l'ADN (plasmides, fragments PCR) qui n'est, cette fois-ci, pas issu d'un gel d'agarose. Le principe du filtre de silice est le même que pour l'extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

Protocole : l'extraction a été effectuée d'après le protocole du kit MSB® Spin PCR Rapace (500).

d. *Restriction enzymatique*

Principe : les enzymes de restriction sont des nucléases spécifiques de séquences nucléotidiques (souvent palindromiques) qui leur sont propres. La restriction consiste donc à

« couper » dans un vecteur ou aux extrémités d'un fragment d'ADN linéaire pour créer des bouts protrudants ou francs, dont la séquence est corrélée à la restriction.

Protocole : les enzymes de restriction et leurs tampons (A, B, L, M ou H) sont fournis par Roche Molecular Biochemical. Pour un volume final de 20 µl, un mélange d'1 µl de chaque enzyme de restriction, 2 µl de Buffer 10X (tampon déterminé par le logiciel EnzymeX) et « X » µl de produit à restreindre est créé. Le tout doit être incubé 2 heures à 37°C.

e. Ligation d'un insert dans un plasmide

Principe : il s'agit d'insérer un fragment d'ADN d'intérêt (gène, promoteur, etc.) dans un plasmide qui pourra ensuite être exprimé dans un organisme. Ce plasmide doit être préalablement restreint en fonction de la restriction appliquée au fragment d'ADN.

Protocole : les fragments d'ADN sont mélangés à 1 µl de T4 DNA Ligase (Invitrogen), 2 µl de T4 DNA Ligase Buffer 5X (Invitrogen) et incubés durant une nuit à 18°C.

f. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Principe : l'amplification en chaîne par polymérase vise à amplifier un fragment d'ADN à partir d'oligonucléotides construits pour s'hybrider aux séquences nucléotidiques bordant le fragment d'intérêt. La PCR consiste en la répétition, un certain nombre de fois, de trois étapes ; (i) dénaturation de l'ADN, (ii) hybridation des amorces et (iii) polymérisation à partir de ces amorces par une ADN polymérase ADN dépendante thermorésistante.

Protocole : les composants nécessaires à la réalisation d'une PCR, ainsi que le programme PCR standard sont repris ci-dessous.

<i>Produits</i>	<i>Quantité (µl)</i>
Taq DNA polymérase	0,25
DMSO	2,5
ADN génomique	1
Amorce reverse (10 µM)	1
Amorce forward (10 µM)	1
Buffer Go Taq 5X	10
dNTPS (20 mM)	2
H ₂ O	33,5

Programme PCR de base modifiable ;

<i>Etapes</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Durée (secondes)</i>
(Lyse cellulaire)	98	600
Dénaturation	94	240
Amplification (30 cycles)	94	30
	55 (<i>C. crescentus</i>) / 50 (<i>E. coli</i>)	30
	72	30 par 500 pb
Elongation finale	72	600

g. PCR mutagène

Principe : le but premier est le même qu'une PCR standard mais les conditions expérimentales sont telles que l'ADN polymérase est induite intentionnellement en erreur. Cette perturbation est source de mutations aléatoires dans les fragments amplifiés.

Protocole : les composants nécessaires à la réalisation d'une PCR mutagène, ainsi que le programme PCR standard sont repris ci-dessous.

<i>Produits</i>	<i>Quantité (µl)</i>
Taq DNA polymérase	0,5
Tris pH 8,3 (100 mM)	5
KCl 2 M	1,25
Amorce reverse (100 µM)	1
Amorce forward (100 µM)	1
MgCl ₂ 200 mM	1,75
dATP 5 mM	2
dCTP 25 mM	2
dGTP 5 mM	2
dTTP 25 mM	2
ADN plasmidique 0,2 mg/µl	5
MnCl ₂ 25 mM	1
H ₂ O	25,5

Programme PCR de base modifiable ;

<i>Etapes</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Durée (secondes)</i>
Dénaturation	94	240
Amplification (35 cycles)	94	30
	50	30
	72 *	30 par 500 pb **
Elongation finale	72	600

* gamme de températures testées (50°C → 72°C)

** gamme de temps testés (3 minutes → 4 minutes)

h. Minipréparation d'ADN

Principe : une population clonale portant un plasmide d'intérêt (avec ou sans insert) peut être utilisée pour concentrer et recueillir ce plasmide dilué dans de l'eau désionisée. Les cellules sont lysées et toutes les impuretés (déchets membranaires, ADN génomique, éléments cytoplasmiques, métabolites, etc.) sont éliminées via différentes étapes de lavages et centrifugations.

Protocole : la minipréparation a été effectuée d'après le protocole du kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen)

2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

a. Transformation bactérienne

Principe : la transformation est une particularité biologique naturelle ou induite chez les bactéries. Elle permet l'intégration d'ADN exogène dans une bactérie réceptrice.

Protocole : les souches d'*E. coli* CaCl₂ compétentes sont transformées par choc thermique (passage d'un environnement sur glace à 42°C pendant 2 minutes, suivi d'un temps d'expression phénotypique d'une demi-heure à 37°C) tandis que les souches de *C. crescentus* électrocompétentes sont transformées par électroporation (2 kv, 25 µFD, 400 Ω), suivi d'un temps d'expression phénotypique d'une heure à 30°C.

b. Courbe de croissance

Principe : la densité optique (DO) des bactéries est enregistrée heure par heure à une longueur d'onde spécifique dans le but de déterminer le profil de croissance d'une souche. Il est à noter qu'un test de croissance manuel est nécessaire en travaillant avec la souche CB15 car comme cette souche adhère, les résultats d'un test de croissance automatique (Bioscreen) pourraient être biaisés par la formation de rosette à l'endroit de la lecture d'absorbance.

Protocole : des cultures de *C. crescentus* incubées 12h à 30°C sont diluées à une DO_{660nm} = 0,03 et incubées à 30°C avec agitation (200 rpm). Les DOs sont mesurées toutes les heures à 660_{nm} pendant 9 h, et après 24 h.

c. Mutagenèse aléatoire

Principe : il s'agit d'utiliser une souche XL1-Red qui est déficiente pour trois voies de réparation de l'ADN (voir Matériels). Ce phénotype est la source de mutations aléatoires lors de la réplication du matériel génétique. Un fragment nucléotidique d'intérêt porté par un plasmide transformé dans cette souche sera donc muté aléatoirement. Après minipréparations (environ 200 clones par minipréparation), les plasmides sont électroporés dans un background génétique d'intérêt. Dans ce cas, il s'agissait de souches CB15Δ*pleC* puisque le gène aléatoirement muté était censé compléter (ou pas) certains phénotypes (voir ci-dessous).

Protocole : la mutagenèse a été effectuée telle que décrite par le protocole du kit XL1-Red Competent Cells (Agilent Technologies).

3. Techniques relatives à la caractérisation de souches de *Caulobacter crescentus*

a. Test de résistance aux bactériophages CbK

Principe : un test de résistance au phage (Φ) CbK est mis en œuvre pour évaluer la synthèse de pili dans différentes. En effet, les pili constituent le point d'entrée des ΦCbK et leur synthèse fait, pour rappel, partie intégrante du SwaPS (Matroule et al., 2004; Skerker and Shapiro, 2000). Une résistance aux ΦCbK signifie donc l'absence de pili, ou autrement dit, la perturbation d'une des étapes précoces du SwaPS.

Protocole : une sous-couche PYE (environ 30 ml) additionnée de l'antibiotique approprié est recouverte d'un mélange contenant 4 ml de PYE Top Agar 0,3% et 200 µl d'une culture liquide en phase stationnaire des souches à tester. Une goutte d'environ 5 µl de phages CbK est finalement ajoutée à la surcouche de PYE Top Agar/bactéries à peine séchée. Pour le crible, une sous-couche de PYE (environ 60 ml) additionnée de l'antibiotique approprié est recouverte d'un mélange contenant 8 ml de PYE Top Agar 0,3% et 400 µl de phages CbK. À ce mélange peuvent directement s'ajouter 10 ou 100 µl d'une culture liquide en phase stationnaire reprenant un pool de bactéries *pplC-pplC** (* pour mutation(s) aléatoire(s)). Des stries de clones isolés peuvent également être faites directement sur la surcouche de PYE Top Agar/phages CbK. Dans les deux cas, les boîtes sont incubées 48 heures à 30°C, puis 24 heures à température ambiante.

b. Test de mobilité

Principe : *Caulobacter crescentus* est capable de se mouvoir dans son environnement. Le flagelle, appendice en partie responsable de la mobilité bactérienne, est caractéristique du SwaPS et sa fonctionnalité peut être testée via un test de mobilité. Il faut préciser que les souches testées doivent avoir un profil de croissance commun et ne pas présenter de problème apparent de chémotaxie.

Protocole : Un cure-dents stérile est rapidement trempé dans une culture liquide en phase stationnaire de la souche à tester avant d'être inséré brièvement et pas trop profondément dans une couche de PYE Swarmer Agar 0,25% solidifiée. Les boîtes sont ensuite incubées sans agitation au minimum deux jours à 30°C et puis laissées à température ambiante jusqu'à quelques jours.

c. Test de mobilité tridimensionnel

Principe : il s'agit de pouvoir différencier des souches mobiles de souches immobiles dans un crible sans *a priori*. Les colonies sont directement mélangées au PYE Swarmer Agar 0,25% et poussent donc dans les trois dimensions de la couche. Les colonies d'intérêt (sans halo dans notre cas) sont sélectionnées et simplement recueillies avec un cure-dent.

Protocole : 1 ml d'une culture liquide à D.O._{660nm} = 0,5 diluée à 1/50 000 ou 1/100 000 est mélangée à 60 ml de PYE Swarmer Agar 0,25% additionné de l'antibiotique approprié. Les plaques sont ensuite incubées sans agitation minimum deux jours à 30°C et laissées à température ambiante jusqu'à quelques jours.

d. Test d'attachement

Principe : la souche sauvage de *Caulobacter crescentus* CB15 étant capable d'adhérer à un substrat et cette capacité étant corrélée à la morphogénèse de la bactérie, le test d'attachement (**Fig. 26**) a pour but d'évaluer le pourcentage relatif de cellules ayant effectivement attaché à un substrat donné (O'Toole et al., 1999; Paul et al., 2008). Incubées minimum durant 18 heures dans un puits, les cellules pédonculées (ou du moins produisant un holdfast) ont eu le temps d'adhérer à la surface abiotique que constitue le plastique de la plaque. Elles sont ensuite colorées par du crystal violet qui est finalement recueilli grâce à

des lavages à l'acide acétique. La concentration de crystal violet est directement proportionnelle au nombre de bactéries adhérentes et est évaluée par mesure de la densité optique.

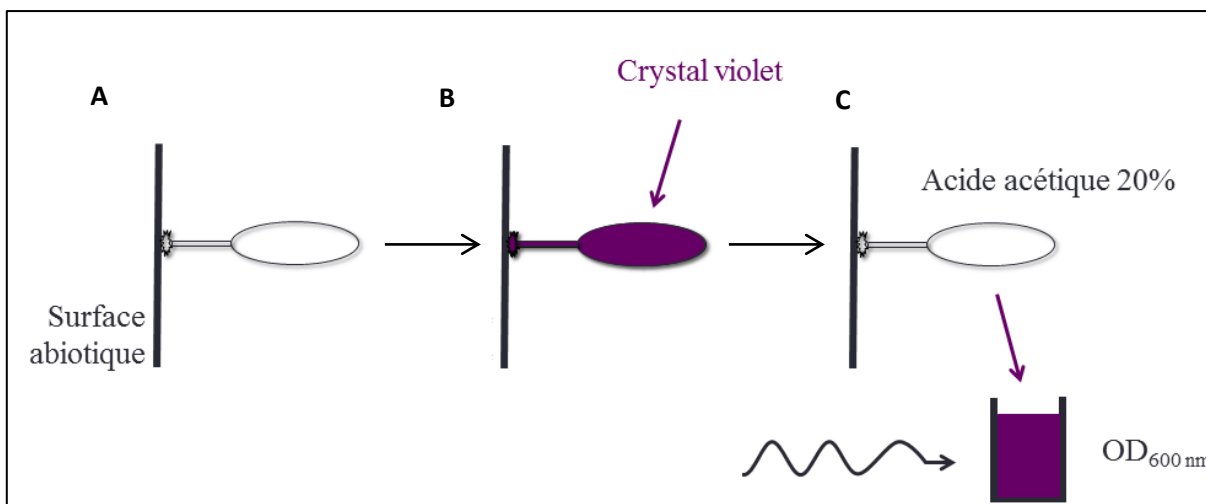


Figure 26 – Schéma général du fonctionnement d'un test d'attachement. (A) La bactérie est incubée suffisamment longtemps dans son milieu pour qu'elle ait le temps d'adhérer au puits. (B) Après coloration au crystal violet, (C) l'acide acétique permet l'élution du crystal violet dont la concentration est déterminée par spectrophotométrie.

Protocole : dans une plaque 96 puits à fond en « U », 9,5 µl d'une culture à $0,4 > DO_{660nm} > 0,5$ sont dilués dans 180 µl de PYE additionné de l'antibiotique adéquat. Incubées ensuite à 37°C avec ou sans agitation (maximum 200 rpm) entre 18 et 24 heures, les puits sont ensuite lavés deux fois avec de l'eau désionisée. Après, 190 µl de crystal violet 0,1% sont ajoutés par puits et la plaque est incubée sous agitation pendant 15 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés quatre fois au minimum avec de l'eau désionisée à raison de 200 µl par puits, et ensuite rincés avec 200 µl d'acide acétique 20%. La plaque est centrifugée cinq minutes à 4000 rpm. Deux fois 70 µl de surnageant sont transférés dans deux puits d'une autre plaque à fond plat. Les DOs de cette plaque sont finalement lues à 600 nm.

<i>Crystal violet 0,1% (100 ml)</i>
Crystal violet (0,1 g)
Isopropanol (2,7 ml)
Méthanol (2,7 ml)
Eau désionisée (94,6 ml)

4. Techniques relatives à l'analyse bioinformatique

Les séquences protéiques des protéines à aligner ont été trouvées dans des bases de données telles que NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), Biocyc (<http://biocyc.org>) ou CMR (<http://cmr.jcvi.org>) et alignées à partir du tutoriel T-coffee (Tree based Consistency Objective Function For AlignmEnt Evaluation) (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>, (Di Tommaso et al., 2011; Notredame et al., 2000).

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaefer, V., Laub, M.T., Baker, T.A., and Jenal, U. (2011). Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Molecular cell* *43*, 550-560.
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P., and Jenal, U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* *47*, 1695-1708.
- Attwood, P.V. (2013). Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society transactions* *41*, 1023-1028.
- Bastedo, D.P., and Marczyński, G.T. (2009). CtrA response regulator binding to the *Caulobacter* chromosome replication origin is required during nutrient and antibiotic stress as well as during cell cycle progression. *Molecular microbiology* *72*, 139-154.
- Berdis, A.J., Lee, I., Coward, J.K., Stephens, C., Wright, R., Shapiro, L., and Benkovic, S.J. (1998). A cell cycle-regulated adenine DNA methyltransferase from *Caulobacter crescentus* processively methylates GANTC sites on hemimethylated DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 2874-2879.
- Biondi, E.G., Reisinger, S.J., Skerker, J.M., Arif, M., Perchuk, B.S., Ryan, K.R., and Laub, M.T. (2006). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* *444*, 899-904.
- Bodenmiller, D., Toh, E., and Brun, Y.V. (2004). Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* *186*, 1438-1447.
- Boutte, C.C., and Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends in microbiology* *21*, 174-180.
- Boutte, C.C., Henry, J.T., and Crosson, S. (2012). ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* *194*, 28-35.
- Brassinga, A.K., and Marczyński, G.T. (2001). Replication intermediate analysis confirms that chromosomal replication origin initiates from an unusual intergenic region in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic acids research* *29*, 4441-4451.
- Brilli, M., Fondi, M., Fani, R., Mengoni, A., Ferri, L., Bazzicalupo, M., and Biondi, E.G. (2010). The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis. *BMC systems biology* *4*, 52.
- Cabantous, S., Guillet, V., Ohta, N., Newton, A., and Samama, J.P. (2002). Characterization and crystallization of DivK, an essential response regulator for cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *58*, 1249-1251.
- Capra, E.J., and Laub, M.T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual review of microbiology* *66*, 325-347.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U., and Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17084-17089.

- Chen, J.C., Hottes, A.K., McAdams, H.H., McGrath, P.T., Viollier, P.H., and Shapiro, L. (2006). Cytokinesis signals truncation of the PodJ polarity factor by a cell cycle-regulated protease. *The EMBO journal* 25, 377-386.
- Chen, J.C., Viollier, P.H., and Shapiro, L. (2005). A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Molecular microbiology* 55, 1085-1103.
- Chen, Y.E., Tsokos, C.G., Biondi, E.G., Perchuk, B.S., and Laub, M.T. (2009). Dynamics of two Phosphorelays controlling cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* 191, 7417-7429.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., and Jenal, U. (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of biological chemistry* 281, 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenoe, P., Grzesiek, S., and Jenal, U. (2007). DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4112-4117.
- Christen, M., Kulasekara, H.D., Christen, B., Kulasekara, B.R., Hoffman, L.R., and Miller, S.I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* 328, 1295-1297.
- Curtis, P.D., and Brun, Y.V. (2010). Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74, 13-41.
- Degnen, S.T., and Newton, A. (1972). Chromosome replication during development in *Caulobacter crescentus*. *Journal of molecular biology* 64, 671-680.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.M., Taly, J.F., and Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research* 39, W13-17.
- Domian, I.J., Reisenauer, A., and Shapiro, L. (1999). Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6648-6653.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B., and Jenal, U. (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes & development* 23, 93-104.
- Dziarski, R., Kashyap, D.R., and Gupta, D. (2012). Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation. *Microb Drug Resist* 18, 280-285.
- Encell, L.P., Coates, M.M., and Loeb, L.A. (1998). Engineering human DNA alkyltransferases for gene therapy using random sequence mutagenesis. *Cancer research* 58, 1013-1020.

- Evinger, M., and Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of bacteriology* *132*, 294-301.
- Galperin, M.Y. (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC microbiology* *5*, 35.
- Galperin, M.Y., Higdon, R., and Kolker, E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular bioSystems* *6*, 721-728.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters* *203*, 11-21.
- Gao, R., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in biochemical sciences* *32*, 225-234.
- Goley, E.D., Iniesta, A.A., and Shapiro, L. (2007). Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. *Journal of cell science* *120*, 3501-3507.
- Gopinath, K.P., Murugesan, S., Abraham, J., and Muthukumar, K. (2009). *Bacillus* sp. mutant for improved biodegradation of Congo red: random mutagenesis approach. *Bioresource technology* *100*, 6295-6300.
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends in microbiology* *12*, 361-365.
- Hecht, G.B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J.M., and Newton, A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO journal* *14*, 3915-3924.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews Microbiology* *7*, 263-273.
- Hinz, A.J., Larson, D.E., Smith, C.S., and 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. *Molecular microbiology* *47*, 929-941.
- Holtzendorff, J., Hung, D., Brende, P., Reisenauer, A., Viollier, P.H., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2004). Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* *304*, 983-987.
- Hsing, W., Russo, F.D., Bernd, K.K., and Silhavy, T.J. (1998). Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ. *Journal of bacteriology* *180*, 4538-4546.
- Hsing, W., and Silhavy, T.J. (1997). Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *179*, 3729-3735.
- Huguenel, E.D., and Newton, A. (1982). Localization of surface structures during procaryotic differentiation: role of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Differentiation; research in biological diversity* *21*, 71-78.

- Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S.K., and Viollier, P.H. (2006). Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* 124, 1025-1037.
- Iniesta, A.A., Hillson, N.J., and Shapiro, L. (2010). Cell pole-specific activation of a critical bacterial cell cycle kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7012-7017.
- Iniesta, A.A., McGrath, P.T., Reisenauer, A., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10935-10940.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S.J., Shapiro, L., and Laub, M.T. (2003). Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Molecular microbiology* 47, 1279-1290.
- Jacobs, C., Domian, I.J., Maddock, J.R., and Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* 97, 111-120.
- Jenal, U., and Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *The EMBO journal* 17, 5658-5669.
- Jones, S. (2006). Is MipZ the new MinCD ? *Nature Reviews Microbiology* 4, 643.
- Kirkpatrick, C.L., and Viollier, P.H. (2012). Reflections on a sticky situation: how surface contact pulls the trigger for bacterial adhesion. *Molecular microbiology* 83, 7-9.
- Klein, E.A., Schlimpert, S., Hughes, V., Brun, Y.V., Thanbichler, M., and Gitai, Z. (2013). Physiological role of stalk lengthening in *Caulobacter crescentus*. *Communicative & integrative biology* 6, e24561.
- Kruppa, M., and Calderone, R. (2006). Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS yeast research* 6, 149-159.
- Lai, Y.P., Huang, J., Wang, L.F., Li, J., and Wu, Z.R. (2004). A new approach to random mutagenesis in vitro. *Biotechnology and bioengineering* 86, 622-627.
- Lam, H., Matroule, J.Y., and Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Developmental cell* 5, 149-159.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4632-4637.
- Lawler, M.L., and Brun, Y.V. (2006). A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry. *Cell* 124, 891-893.
- Lawler, M.L., and Brun, Y.V. (2007). Advantages and mechanisms of polarity and cell shape determination in *Caulobacter crescentus*. *Current opinion in microbiology* 10, 630-637.

- Lei, G., Shen, M., Li, Z.G., Zhang, B., Duan, K.X., Wang, N., Cao, Y.R., Zhang, W.K., Ma, B., Ling, H.Q., *et al.* (2011). EIN2 regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP1 in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment* *34*, 1678-1692.
- Levi, A., and Jenal, U. (2006). Holdfast formation in motile swarmer cells optimizes surface attachment during *Caulobacter crescentus* development. *Journal of bacteriology* *188*, 5315-5318.
- Li, G., Brown, P.J., Tang, J.X., Xu, J., Quardokus, E.M., Fuqua, C., and Brun, Y.V. (2012). Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular microbiology* *83*, 41-51.
- Li, R. (2013). The art of choreographing asymmetric cell division. *Developmental cell* *25*, 439-450.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* *369*, 242-245.
- Malakooti, J., Wang, S.P., and Ely, B. (1995). A consensus promoter sequence for *Caulobacter crescentus* genes involved in biosynthetic and housekeeping functions. *Journal of bacteriology* *177*, 4372-4376.
- Marczynski, G.T., and Shapiro, L. (1992). Cell-cycle control of a cloned chromosomal origin of replication from *Caulobacter crescentus*. *Journal of molecular biology* *226*, 959-977.
- Matroule, J.Y., Lam, H., Burnette, D.T., and Jacobs-Wagner, C. (2004). Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* *118*, 579-590.
- McGrath, P.T., Iniesta, A.A., Ryan, K.R., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2006). A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell* *124*, 535-547.
- Merker, R.I., and Smit, J. (1988). Characterization of the adhesive holdfast of marine and freshwater caulobacters. *Applied and environmental microbiology* *54*, 2078-2085.
- Muir, R.E., Easter, J., and Gober, J.W. (2005). The trans-acting flagellar regulatory proteins, FliX and FlbD, play a central role in linking flagellar biogenesis and cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology* *151*, 3699-3711.
- Muir, R.E., and Gober, J.W. (2001). Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* *41*, 117-130.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., and Yamada-Okabe, H. (1998). Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* *144* (Pt 2), 425-432.
- Nagano, K. (2013). [FimA fimbriae of the periodontal disease-associated bacterium *Porphyromonas gingivalis*]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* *133*, 963-974.

- 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., *et al.* (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 4136-4141.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* *302*, 205-217.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology* *310*, 91-109.
- Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H., and Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *The Journal of biological chemistry* *282*, 29170-29177.
- Paul, R., Jaeger, T., Abel, S., Wiederkehr, I., Folcher, M., Biondi, E.G., Laub, M.T., and Jenal, U. (2008). Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell* *133*, 452-461.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes & development* *18*, 715-727.
- Pazy, Y., Motaleb, M.A., Guarnieri, M.T., Charon, N.W., Zhao, R., and Silversmith, R.E. (2010). Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 1924-1929.
- Perfeito, L., Fernandes, L., Mota, C., and Gordo, I. (2007). Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects. *Science* *317*, 813-815.
- Podgornaia, A.I., and Laub, M.T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current opinion in microbiology* *16*, 156-162.
- Poindexter, J.S. (1964). Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. *Bacteriological reviews* *28*, 231-295.
- Quon, K.C., Yang, B., Domian, I.J., Shapiro, L., and Marczyński, G.T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 120-125.
- Radhakrishnan, S.K., Thanbichler, M., and Viollier, P.H. (2008). The dynamic interplay between a cell fate determinant and a lysozyme homolog drives the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. *Genes & development* *22*, 212-225.
- Reisenauer, A., Quon, K., and Shapiro, L. (1999). The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *Journal of bacteriology* *181*, 2430-2439.
- Reisenauer, A., and Shapiro, L. (2002). DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *The EMBO journal* *21*, 4969-4977.

- Roberts, R.C., Mohr, C.D., and Shapiro, L. (1996). Developmental programs in bacteria. *Current topics in developmental biology* 34, 207-257.
- Siam, R., and Marczynski, G.T. (2003). Glutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. *Nucleic acids research* 31, 1775-1779.
- Sircar, R., Greenswag, A.R., Bilwes, A.M., Gonzalez-Bonet, G., and Crane, B.R. (2013). Structure and activity of the flagellar rotor protein FliY: a member of the CheC phosphatase family. *The Journal of biological chemistry* 288, 13493-13502.
- Skerker, J.M., and Laub, M.T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nature reviews Microbiology* 2, 325-337.
- Skerker, J.M., and Shapiro, L. (2000). Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO journal* 19, 3223-3234.
- Smith, C.S., Hinz, A., Bodenmiller, D., Larson, D.E., and Brun, Y.V. (2003). Identification of genes required for synthesis of the adhesive holdfast in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* 185, 1432-1442.
- Sommer, J.M., and Newton, A. (1989). Turning off flagellum rotation requires the pleiotropic gene pleD: pleA, pleC, and pleD define two morphogenic pathways in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* 171, 392-401.
- Stackebrandt, E., Fischer, A., Roggentin, T., Wehmeyer, U., Bomar, D., and Smida, J. (1988). A phylogenetic survey of budding, and/or prosthecae, non-phototrophic eubacteria: membership of *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Pedomicrobium*, *Filomicrobium*, *Caulobacter* and "dichotomicrobium" to the alpha-subdivision of purple non-sulfur bacteria. *Archives of microbiology* 149, 547-556.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* 69, 183-215.
- Subramanian, K., Paul, M.R., and Tyson, J.J. (2013). Potential role of a bistable histidine kinase switch in the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. *PLoS computational biology* 9, e1003221.
- Szurmant, H., and Ordal, G.W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 301-319.
- Taylor, J.A., Wilbur, J.D., Smith, S.C., and Ryan, K.R. (2009). Mutations that alter RcdA surface residues decouple protein localization and CtrA proteolysis in *Caulobacter crescentus*. *Journal of molecular biology* 394, 46-60.
- Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., *et al.* (1999). Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nature structural biology* 6, 729-734.
- Tsokos, C.G., and Laub, M.T. (2012). Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Current opinion in microbiology* 15, 744-750.

- Tsokos, C.G., Perchuk, B.S., and Laub, M.T. (2011). A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell-fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Developmental cell* *20*, 329-341.
- Viollier, P.H., and Shapiro, L. (2003). A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Molecular microbiology* *49*, 331-345.
- Viollier, P.H., Sternheim, N., and Shapiro, L. (2002). A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. *The EMBO journal* *21*, 4420-4428.
- Wagner, J.K., and Brun, Y.V. (2007). Out on a limb: how the *Caulobacter* stalk can boost the study of bacterial cell shape. *Molecular microbiology* *64*, 28-33.
- Wang, S.P., Sharma, P.L., Schoenlein, P.V., and Ely, B. (1993). A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 630-634.
- Willett, J.W., and Kirby, J.R. (2011). CrdS and CrdA comprise a two-component system that is cooperatively regulated by the Che3 chemosensory system in *Myxococcus xanthus*. *mBio* *2*.
- Willett, J.W., and Kirby, J.R. (2012). Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS genetics* *8*, e1003084.
- Wright, R., Stephens, C., Zweiger, G., Shapiro, L., and Alley, M.R. (1996). *Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation. *Genes & development* *10*, 1532-1542.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J.L., and Newton, A. (1999). A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 13068-13073.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T., and Inouye, M. (2000). Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 7808-7813.
- Zweiger, G., Marczyński, G., and Shapiro, L. (1994). A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisive cell. *Journal of molecular biology* *235*, 472-485.