



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contrôle de la division cellulaire par une glutamate déhydrogénase chez *Caulobacter crescentus*

CHARLOT , Jessica

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.

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>

Contrôle de la division cellulaire par une glutamate déhydrogénase chez *Caulobacter crescentus*

Charlot Jessica

Résumé

Coordonner la division cellulaire avec le métabolisme est un processus essentiel aux cellules leur permettant de s'adapter à la disponibilité en nutriment. Cependant, chez les bactéries, les régulateurs impliqués dans ce mécanisme sont encore pour la plupart inconnus. Chez *Caulobacter crescentus*, une alpha-protéobactérie vivant dans des milieux oligotrophes, l'oxydoréductase présumée KidO a récemment été décrite comme inhibiteur de FtsZ, l'acteur central de la division bactérienne. Au sein du laboratoire, nous avons identifié chez *C. crescentus*, une glutamate déhydrogénase (GdhZ) comme étant un régulateur potentiel de FtsZ. Sachant que ; (i) les délétions de *gdhZ* et de *kidO* présentent certaines caractéristiques similaires ; (ii) la liaison du NAD(H) est indispensable à KidO pour médier son inhibition de la division ; et (iii) l'activité catabolique de GdhZ est accompagnée d'une réduction de NAD⁺, nous avons tenté d'établir un lien entre GdhZ et KidO. Les résultats obtenus suggèrent que (i) GdhZ interfère bien avec le processus de division via FtsZ ; (ii) GdhZ et KidO font partie du même complexe protéique ; (iii) GdhZ et KidO sont capables d'interférer avec FtsZ indépendamment l'une de l'autre. Néanmoins, nous n'excluons pas que KidO et GdhZ puissent aussi influencer conjointement FtsZ. Toutes ces observations montrent comment un organisme peut percevoir la disponibilité en nutriment et adapter son cycle cellulaire.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

Promoteur: X. De Bolle

Remerciements

Mes premiers remerciements iront aux professeurs Jean-Jacques Letesson, Xavier De Bolle, et Jean-Yves Matroule pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans leur laboratoire.

Ensuite, je souhaite remercier toute la BCCD team pour cette aventure inoubliable. Kenny, Séverin, tous ces repas partagés furent un réel plaisir (et parfois une détente). Vos conseils m'ont toujours été d'une grande aide. Jérôme, merci tout d'abord d'avoir été un assistant ultra sympathique et de m'avoir donné tout ces petits conseils quand Franco n'était pas dans les parages ☺. Aurélie, merci de ta présence en tant que conseillère et partenaire de nombreuses conversations matinales. Franco, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et pour ta patience envers moi (et parfois envers mes larmes ☺), sans toi rien de tout ceci n'aurait été possible. Enfin, Régis je te remercie tout d'abord de m'avoir accueilli dans l'équipe et ensuite d'avoir contribué au fait que ce mémoire ait été, pour moi, une expérience scientifique épanouissante. En général, je vous remercie tous pour toutes ces rigolades et foutage de (ma) « gueule ».

Mes remerciements suivants iront aux autres mémos qui ont partagé cette année « merveilleuse » avec moi. Particulièrement, je voudrais d'abord remercier Katy pour ces multiples repas (compensatoires de stress) et ces multiples moments déprimés (souvent soignés par craquages) partagés. Tu es probablement l'une des meilleures amies que j'ai pu avoir. Ensuite, merci à Charlotte pour tous ces petits moments de délires et pour les heures de discussion accumulées dans le bus. Merci à Oli, mon cher collègue, pour tous ces moments de folies, tout cela fut bien distrayants et « décompressants ». Enfin, merci à Alexandre pour ces innombrables heures passées à rédiger (chanter) côte-à-côte.

Je voudrais surtout remercier mes proches. Isabelle, ma vie n'aurait pas été pareille sans toi, tu m'es essentielle. Merci d'avoir été là à chaque moment heureux et malheureux de ces dernières années. Maman, merci pour la patience dont tu as fait preuve tout au long des ces années d'études et particulièrement lors de ce dernier mois. Tu es la meilleure maman que je pouvais espérer avoir. Merci à toi, Pol, d'être toujours présent pour nous. Tu es ce qui se rapproche le plus d'un père pour moi. Merci à toi mon amour pour ta patience pendant mes nombreuses heures d'études. C'est bientôt fini tout ça ☺. Je vous aime tous énormément.

Enfin, je vous remercie vous, lecteurs, d'avoir pris le temps de lire ce que j'ai mis tant de temps à écrire ☺.

Table des matières

1. Introduction.....	11
1.1 La division cellulaire	11
1.1.1 FtsZ, une « tubulin-like » procaryote formant l’anneau Z	11
1.1.2 Régulation de l’anneau Z	13
1.1.3 Formation du divisome et séparation des deux cellules filles	15
1.2 <i>Caulobacter crescentus</i>	15
1.2.1 L’anneau Z de <i>Caulobacter crescentus</i>	17
1.2.2 Régulation du positionnement de l’anneau Z par MipZ	19
1.2.3 L’assemblage du divisome de <i>Caulobacter crescentus</i>	21
1.2.4 Régulation métabolique du divisome de <i>Caulobacter crescentus</i>	21
2. Objectifs.....	33
3. Résultats.....	37
3.1 Constructions plasmidiques	37
3.2 GdhZ agit-elle sur FtsZ de manière KidO-dépendante ?.....	39
3.2.1 Croissance des souches <i>WT</i> , Δ <i>gdhZ</i> , Δ <i>kidO</i> , Δ <i>gdhZ</i> Δ <i>kidO</i> , <i>ftsZ</i> _{E79K} et <i>ftsZ</i> _{E79K} Δ <i>gdhZ</i> en PYE.....	39
3.2.2 Morphologie et distributions de taille des souches <i>WT</i> , <i>AgdhZ</i> , Δ <i>kidO</i> , Δ <i>gdhZ</i> Δ <i>kidO</i> , <i>ftsZ</i> _{E79K} et <i>ftsZ</i> _{E79K} Δ <i>gdhZ</i>	39
3.3 GdhZ et KidO font-elles partie du même complexe?.....	41
3.4 KidO agit-elle sur FtsZ de manière GdhZ-dépendante ?.....	43
3.4.1 Croissance en PYE-PYEX	43
3.4.2 Morphologie et distributions de taille	43
3.5 Les localisations de KidO et de GdhZ sont-elles interdépendantes ?.....	47
3.6 Surexpression de FtsZ et FtsZ _{E79K} dans les souches <i>WT</i> et Δ <i>gdhZ</i>	51
3.6.1 Western blot	51
3.6.2 Morphologies et distributions de taille.....	51
4. Discussion et perspectives	57
4.1 Caractérisation du lien entre GdhZ, KidO et FtsZ.....	57
4.2 Effet d’une surexpression de <i>ftsZ</i> sur le mutant Δ <i>gdhZ</i>	59
4.3 Modèle proposé	63
5. Matériel et méthodes.....	67
5.1 Souches, plasmides et amorces.....	67
5.1.1 Souches.....	67

5.1.2	Plasmides.....	69
5.1.3	Amorces	71
5.2	Milieux, tampons et solutions.....	73
5.2.1	Milieux pour <i>Escherichia coli</i>	73
5.2.2	Milieux pour <i>Caulobacter crescentus</i>	73
5.2.3	Tampons et solutions.....	73
5.2.4	Sucres et antibiotiques (à filtrer)	77
5.3	Techniques relatives à l'ADN	77
5.3.1	Polymerase chain reaction (PCR)	77
5.3.2	Procédure de clonage	79
5.3.3	Préparation d'ADN plasmidique.....	79
5.4	Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	79
5.4.1	Préparation de cellules électrocompétentes.....	79
5.4.2	Transformation bactérienne par électroporation	81
5.4.3	Conjugaison bi- et triparentale	81
5.4.4	Intégration du plasmide recombinant.....	81
5.4.5	Excision du plasmide intégré	81
5.4.6	Croissance et viabilité	83
5.4.7	Synchronisation (sur glace).....	83
5.4.8	Microscopie.....	85
5.5	Techniques relatives à l'utilisation de protéines.....	85
5.5.1	Préparation d'échantillons protéiques pour la réalisation d'un Western blot	85
5.5.2	Analyse de l'expression des protéines par Western blot.....	85
5.5.3	Immunoprécipitation	87
6.	Bibliographie.....	93

« Attendre d'en savoir assez pour agir en toute lumière, c'est se condamner à l'inaction. »

[Jean Rostand]

« La vraie science est une ignorance qui se sait. »

[Montaigne]

« Le paradoxe de la science est qu'il n'y a qu'une réponse à ses méfaits et à ses périls : encore plus de science. »

[Romain Gary]

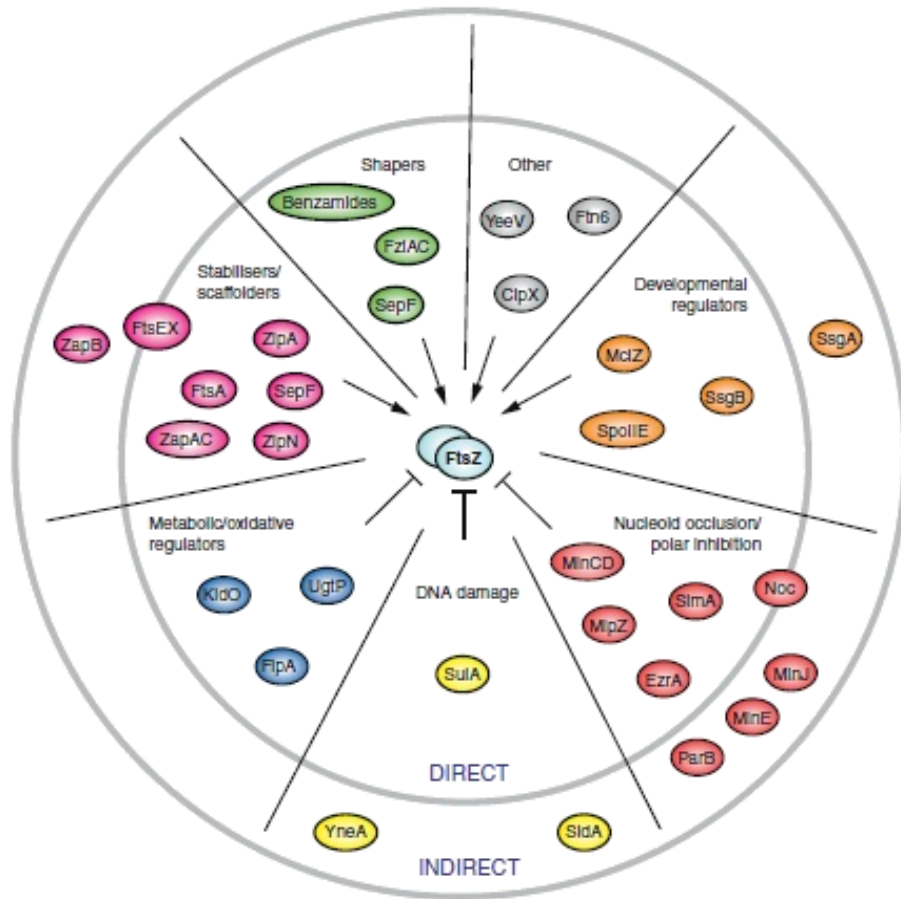


Figure 1. Régulation directe ou indirecte de FtsZ. Cette figure rassemble les différents acteurs intervenant dans la régulation de la division cellulaire. La plupart interfère directement ou indirectement avec l'homologue de la tubuline, FtsZ. Ces protéines sont classées selon le type de régulation qu'elles exercent (Kirkpatrick & Viollier 2011).

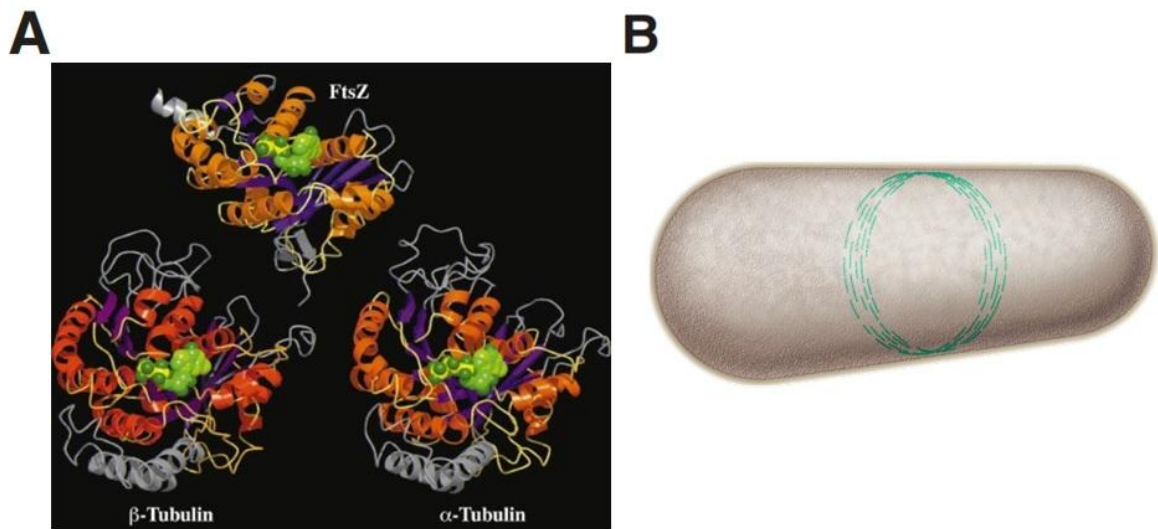


Figure 2. La tubulin-like procaryote, FtsZ. **A.** Comparaison des structures de FtsZ, de l' α -tubuline et de la β -tubuline. Les nucléotides liés sont montrés en vert, les hélices alpha en orange, les feuillets bêta en mauve et les structures non conservées en gris. **B.** Cette image propose un modèle selon lequel des protofilaments se chevauchent de manière décalée pour former un anneau Z (Erickson et al. 2010).

1. Introduction

1.1 La division cellulaire

Chez tout organisme, qu'il soit eucaryote ou procaryote, la division cellulaire est un processus essentiel permettant la survie, le développement et la reproduction de chaque individu. Chez les bactéries, le modèle classique de division, largement étudié chez *Escherichia coli* (gram négatif) et *Bacillus subtilis* (gram positif), est la fission binaire. Chez ces bactéries, la cellule mère croît jusqu'à doubler de taille tout en répliquant son génome génomique, et se divise en deux cellules filles de taille et de morphologie identiques. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce processus et ensemble forment, au futur site de division, un complexe appelé le divisome. Afin de coordonner croissance, réplication d'ADN et cytokinèse, le positionnement et le fonctionnement du divisome doivent être étroitement régulés. Étonnamment, la plupart des mécanismes régulant la division n'interfère qu'avec une seule protéine du divisome, FtsZ (**Figure 1**) (Kirkpatrick & Viollier 2011). Cet homologue de la tubuline eucaryote polymérise en une structure très dynamique appelée anneau Z qui recrute ensuite d'autres protéines aux fonctions diverses pour former le divisome et accomplir la cytokinèse (Erickson 1997).

1.1.1 FtsZ, une « tubulin-like » procaryote formant l'anneau Z

FtsZ est indéniablement la protéine la plus importante pour le processus de division et ce pour différentes raisons. Tout d'abord, FtsZ est, parmi les acteurs du divisome, la protéine la plus conservée à travers le règne du vivant. Elle est présente chez presque toutes les eubactéries, la plupart des archées et chez les organelles de nombreux eucaryotes (chloroplastes et mitochondries) (Erickson 1997; Osteryoung et al. 1998; Margolin 2000; Vaughan et al. 2004). Ensuite, FtsZ est essentielle au recrutement de la plupart des autres acteurs de la division ce qui la place au sommet de la hiérarchie de l'assemblage du divisome. Enfin, c'est principalement FtsZ qui permet la constriction de la cellule lorsque la ségrégation chromosomique est achevée permettant ainsi la séparation des cellules filles (Osawa et al. 2008).

Deux observations justifient le terme de « tubuline-like » pour FtsZ. La première est l'analyse de la structure cristallographique de FtsZ qui révèle une grande ressemblance avec celle de la protéine eucaryote (**Figure 2a**) (Löwe & Amos 1998; Nogales et al. 1998; Burns 1998). FtsZ possède deux domaines liés par une hélice centrale (Löwe & Amos 1998). L'extrémité N-terminale de FtsZ contient un domaine de liaison au GTP et lui permet une action de GTPase (de Boer et al. 1992). Le domaine C-terminal, quant à lui, semble jouer un rôle dans les interactions avec d'autres acteurs de la division (Ma & Margolin 1999). La deuxième observation est que tout comme la tubuline, les monomères de FtsZ s'assemblent en une structure portant le nom de protofilament (Erickson et al. 1996).

L'assemblage des monomères en protofilaments est tributaire à la fois de la liaison du GTP par FtsZ et d'une concentration suffisante en monomères dans la cellule (Mukherjee & Lutkenhaus 1994; Sun & Margolin 1998). Plusieurs dizaines de protofilaments s'associent ensuite à l'aide de liens latéraux pour former *in fine* l'anneau Z (**Figure 2b**) (Romberg & Levin 2003; Erickson et al. 2010). De nombreuses études démontrent que l'anneau Z est une structure extrêmement dynamique. En effet, une fois assemblé, ce dernier continue à échanger des monomères de FtsZ avec le cytoplasme par hydrolyse du GTP. Dans le cytoplasme, les sous-unités échangent leur GDP contre du GTP et rejoignent ensuite l'anneau Z. Chez la majorité des bactéries, le temps moyen de renouvellement complet de cette structure est inférieur à 10 secondes (Stricker et al. 2002; Anderson et al. 2004; Chen & Erickson 2005).

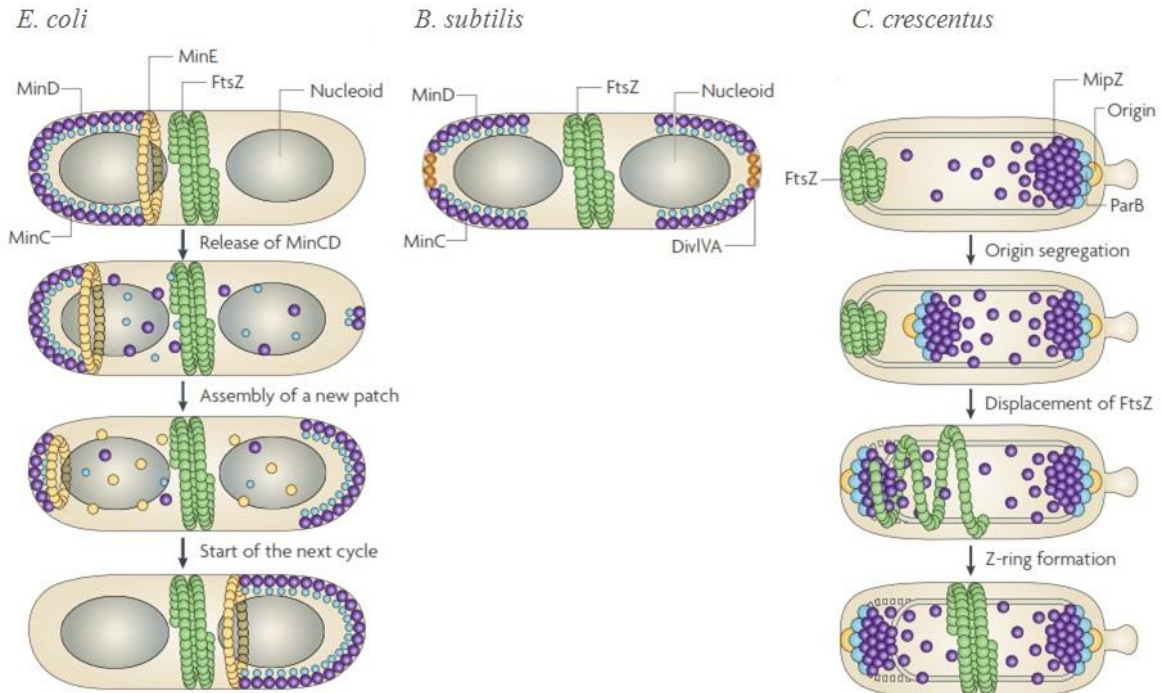


Figure 3. Systèmes Min et MipZ. Chez *E. coli* et *B. subtilis*, la formation de l'anneau Z est empêchée aux pôles et restreinte au centre de la cellule grâce à un gradient de concentration de l'inhibiteur de FtsZ, MinC. Chez *E. coli*, ce gradient naît de l'oscillation de l'ATPase MinE. Chez *B. subtilis*, bien que le résultat soit identique au précédent, il n'y a pas d'oscillation de MinC. En effet, celui-ci est trappé aux pôles de la cellule par la protéine DivIVA. Chez *C. crescentus*, après répllication des origines de réplication (*Cori*), un gradient de MipZ se crée tout le long du chromosome. Cela est rendu possible à travers l'interaction de MipZ avec la protéine de liaison à l'ADN proche de *Cori*, ParB (Thanbichler & Shapiro 2008).

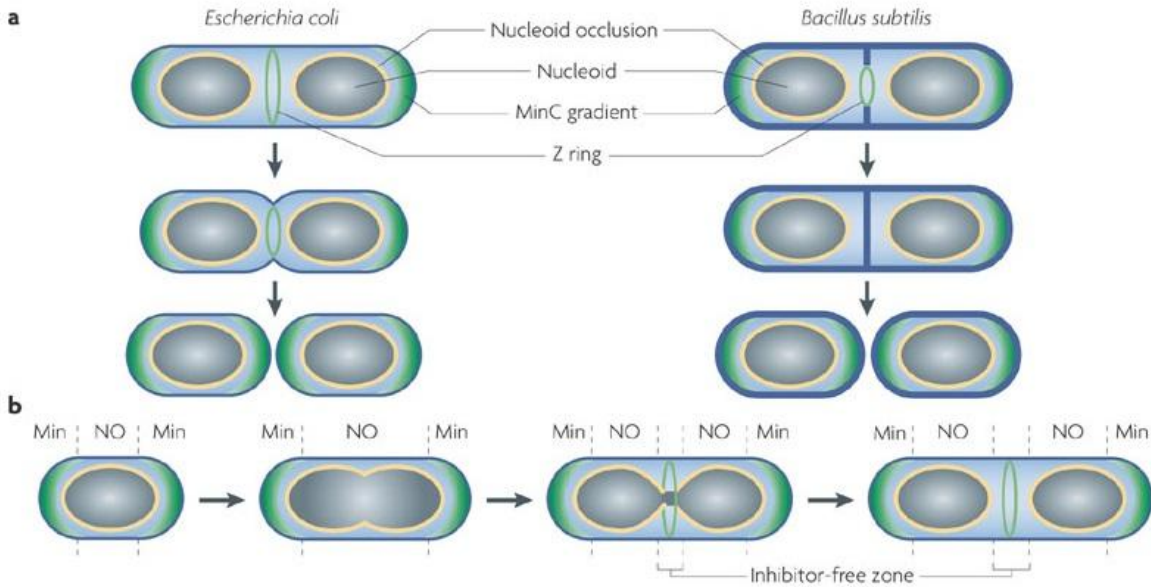


Figure 4. Combinaison du système Min et de nucleoid occlusion. a) Formation et positionnement de l'anneau Z au centre des cellules et séparation des cellules filles. b) Régulation du positionnement de l'anneau Z. Le système de nucleoid occlusion empêche la formation de l'anneau Z au dessus des chromosomes, tandis que le système Min l'empêche au niveau des pôles. Le gradient de MinC est représenté par la couleur verte et les protéines de nucleoid occlusion, Noc et SlmA sont en jaune (Adams & Errington 2009).

Il est essentiel de construire l'anneau Z de manière appropriée pour réaliser une division correcte. Mais quels sont les mécanismes permettant un bon positionnement au bon moment de cette structure ?

1.1.2 Régulation de l'anneau Z

Etant donné son rôle essentiel dans la division, FtsZ est donc la cible, directe ou indirecte, de nombreux mécanismes de régulation (**Figure 1**) (Kirkpatrick & Viollier 2011). Les plus étudiés à ce jour sont probablement les systèmes Min et de « nucleoid occlusion » (NO). Le premier contribue au bon positionnement de l'anneau Z, tandis que le second retarde la cytokinèse jusqu'à la fin de la ségrégation chromosomique.

Le système Min a été nommé ainsi car lorsque des mutations interviennent dans l'opéron *min* composé de 3 gènes (*minCDE*), cela donne naissance à des mini-cellules après une constriction inappropriée aux pôles cellulaires. Les trois protéines qui composent ce système, MinC, MinD et MinE (*E. coli*)/DivIVA (*B. subtilis*), empêchent la formation de l'anneau Z aux pôles de la cellule. Dans le cas d'*Escherichia coli*, MinC et MinD forme un complexe ancré en membrane dont la fonction est d'inhiber la formation de l'anneau Z. Sous l'effet de l'ATPase MinE, ce complexe oscille d'un pôle à l'autre. Cette oscillation a pour effet de créer un gradient de MinC à travers la cellule avec une concentration maximale aux pôles et minimale au centre de la cellule. Le positionnement de l'anneau Z est donc empêché aux pôles et restreint à la région centrale de la cellule où la concentration de MinC est la moins élevée (Lutkenhaus 2007; Thanbichler & Shapiro 2008; Lutkenhaus et al. 2012). Quelques différences existent chez *Bacillus subtilis*. Premièrement, MinE n'existe pas mais une protéine analogue est présente, DivIVA (Marston et al. 1998). Et deuxièmement, ces protéines ne subissent pas d'oscillation. En effet, DivIVA se contente de recruter le complexe MinC/MinD aux pôles (**Figure 3**) (Bramkamp et al. 2008; Patrick & Kearns 2008; Lutkenhaus et al. 2012). Malgré ces différences, le résultat obtenu chez les deux organismes est similaire à savoir l'inhibition de la formation de l'anneau aux pôles de la cellule.

Le « nucleoid occlusion », empêche la formation de l'anneau Z sur le chromosome bactérien. De cette façon, il évite la bissection de ce dernier avant la fin de la ségrégation chromosomique. SlmA chez *E. coli* et Noc chez *B. subtilis*, reconnaissent des séquences spécifiques présentes tout le long du chromosome et interfèrent avec FtsZ. Les régions libres de chromosome, à savoir les pôles et le « mid-cell » après ségrégation, permettent donc exclusivement la polymérisation de FtsZ. A nouveau, les mécanismes d'action de Noc et SlmA sont différents mais leur effets résultent tout deux en une inhibition de la formation de l'anneau Z sur le chromosome (Wu et al. 2004; Bernhardt & de Boer 2005; Wu et al. 2009).

Ensemble, le système Min et le « nucleoid occlusion » permettent donc le positionnement au bon moment et au bon endroit de l'anneau Z qui dès lors peut recruter les différents acteurs du divisome (**Figure 4**).

D'autres types de régulation sur l'anneau Z existent. C'est le cas notamment d'une voie métabolique présente chez plusieurs bactéries qui permet une coordination entre la taille de la cellule et la division. L'effecteur principal de ce système est la glucosyltransférase UgtP qui inhibe la formation de l'anneau Z d'une manière nutriments-dépendante. La fonction de ce système est de s'assurer que la cellule ait à la fois répliqué son chromosome et qu'elle ait atteint une taille appropriée avant de se diviser et ce à travers la régulation de FtsZ (Weart et al. 2007).

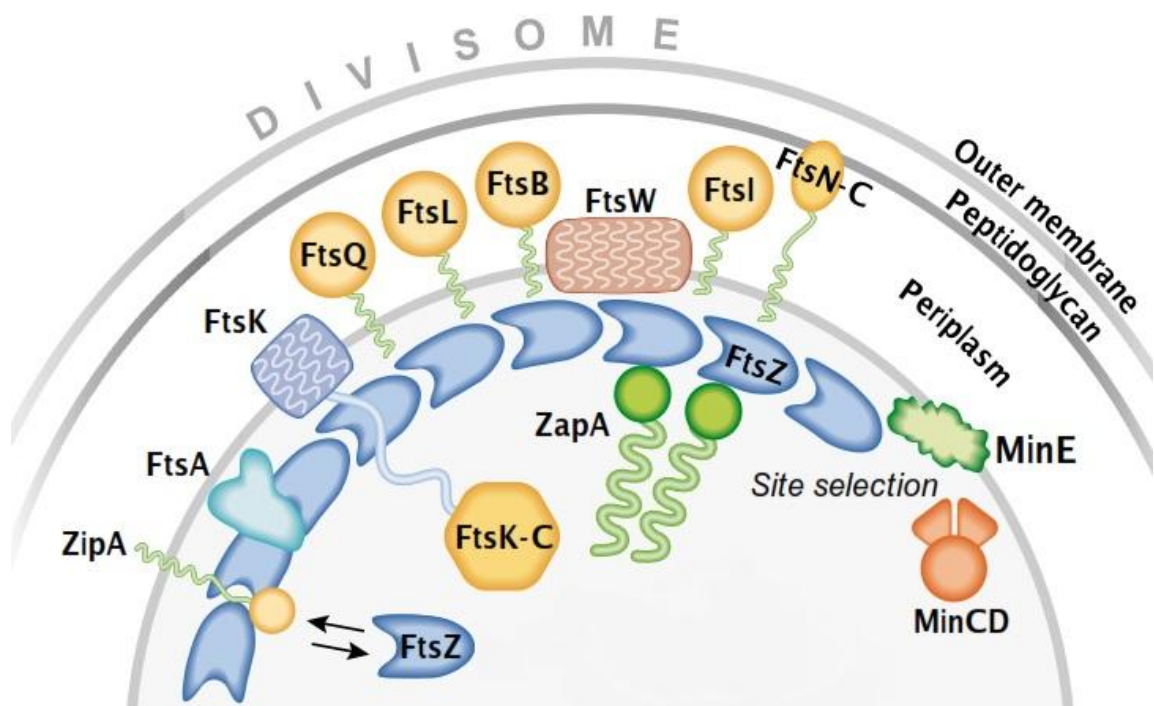


Figure 5. Représentation du divisome de *Escherichia coli*. Ce schéma représente les protéines intervenant dans la formation du divisome de *Escherichia coli*, ainsi que le système de régulation Min.

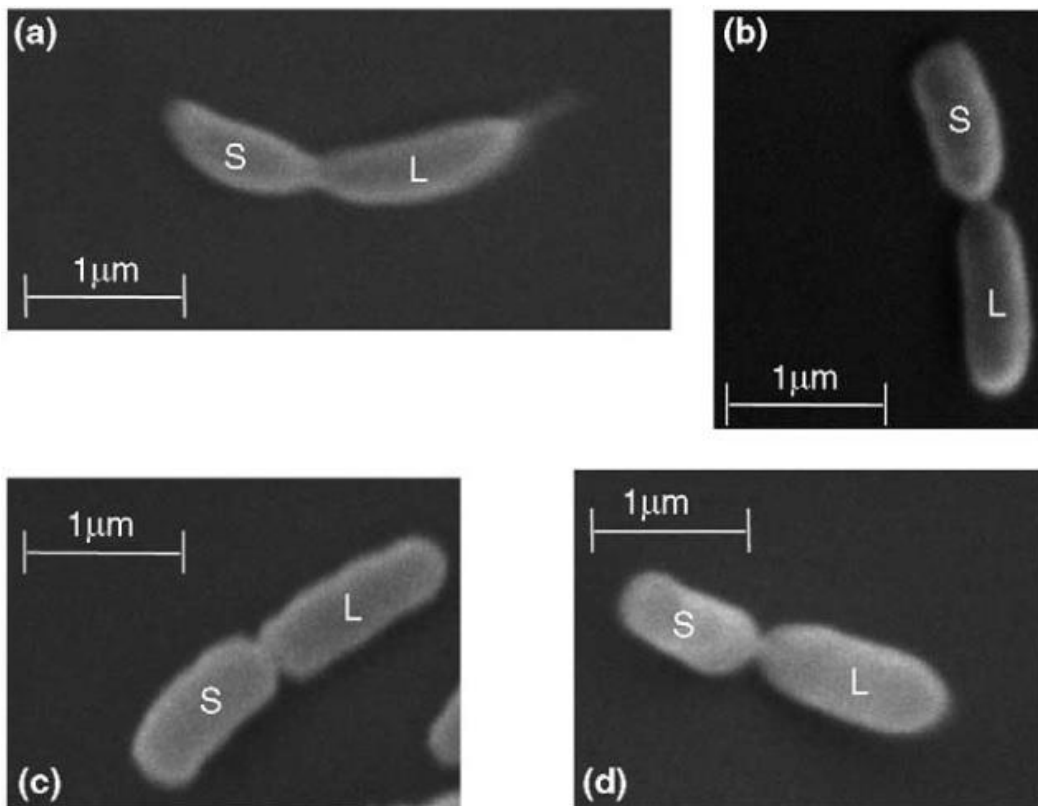


Figure 6. Micrographies d'alphaprotéobactéries. Des micrographies de a) *Caulobacter crescentus*, b) *Brucella abortus*, c) *Sinorhizobium meliloti* et d) *Agrobacterium tumefaciens* ont été réalisées juste avant la séparation des cellules filles. Nous pouvons observer le caractère asymétrique des bactéries avec les petites cellules (S) et les grandes cellules (L) (Hallez et al. 2004).

1.1.3 Formation du divisome et séparation des deux cellules filles

Après formation et positionnement, l'anneau Z recrute plusieurs protéines pour former *in fine* le divisome et conduire à la cytokinèse de la bactérie. Chez *E. coli*, le recrutement d'une quinzaine de protéines a lieu selon une hiérarchie bien établie, ce qui signifie qu'une protéine ne sera pas recrutée tant que celle qui la précède n'est pas présente au niveau de l'anneau Z. La plupart de ces protéines sont essentielles et certaines sont encore mal connues. Elles interviennent au niveau du divisome dans l'ordre suivant: FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX) > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC (**Figure 5**). Chacune d'entre elles possède une fonction particulière dans le processus de division (Vicente et al. 2006). Parmi les protéines dont les fonctions sont bien connues nous pouvons par exemple citer FtsA, ZipA et ZapA. FtsZ ne possédant pas d'affinité particulière pour la membrane, FtsA et ZipA interviennent pour y ancrer et fixer l'anneau Z (Pichoff & Lutkenhaus 2005). ZapA permet ensuite la stabilisation et la consolidation de la charpente formée par les protofilaments de FtsZ en inhibant son activité GTPase (Durand-Heredia et al. 2011). D'autres protéines telles que FtsI (PBP3) et FtsN jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycan (paroi) pendant la séparation des deux cellules filles (Höltje 1998; Ursinus et al. 2004). Cette séparation est réalisée chez *E. coli* en partie grâce à une force de constriction générée à la fois par l'ancrage en membrane et par l'activité GTPase de FtsZ (Osawa et al. 2008).

Bien que les différents composants du divisome varient d'une espèce bactérienne à l'autre, les mécanismes régis par ce dernier et ses régulateurs sont conservés et peuvent être aisément extrapolés à travers le monde bactérien (Margolin 2000). Ainsi, d'autres bactéries telles que les alphaprotéobactéries présentent une division asymétrique à la place du modèle classique de la fission binaire. A chaque cycle de division, ces bactéries donnent naissance à deux cellules filles de taille et de morphologie différentes. C'est le cas de la bactérie que nous étudions dans notre laboratoire et qui fait l'objet d'étude de ce mémoire, *Caulobacter crescentus*.

1.2 *Caulobacter crescentus*

C. crescentus est une bactérie faisant partie de la classe des alphaprotéobactéries qui sont toutes à gram négatif. Cette classe regroupe des bactéries très hétérogènes, tant au point de vue de leurs caractéristiques que de leurs styles de vie (Batut et al. 2004). Par exemple, nous pouvons y retrouver le pathogène facultatif de mammifères, *Brucella abortus*. Cette bactérie est à l'origine de la brucellose ou fièvre de Malte, une maladie anthroponotique provoquant des avortements spontanés parmi le bétail et représentant un problème économique récurrent pour les agriculteurs (Corbel 1997; Roop et al. 2004). Citons également le pathogène péricellulaire des plantes, *Agrobacterium tumefaciens* qui par injection de son T-DNA reprogramme les cellules végétales à son avantage. Cette reprogrammation conduit à une prolifération cellulaire anarchique se traduisant visuellement par la formation d'une tumeur nommée galle du collet (Gelvin 2003). Malgré leurs styles de vie bien distincts, il a pu être mis en évidence que de nombreuses alphaprotéobactéries présentent une division asymétrique caractéristique qui pourrait dès lors être considérée commune à l'ensemble du groupe (**Figure 6**) (Hallez et al. 2004).

Caulobacter crescentus, quant à elle, vit librement dans les milieux aquatiques et dans les sols. Cette bactérie est qualifiée d'oligotrophe car ses niches écologiques sont généralement pauvres en nutriments. Lors de sa division cellulaire, elle donne naissance à deux cellules filles morphologiquement distinctes : une petite cellule nageuse chémosensitive et une grande cellule sessile pédonculée. L'hypothèse communément acceptée est que ce

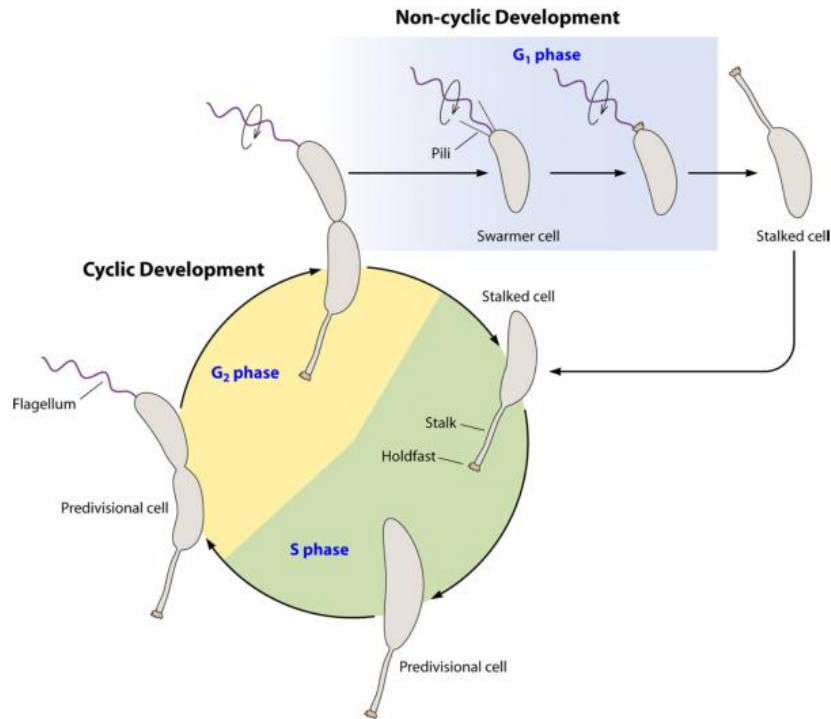


Figure 7. Cycle de vie de *Caulobacter crescentus*. Lors de la phase G₁, la cellule nageuse cherche un environnement favorable et après l'avoir trouvé, se fixe au substrat à l'aide de ses pili pour entrer en phase de transition S. Durant celle-ci, la bactérie perd son flagelle et le remplace par un pédoncule. Débute alors la phase G₂ avec la naissance d'une cellule prédivisionnelle qui résultera en une cellule nageuse et en une cellule pédonculée après division (Curtis & Brun 2010).

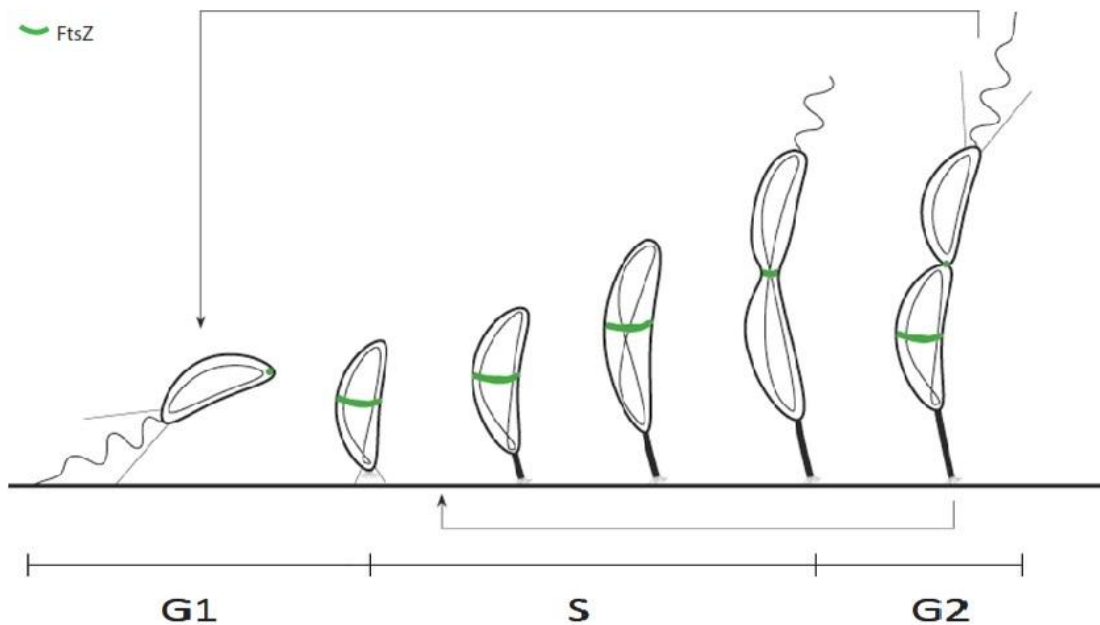


Figure 8. Abondance et localisation de FtsZ pendant le cycle de vie de *Caulobacter crescentus*. En phase G₁, FtsZ (en vert) est présent en faible concentration et trappée au pôle opposé à celui du flagelle. Ensuite, pendant la phase S, l'abondance de FtsZ augmente et elle se relocalise au presque centre de la cellule.

cycle de vie particulier serait une adaptation de *C. crescentus* à son environnement oligotrophe. Ce mode de vie permet en effet à la cellule nageuse de remonter un gradient de nutriments et de coloniser de nouvelles niches écologiques réduisant ainsi la compétition intraspécifique. La petite cellule possède, en plus de son flagelle, des pili. Ceux-ci jouent un rôle très important lors de l'attachement de la cellule nageuse au substrat. Après s'être attachée à une surface située dans un environnement favorable à son développement, *C. crescentus* entre en phase de transition. Lors de cette phase, la bactérie perd son flagelle, rétracte ses pili et crée un pédoncule là où se trouvait précédemment son appendice motile. Cette nouvelle structure possède à son extrémité des polysaccharides collants (*holdfast*) lui permettant d'adhérer efficacement à la surface choisie. Solidement attachée à son substrat, la bactérie peut alors débiter son processus de division. A l'issue de celui-ci, une cellule nageuse sera libérée dans l'environnement tandis que la cellule pédonculée engagera un nouveau cycle de division. La cellule nageuse pourra soit s'attacher aux alentours, se différencier en cellule pédonculée et débiter un cycle de division si les conditions sont favorables; soit nager jusqu'à un endroit plus propice à ce processus si l'environnement direct n'est pas adapté (**Figure 7**) (Poindexter 1981).

C. crescentus possède un cycle cellulaire hautement corrélé à son dimorphisme cellulaire. En effet, alors que les cellules pédonculées peuvent répliquer leur ADN, les cellules nageuses en sont incapables. Au contraire, les cellules nageuses entrent préalablement en phase G1 durant laquelle elles sont mobiles et sensibles au niveau chémo-tactique. Ce n'est qu'après une phase de transition G1-S accompagnée d'une différenciation en cellules pédonculées que la synthèse d'ADN sera initiée (phase S). Pendant que la phase S se poursuit, un nouveau flagelle sera construit au pôle opposé à celui du pédoncule donnant naissance à une cellule prédivisionnelle. Après l'achèvement de la phase S, la phase G2 débute et se terminera par la réplication complète du chromosome et la division de la cellule (prédivisionnelle) mère en deux cellules filles, l'une nageuse et l'autre pédonculée (**Figure 7**). À l'inverse de certaines bactéries capables d'initier une nouvelle réplication chromosomique alors que les deux cellules filles ne sont pas séparées physiquement (ex : *Escherichia coli*), *C. crescentus* ne réalise qu'un seul cycle de réplication par cycle cellulaire (Marczynski 1999).

De part son dimorphisme visuel évident, sa manipulation facile en laboratoire et sa capacité de synchronisation, *Caulobacter crescentus* s'est imposée en tant que modèle d'étude du développement et de la division asymétrique (Poindexter 1981).

1.2.1 L'anneau Z de *Caulobacter crescentus*

La plupart des caractéristiques de l'anneau Z et du divisome décrites chez *E. coli* ou *B. subtilis* sont conservés chez *Caulobacter crescentus*. Par exemple, des études *in vitro* ont pu montrer que la dynamique d'assemblage de FtsZ_{Cc} en protofilaments est comparable à celle observée pour FtsZ_{Ec} ou FtsZ_{Bs} (entre 5 et 10 secondes après l'ajout de GTP) (Milam & Erickson 2013). Cependant, nous pouvons mettre en évidence quelques différences importantes : (i) la localisation et l'abondance de FtsZ varient selon le type cellulaire. Dans la cellule nageuse, FtsZ est présente en faible concentration au pôle opposé au pôle flagellé. Lors de la différenciation en cellule pédonculée, sa concentration augmente et sa localisation change pour initier la construction de l'anneau Z au « *midcell* »¹ de la cellule (**Figure 8**) (Biteen et al. 2012). (ii) Chez *C. crescentus*, FtsZ intervient de manière critique dans la croissance longitudinale de la cellule pédonculée (Aaron et al. 2007). (iii) *C. crescentus* ne possède pas à proprement parlé d'un système Min et d'un système de « nucleoid occlusion »

¹ La division étant asymétrique, le « *midcell* » de la cellule réfère ici à une position légèrement excentrée

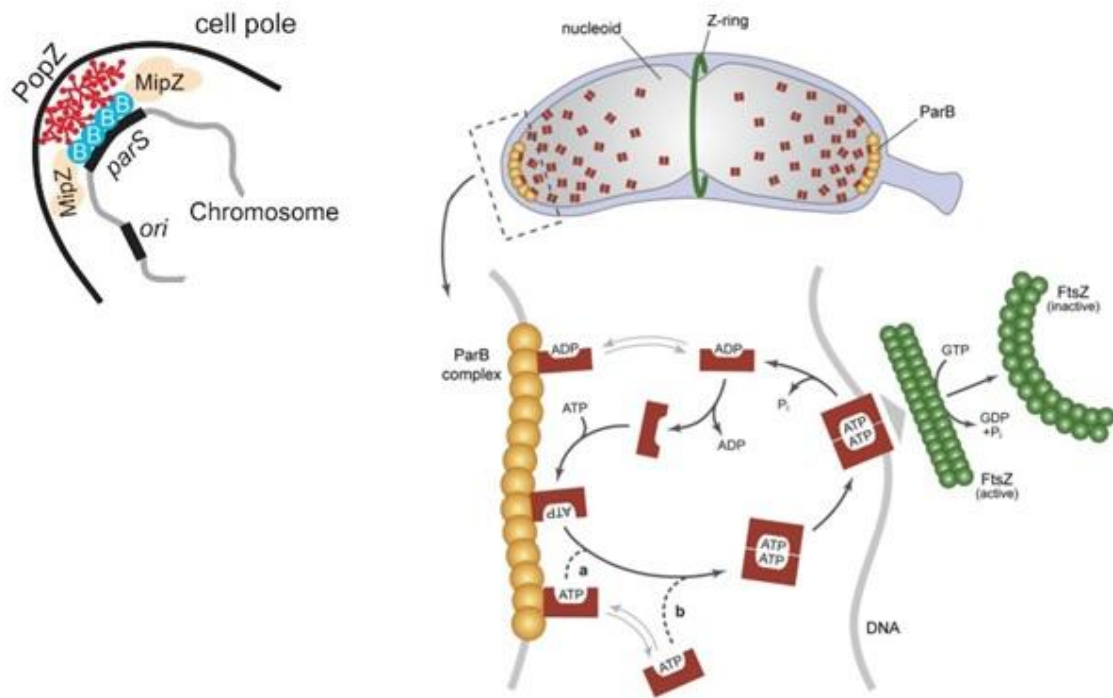


Figure 9. Le système MipZ. **A.** Localisation de MipZ au pôle via l'interaction avec la protéine de liaison à l'ADN ParB. ParB est elle-même liée au séquence spécifiques *parS* située non loin de l'origine du chromosome (*ori*) (Ebersbach et al. 2008). **B.** Représentation du gradient des dimères de MipZ formé le long du chromosome. Les dimères se forment à proximité des séquences ParB, inhibent la formation de l'anneau Z et s'hydrolysent ensuite (Kiekeley et al. 2012).

comme décrits précédemment. Néanmoins, leurs fonctions, à savoir l'inhibition de la division aux pôles et au niveau du chromosome, sont remplies par une seule protéine décrite dans le point 1.2.2, MipZ (Thanbichler & Shapiro 2006). (iv) Contrairement à l'assemblage hiérarchique du divisome décrit chez *E. coli* ou *B. subtilis*, où le recrutement de chaque acteur dépend du précédent, l'arrivée des protéines au futur site de division chez *C. crescentus* s'effectue par vagues de recrutement. Nous pouvons ainsi découper l'assemblage du divisome en cinq catégories selon le « *timing* » d'arrivée au « *midcell* » et la fonction des protéines recrutées (Goley et al. 2011). L'assemblage du divisome sera décrit plus en détails dans le point 1.2.3.

1.2.2 Régulation du positionnement de l'anneau Z par MipZ

MipZ (*Midcell positioning of FtsZ*) est un membre de la famille des ATPases ParA/MinD. Comme pour le système Min ou le *nucleoid occlusion*, la déplétion de *mipZ* induit la formation d'anneaux Z aux pôles ou au dessus du chromosome conduisant à la formation de « *minicells* » (dépourvue d'ADN) ou de filaments et, *in fine* à la mort cellulaire. À l'inverse, des cellules surexprimant MipZ ne présentent presque plus aucun site de constriction donnant lieu à une filamentation. *In vitro*, MipZ interagit directement avec FtsZ stimulant son activité GTPase et de ce fait empêche sa polymérisation. MipZ interagit également avec la protéine de partition ParB, reconnaissant elle-même des séquences *parS*, situées à proximité de l'origine de réplication du chromosome (*Cori*) (Thanbichler & Shapiro 2006) (**Figure 9A**).

Dans la cellule, MipZ existe sous forme monomérique ou dimérique. Seuls les dimères peuvent se lier à FtsZ et à l'ADN. A l'inverse, seuls les monomères interagissent avec ParB. Tenant compte de cela, il est proposé que ParB recrute les monomères de MipZ au pôle et aide à la dimérisation de ceux-ci. Les dimères se déplacent alors à travers la cellule et se lient à l'ADN pendant un certain temps jusqu'à ce que l'activité ATPase intrinsèque de MipZ se déclenche et hydrolyse le dimère en monomère. En capturant des monomères et en relâchant des dimères de MipZ qui se lieront sur l'ADN, ParB met en place un cycle à l'infini. Ce turnover incessant mène à la formation d'un gradient des dimères de MipZ dont la concentration est la plus importante à proximité de ParB et décroît en s'en éloignant. De plus, à partir de *Cori*, MipZ peut polymériser le long du chromosome (phénomène de « *spreading* ») (**Figure 9B**) (Kiekebusch et al. 2012).

Grâce à ces caractéristiques MipZ peut réguler temporellement et spatialement le positionnement de l'anneau Z. Ainsi, dans les cellules nageuses (G1), le complexe MipZ-ParB-*parS* est situé au pôle flagellé et FtsZ est cantonné au pôle opposé. Après l'initiation de la réplication (S), lorsque les origines de réplication sont dupliquées, un premier complexe MipZ-ParB-*Cori* reste ancré au pôle flagellé tandis que la deuxième origine de réplication (néo-synthétisée) migre immédiatement après sa synthèse vers le pôle opposé, accompagnée de ParB et MipZ. Une fois au pôle opposé, MipZ délocalise FtsZ. Un gradient de MipZ s'établit ainsi très rapidement (phase S) avec un minimum au centre de la cellule et des maxima aux pôles ; cette configuration amène donc FtsZ à polymériser au « *midcell* » de la cellule très tôt au cours du cycle cellulaire par rapport à ce qui est observé chez *E. coli* ou *B. subtilis* (**Figure 3**) (Thanbichler & Shapiro 2006). Il a été également suggéré que le gradient de MipZ est légèrement asymétrique permettant ainsi le positionnement asymétrique de l'anneau Z (Schofield et al. 2010).

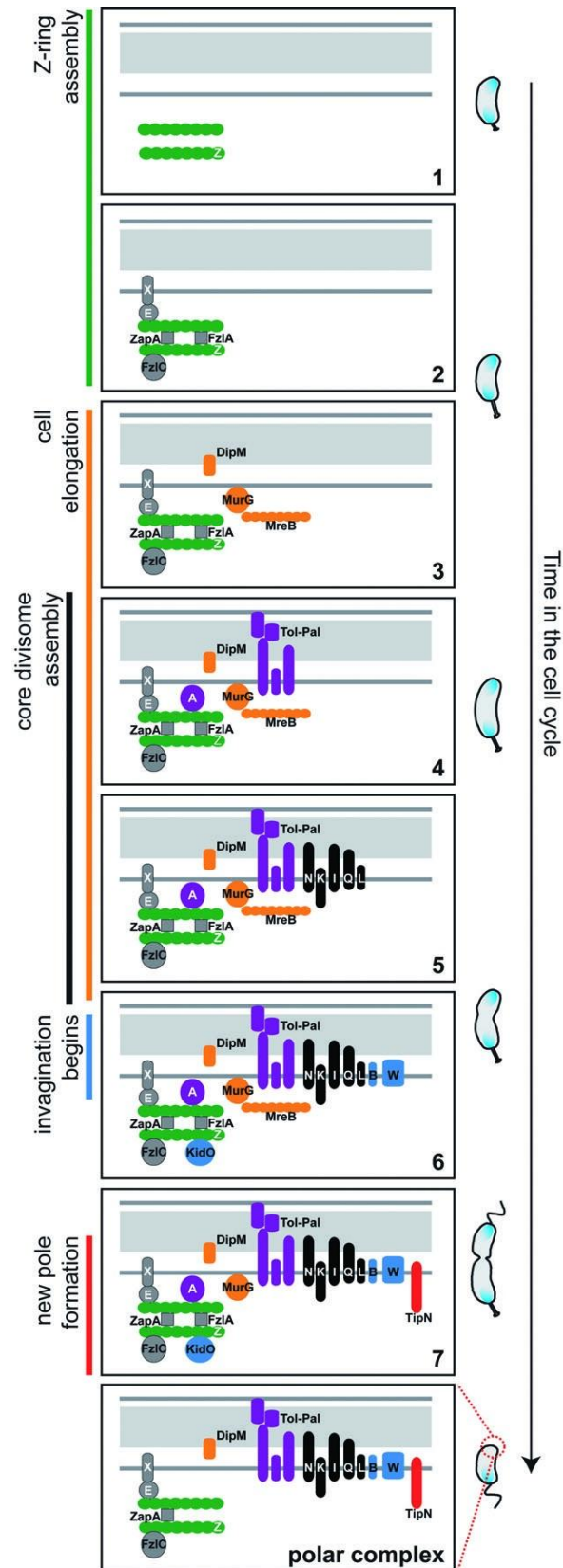


Figure 10. Assemblage du divisome chez *Caulobacter crescentus*. Chez *Caulobacter crescentus*, le processus de division peut être fractionné en cinq étapes (formation de l'anneau Z, élongation cellulaire, assemblage du cœur du divisome, début de l'invagination et formation des nouveaux pôles) selon le « timing » et la fonction des protéines. Les protéines intervenant au même moment sont représentées par une couleur identique. La dernière image décrit la position de chaque protéine juste après la division. Les figures sur la droite montrent la position de MipZ pendant le cycle cellulaire (Goley et al. 2011).

1.2.3 L'assemblage du divisome de *Caulobacter crescentus*

Comme mentionné ci-dessus, la dynamique d'assemblage du divisome de *Caulobacter crescentus* se décline en cinq étapes selon le timing de recrutement et la fonction des protéines. Ces cinq étapes illustrées dans la **figure 10** sont décrites ci-dessous.

- 1) L'étape d'assemblage et de stabilisation de l'anneau Z regroupe principalement des protéines de stabilisation et d'ancrage de FtsZ. Par exemple, FzlA, qui influe sur la courbure des protofilaments de FtsZ ou encore ZapA, l'homologue de la protéine du même nom trouvée chez *B. subtilis* qui jouent un rôle dans la stabilisation de l'anneau Z (Gueiros-Filho & Losick 2002; Goley, Dye, et al. 2010; Goley et al. 2011).
- 2) La deuxième étape, l'élongation cellulaire, rassemble des protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycan. Il s'agit par exemple de DipM, une endopeptidase dont le rôle est de maintenir l'architecture du peptidoglycan au cours du cycle cellulaire (Goley, Comolli, et al. 2010; Möll et al. 2010; Poggio et al. 2010). Citons également MurG, une glycosyltransférase intervenant dans la dernière étape de la synthèse du lipide II, un précurseur du peptidoglycan (White et al. 2010; Goley et al. 2011).
- 3) L'assemblage du cœur du divisome annonce le début de la division à proprement parler. Lors de cette étape, le complexe Tol-Pal permet d'assurer l'intégrité des membranes durant l'élongation cellulaire et FtsA renforce l'ancrage du divisome en membrane (Yeh et al. 2010; Goley et al. 2011). Notons que cette troisième étape débute avant que l'élongation cellulaire ne soit terminée (Goley et al. 2011).
- 4) Lors de la quatrième étape, celle de la transition entre l'élongation cellulaire et la constriction, on peut observer le début de l'invagination de l'enveloppe cellulaire. Il est suggéré que c'est la protéine FtsW qui amorcerait cette constriction (Goley et al. 2011). KidO, qui influence la stabilité de l'anneau Z, est recrutée à la fin de cette quatrième étape. Elle permet la dépolymérisation de l'anneau Z et est décrite dans le point 1.2.4.1 (Radhakrishnan et al. 2010; Goley et al. 2011).
- 5) La dernière étape, la formation des nouveaux pôles, est dépendante de la protéine TipN (Goley et al. 2011). Ce marqueur du nouveau pôle intervient dans la ségrégation du chromosome et est, dès lors, impliqué dans la localisation correcte de FtsZ dans la cellule nouvellement formée. Une délétion de TipN mène à une inversion de l'asymétrie en ce sens que la cellule nageuse devient la plus grande des deux cellules. De plus, après plusieurs cycles cellulaires, ce mutant forme des filaments de plus en plus long. Cela suggère une régulation importante de TipN sur le bon déroulement de la division (Schofield et al. 2010).

1.2.4 Régulation métabolique du divisome de *Caulobacter crescentus*

Le seul acteur du métabolisme décrit à ce jour pour intervenir dans la régulation de la division cellulaire chez *C. crescentus* est KidO. Dans ce manuscrit, nous proposons que la glutamate déshydrogénase constitue également un régulateur métabolique de la division.

1.2.4.1 Régulation du divisome par KidO

Récemment, l'équipe de Patrick Viollier a mis en évidence, le premier régulateur métabolique de la division chez *C. crescentus*, KidO (*kinase and division-regulating oxidoreductase homolog*). Cette protéine de 34,5 kDa et composée de 324 acides aminés lie préférentiellement le NAD(H). KidO peut s'apparenter aux membres de la famille TAS des oxydoréductases dépendantes du NAD(P)H (26 % d'identité et 36 % de similarité)

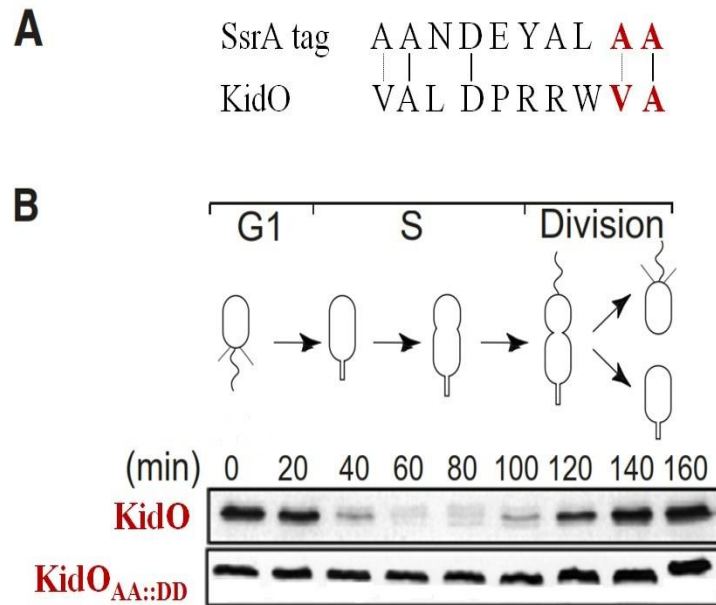


Figure 11. Dégradation ClpXP-dépendante de KidO. **A.** Comparaison de la séquence C-terminale de KidO avec la séquence SsrA tag. Les deux acides aminés représentés en rouge sont hydrophobes. Les lignes pleines soulignent des conservations de certains acides aminés et les lignes discontinues représentent des conservations de même caractère (hydrophobicité/hydrophilie) entre les deux séquences. **B.** Dégradation de KidO et de sa version stabilisée, KidO_{AA::DD}, pendant le cycle cellulaire (Radhakrishnan et al. 2010).

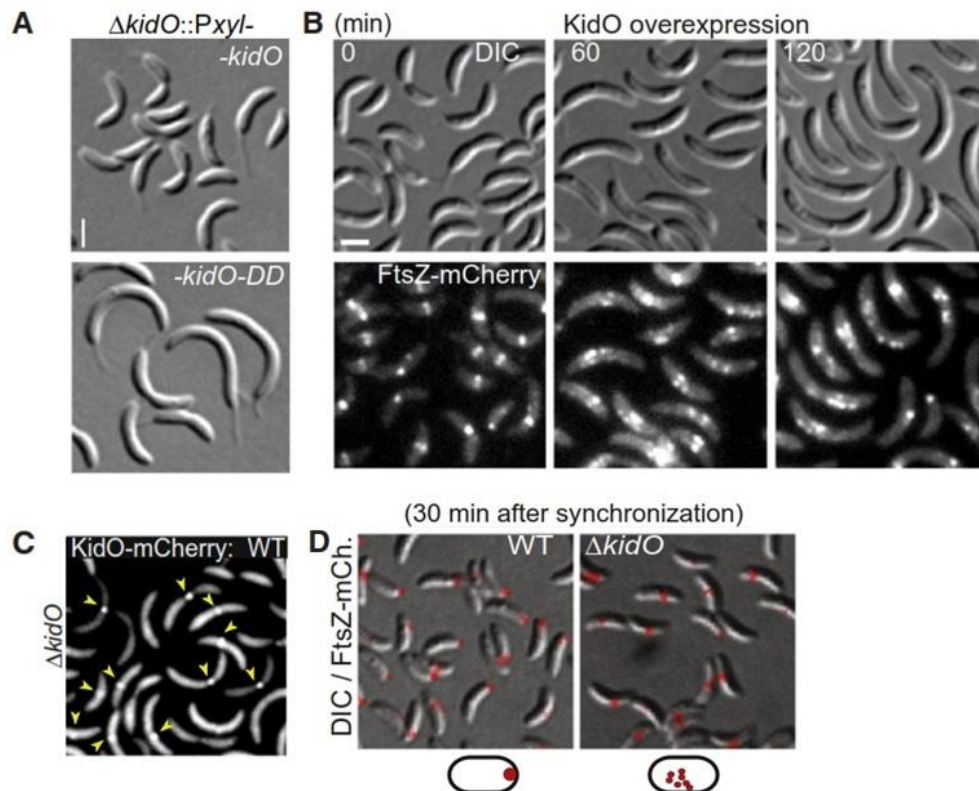


Figure 12. Micrographies de *Caulobacter crescentus*. **A.** Morphologie d'une souche $\Delta kidO$ portant une version normale de KidO (en haut) et une version stabilisée de KidO (en bas). **B.** Effets de la surexpression de KidO sur la morphologie des bactéries (en haut) et sur la localisation de FtsZ-mCherry (en bas) une heure et deux heures après induction. **C.** Localisation de KidO-mCherry dans une souche $\Delta kidO$. **D.** Localisation de FtsZ-mCherry 30 minutes après synchronisation dans la souche WT (à gauche) et la souche $\Delta kidO$ (à droite) (Radhakrishnan et al. 2010).

(Radhakrishnan et al. 2010). Néanmoins, le résidu tyrosine au niveau du site catalytique nécessaire à l'activité, conservé chez cette famille d'oxydoréductase, chez KidO, est remplacé par une phénylalanine. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucune activité catalytique n'a pu être détectée pour KidO. En effet, il a pu être mis en évidence que lorsque l'on remplace le résidu tyrosine des oxydoréductases TAS par une phénylalanine, bien que la liaison du cofacteur soit toujours possible, l'activité catalytique est fortement compromise (Tipparaju et al. 2008; Radhakrishnan et al. 2010).

Ni la délétion de *kidO*, ni son expression constitutive n'a d'effet majeur sur la physiologie de *C. crescentus*, générant tout au plus un léger allongement des cellules. Le suivi de l'abondance de KidO au cours du cycle cellulaire montre une dégradation de KidO concomitante à la phase S, avec une réapparition en fin de division (**Figure 11**). La dégradation de KidO au cours du cycle cellulaire est dépendante de la protéase ClpXP (Radhakrishnan et al. 2010). Cette protéase AAA+ intervient dans les mécanismes de régulation protéolytique de manière ATP-dépendante. Elle dégrade notamment des protéines possédant à leur extrémité C-terminale une séquence proche du tag de protéolyse SsrA. La séquence de ce dernier comporte deux acides aminés hydrophobes essentiels à la reconnaissance par le complexe de dégradation (Chien et al. 2007). Si l'on remplace ces deux derniers acides aminés chez KidO par deux résidus hydrophiles, KidO_{DD} n'est plus dégradée durant le cycle cellulaire. Cette version est alors considérée comme stabilisée (**Figure 11**). La surexpression de *kidO_{DD}* perturbe fortement la division conduisant à une filamentation sévère (**Figure 12A**) (Radhakrishnan et al. 2010).

Plusieurs observations suggèrent que KidO régule la division, en particulier FtsZ : (i) en microscopie à fluorescence, on constate que la surexpression de KidO conduit à une dispersion des anneaux Z. En effet, 2h après surexpression de l'oxydoréductase, seulement 22% des cellules présentent un anneau Z par rapport à 78% dans des conditions normales d'expression (**Figure 12B**); (ii) KidO interagit directement avec FtsZ; (iii) Plusieurs mutants de *ftsZ* résistants à la surexpression de KidO ont pu être isolés (*ftsZ_{F55G}*, *ftsZ_{I68N}*, *ftsZ_{T69N/Q70E}*, *ftsZ_{E79K}*, *ftsZ_{G225S}* et *ftsZ_{S257A}*) (iv) KidO est recruté en fin de division au niveau de l'anneau Z d'une manière FtsZ-dépendante (**Figure 10**). Effectivement, une expérience de microscopie à fluorescence a montré qu'une fusion KidO-mCherry localise dans 73% des cellules prédivisionnelles au site de constriction (**Figure 12C**) (Radhakrishnan et al. 2010).

En testant la liaison des mutants FtsZ avec KidO, on peut observer que les mutants FtsZ_{T69N/Q70E} et FtsZ_{I68N} ne sont plus capables de lier KidO expliquant leur capacité à résister à sa surexpression. Les autres mutants, FtsZ_{E79K}, FtsZ_{F55G} et FtsZ_{S257A}, interagissent toujours avec KidO suggérant un autre moyen de protection contre la surexpression de cette dernière. En étudiant les activités GTPase des différents mutants, on peut observer que celles-ci ne sont pas affectées de la même manière. Alors que la plupart des mutants possèdent une activité GTPase similaire à celle de la souche WT, celle du mutant *ftsZ_{T69N/Q70E}* est très réduite (~6X moins importante) (Radhakrishnan et al. 2010).

Au vu du profil de dégradation de KidO et de son effet *in vitro* sur FtsZ, la question se pose de savoir comment KidO régule temporellement la formation de l'anneau Z. A l'aide d'une fusion FtsZ-mCherry, la localisation de FtsZ au cours du cycle cellulaire a pu être observée chez une souche WT et une souche Δ *kidO* (**Figure 12D**). Nous pouvons nettement distinguer une différence dans le timing de recrutement de l'anneau Z chez les deux souches. En effet, après seulement 30 min de cycle cellulaire, seulement 25% des cellules WT ont recruté FtsZ au « *midcell* » alors que dans 78% des cellules Δ *kidO* ont déjà formé un anneau Z. Notons que KidO ne contrôle ni la transcription de *ftsZ* et ni son accumulation au cours du cycle cellulaire. Cela suggère que KidO agit sur FtsZ en affectant la formation et/ou la

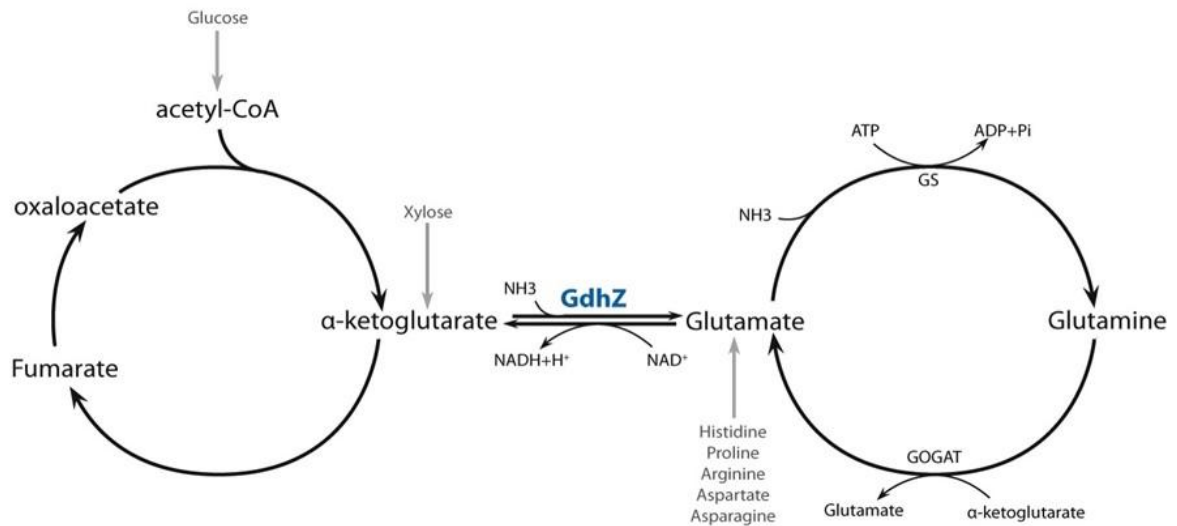


Figure 13. Position de GdhZ dans le métabolisme. GdhZ se trouve au carrefour entre le cycle de Krebs et le cycle de l'azote. Elle catalyse la réaction réversible de la déamination du glutamate en α -kétoglutarate et ammonium.

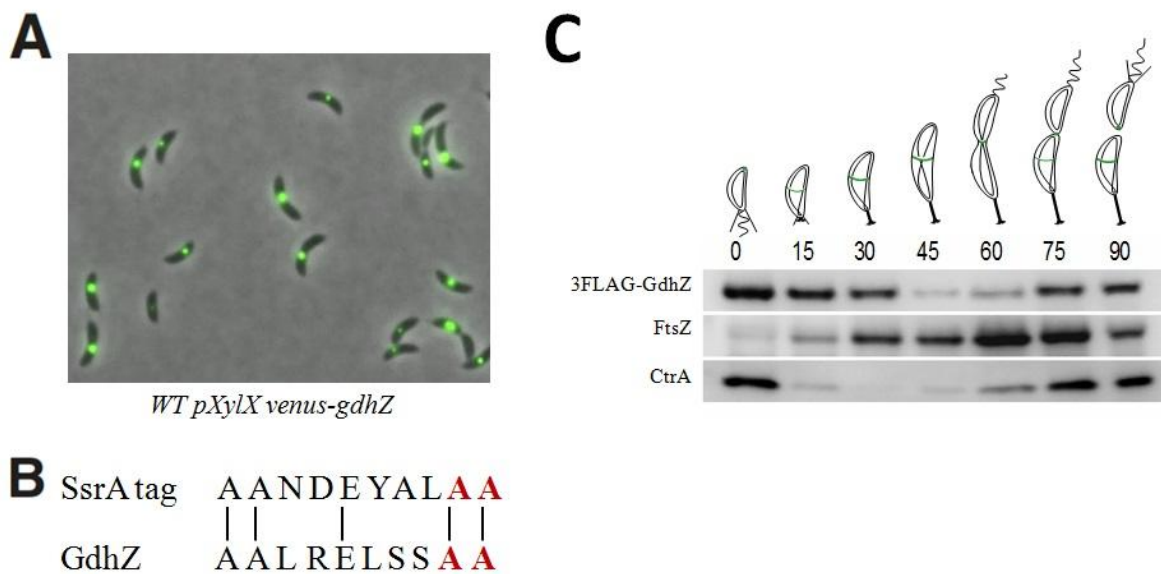


Figure 14. Caractéristiques de GdhZ. **A.** Localisation d'une fusion Venus-GdhZ exprimée sous le contrôle du promoteur *P_{XylX}* inducible au xylose. **B.** Comparaison de la séquence C-terminale de GdhZ avec la séquence du tag SsrA. Les deux acides aminés représentés en rouge sont hydrophobes. Les lignes soulignent des conservations de certains acides aminés entre les deux séquences. **C.** Profil de dégradation d'une version 3FLAG-GdhZ au cours du cycle cellulaire. Les profils de dégradation de FtsZ et de CtrA servent de contrôles.

stabilité des filaments. L'effet de KidO sur FtsZ semble être dépendant de sa capacité à lier le NAD(H). Ainsi, des mutants incapables de lier le NAD(H) (D82A et R223K) ne semblent plus être capables d'interagir avec FtsZ et leur surexpression n'affecte plus la division (Radhakrishnan et al. 2010).

Nous pouvons conclure que KidO est un régulateur métabolique de la division qui d'une part retarde le recrutement de FtsZ au « *midcell* » durant la phase G1, et d'autre part déstabilise l'anneau Z durant la phase G2 pour stimuler la cytokinèse. KidO pourrait agir négativement sur FtsZ de 3 manières différentes: (i) en déstabilisant les interactions latérales entre protofilaments de FtsZ; (ii) en stimulant l'activité GTPase de FtsZ; ou (iii) en séquestrant des monomères de FtsZ et de cette manière diminuer le pool cellulaire de FtsZ disponible pour la polymérisation (Radhakrishnan et al. 2010).

1.2.4.2 Régulation du divisome par un partenaire atypique, GdhZ

Précédemment, dans notre laboratoire, un crible double hybride en levure a été réalisé dans le but de trouver de nouveaux régulateurs de la division. Lors de ce crible, FtsZ fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, fut utilisé en tant qu'appât, et une banque de fragments d'ADN génomique de *C. crescentus* fusionnés au domaine activateur de Gal4 comme proies. Parmi les candidats obtenus se trouvait un partenaire atypique, une glutamate déshydrogénase rebaptisée GdhZ.

1.2.4.2.1 Qu'est-ce qu'une glutamate déshydrogénase ?

Les glutamate déshydrogénases (GDHs) sont des enzymes liant le cycle de Krebs et le cycle de l'azote en catalysant réversiblement la déamination du glutamate en α -kétoglutarate et en ammonium s'accompagnant de la réduction d'une molécule de NAD(P)^+ selon la réaction présentée ci-dessous (**Figure 13**).



Les GDHs peuvent être classées selon différents critères, comme le cofacteur lié ou la structure/taille de l'enzyme. En effet, les GDHs des eucaryotes inférieurs ainsi que celles des procaryotes lient spécifiquement soit le NAD soit le NADP, tandis que les eucaryotes peuvent utiliser les deux. Classiquement, les enzymes liant le NAD sont impliquées dans le catabolisme tandis que celles liant le NADP sont dites anaboliques. De plus, nous pouvons classer les GDHs selon deux types structuraux : (i) les petites GDHs, qui sont hexamériques, possèdent des sous-unités d'environ 50 kDa et se subdivisent en deux groupes, les GDHs_{50I} et les GDHs_{50II}; et (ii) les grandes GDHs, tétramériques possédant des sous-unités de 115 kDa. Ces catégories structurales sont chacune présente chez des organismes appartenant à un ou plusieurs règnes du vivant. Nous pouvons trouver les GDHs_{50I} chez les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues. Les GDHs_{50II} sont présentes dans tous les règnes. Les GDHs₁₁₅ sont observées chez les δ -protéobactéries, les champignons, les euglènes et les apicomplexés. Récemment une nouvelle catégorie de GDH a été identifiée, il s'agit d'enzymes NAD-dépendantes, hexamériques, possédant des sous-unités de 180 kDa (Miñambres et al. 2000). Cette nouvelle classe a été identifiée, jusqu'à présent, exclusivement chez les eubactéries (Britton et al. 1992; Miñambres et al. 2000; Lu & Abdelal 2001; Andersson & Roger 2003).

GdhZ de *C. crescentus* fait partie de cette nouvelle classe. Malheureusement, malgré sa grande taille, seul son domaine catalytique (~1/3 de la protéine) a pu être identifié jusqu'à présent comme étant relié à une fonction connue.

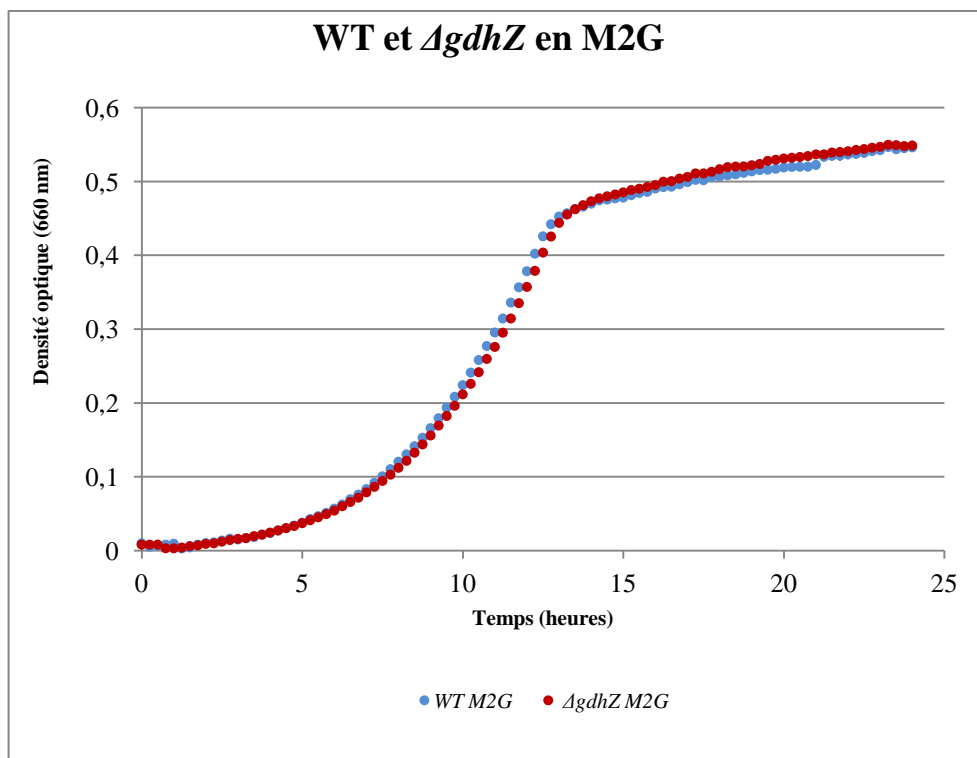
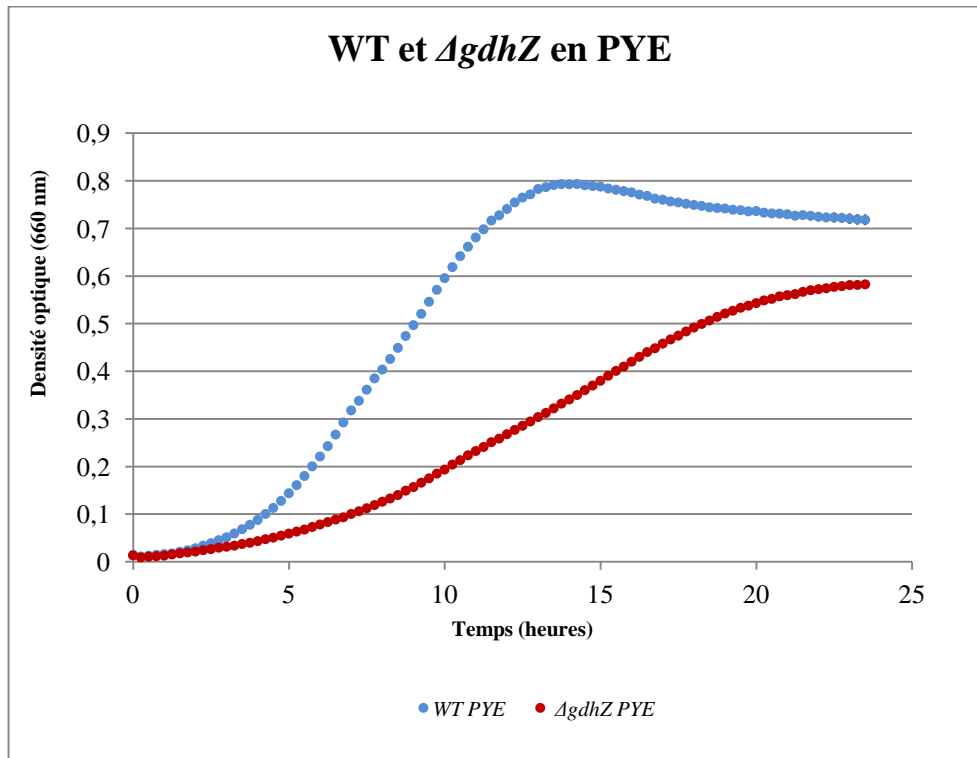


Figure 15. Courbes de croissance des souches WT et $\Delta gdhZ$ de *Caulobacter crescentus*. La croissance des souches WT et $\Delta gdhZ$, dans un milieu PYE (haut) ou M2 glucose (bas), a été suivie pendant 24 heures à une température de 30°C. La densité optique à une longueur d'onde de 660 nm a été mesurée pour chaque souche toutes les 15 minutes. Pour les deux graphiques, la souche WT est illustrée en bleu et la souche $\Delta gdhZ$ en rouge.

1.2.4.2.2 La glutamate déshydrogénase de *Caulobacter crescentus*

Sur base de l'interaction entre FtsZ et GdhZ en Y2H, le lien possible entre division et métabolisme a été étudié.

Tout d'abord, cette interaction a été confirmée lors d'une expérience de co-immunoprécipitation. Ensuite, une fusion traductionnelle GdhZ-GFP a permis de mettre en évidence une localisation de GdhZ au « *midcell* » de la plupart des cellules prédivisionnelles (**Figure 14A**). Enfin, à l'instar de KidO, GdhZ est également régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, l'extrémité C-terminale de GdhZ ressemble au tag SsrA suggérant une dégradation ClpXP-dépendante (**Figure 14B**). En outre, le suivi de l'abondance de GdhZ au cours du cycle cellulaire indique que cette protéine disparaît de manière transitoire en milieu de cycle cellulaire (**Figure 14C**). D'autres données obtenues au laboratoire (F. Beaufay, thèse en cours) montrent l'implication de la protéase ClpXP dans la disparition transitoire de GdhZ (données non montrées).

Afin d'étudier l'impact de GdhZ sur le cycle cellulaire, une souche de délétion pour *gdhZ* a été réalisée chez *C. crescentus*. Un mutant Δ *gdhZ* présente un retard de croissance en milieu complexe PYE (*Peptone Yeast Extract*) en comparaison à la souche WT (**Figure 15**). Bien que la composition exacte du PYE soit inconnue, nous pouvons souligner que de nombreux acides aminés y sont présents et en particulier le glutamate. Par contre, dans un milieu synthétique (M2) supplémenté avec une source unique de carbone tel que le glucose (M2G), la croissance du mutant est comparable à celle de la WT (**Figure 15**). Etant donné la fonction présumée de GdhZ, un mutant Δ *gdhZ* est incapable de cataboliser le glutamate comme source de carbone. En effet, la souche Δ *gdhZ* est incapable de croître dans un milieu synthétique ne contenant que du glutamate comme source de carbone (M2E). En outre, cette donnée supporte que GdhZ est la seule GDH chez *C. crescentus* permettant la catabolisme du glutamate.

La souche Δ *gdhZ* présente également une morphologie altérée par rapport à une souche WT suggérant un défaut de division. En effet, nous pouvons observer des petites cellules et des filaments suggérant que GdhZ pourrait avoir un rôle dans l'homéostasie de la taille des cellules. De plus, nous constatons une accumulation de cellules prédivisionnelles tardives chez le mutant Δ *gdhZ* ainsi qu'une division cellulaire retardée (**Figure 16A**). Ce défaut de morphologie peut cependant être partiellement contré par l'expression constitutive d'une fusion *ftsZ-yfp* (**Figure 16B**). Enfin, bien que la capacité à former un l'anneau Z ne soit pas affectée, il semble que le timing de recrutement soit perturbé. En effet, pas moins de 90% des cellules Δ *gdhZ* exprimant une fusion FtsZ-YFP forment un anneau Z au « *midcell* » contre seulement 75% dans la souche sauvage. Cette donnée suggère que FtsZ est prématurément recruté au « *midcell* » en absence de GdhZ puisqu'à peine 10% des cellules en G1 présentent une localisation polaire de FtsZ. (**Figure 17A et B**).

1.2.4.2.3 Relation entre KidO, GdhZ et FtsZ

Pour rappel, KidO agit sur FtsZ à deux moments différents du cycle cellulaire. Premièrement, lors du recrutement de FtsZ au centre de la cellule durant la transition G1-S, dès lors que l'anneau Z est formé prématurément dans les cellules Δ *kidO*. KidO intervient ensuite à l'étape de la constriction cellulaire pour faciliter la séparation des deux cellules filles. Pour réaliser ces tâches, KidO doit obligatoirement lier son cofacteur NAD(H). En considérant que (i) GdhZ interagit avec FtsZ ; (ii) le mutant Δ *gdhZ* présente certaines similarités avec le mutant Δ *kidO*, notamment en terme de recrutement précoce de FtsZ au « *midcell* » et de difficulté pour les cellules prédivisionnelles tardives à se séparer en fin de division ; et que (iii) GdhZ réduit le NAD⁺ en NADH + H⁺ en

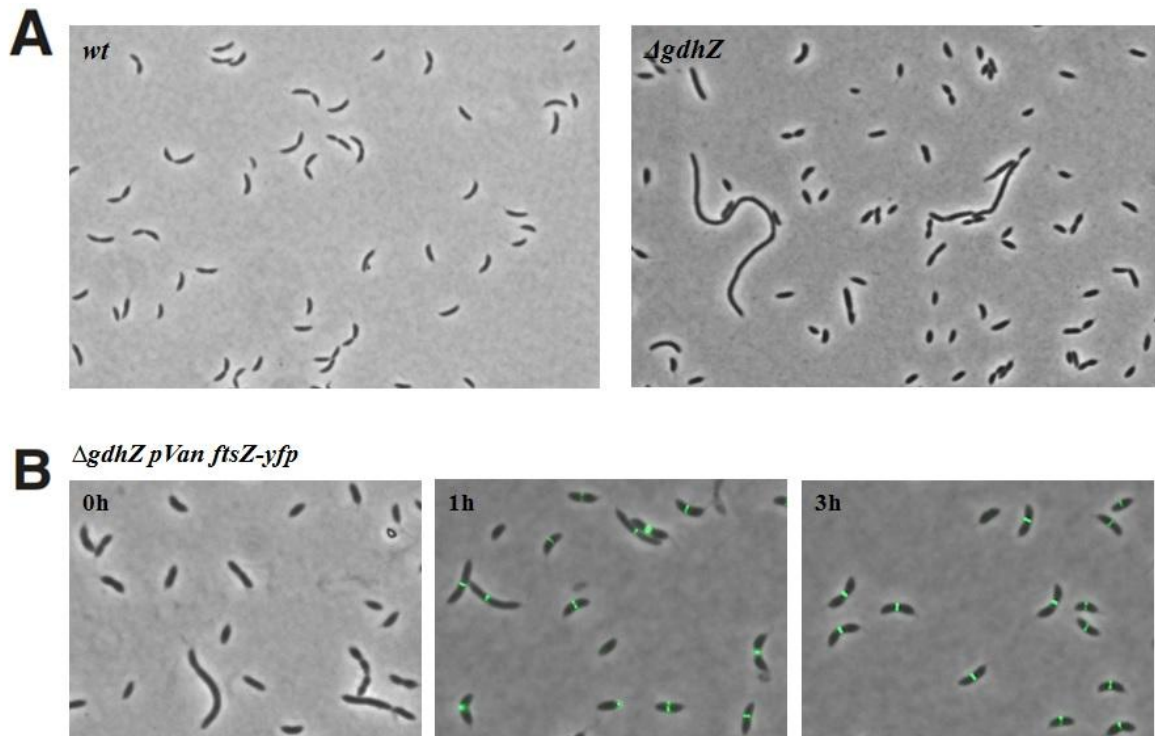


Figure 16. Micrographies de *Caulobacter crescentus*. **A.** Morphologie de la souche WT (à gauche) et de la souche $\Delta gdhZ$ avec des petites cellules et des filaments (à droite). **B.** Micrographies illustrant la localisation de FtsZ suite à l'induction au vanillate d'une fusion *ftsZ-yfp* dans une souche $\Delta gdhZ$. Nous pouvons observer que le phénotype du mutant est partiellement rétabli après 3h.

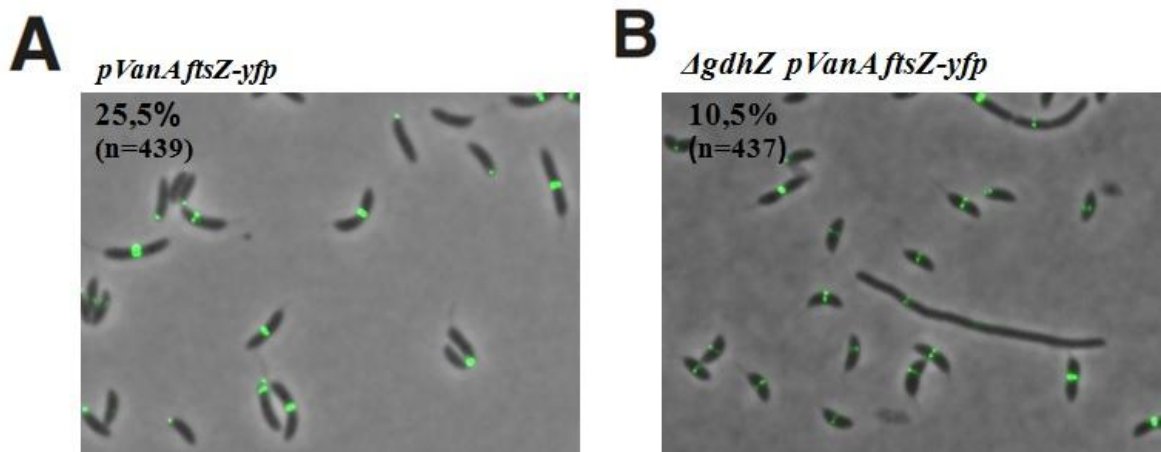


Figure 17. Localisation de FtsZ dans la souche WT (A) et dans la souche $\Delta gdhZ$ (B). Micrographies illustrant la localisation de FtsZ suite à l'induction au vanillate d'une fusion *ftsZ-yfp* dans les souches sauvage et $\Delta gdhZ$. Les pourcentages indiquent la proportion de la population présentant une localisation polaire de FtsZ-YFP, n étant le nombre total de cellules dénombrées.

catalysant la conversion du glutamate en α -kétoglutarate et en NH_4^+ ; nous émettons l'hypothèse que le défaut de division des cellules ΔgdhZ pourrait être attribué, au moins en partie, à KidO. En effet, KidO pourrait percevoir le statut énergétique de la cellule en recevant le NAD(H) directement de GdhZ et dès lors interférer ou non avec FtsZ. Notons, toutefois, que les expériences réalisées *in vitro* avec GdhZ et FtsZ suggèrent que GdhZ agit sur FtsZ au moins d'une manière KidO-indépendante.

C'est après toutes ces observations que nous avons décidé d'étudier les différents types de relations que FtsZ, GdhZ et KidO pourraient entretenir chez *Caulobacter crescentus*.

Objectifs

2. Objectifs

Précédemment, une régulation de GdhZ sur la division cellulaire a été mise en évidence. Ce lien direct et/ou indirect entre GdhZ et FtsZ est en cours de caractérisation. KidO, quant-à elle, est une oxidoréductase dont la liaison au NAD(H) est essentielle à sa fonction de régulateur négatif de FtsZ. Etant donné que (i) GdhZ est une glutamate déshydrogénase NAD-dépendante et qu'aucune réaction enzymatique n'a pu être attribuée à KidO ; (ii) GdhZ et KidO interagissent avec FtsZ et présentent un profil similaire de dégradation au cours du cycle cellulaire faisant intervenir les mêmes acteurs de protéolyse; (iii) la délétion de *gdhZ* ou de *kidO* conduit à des phénotypes comparables (*i.e.* recrutement précoce de FtsZ), nous avons émis les hypothèses suivantes: GdhZ pourrait interférer avec FtsZ par l'intermédiaire de KidO ou les deux protéines agiraient de concert pour réguler le processus de division en fonction de la disponibilité en nutriments. L'objectif principal de ce mémoire est donc de savoir si les caractéristiques du mutant Δ *gdhZ* pourraient être associées à KidO et/ou inversement.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence précédemment qu'une surexpression de *ftsZ* permet de restaurer partiellement une morphologie normale d'un mutant Δ *gdhZ*. Néanmoins, parce que la fusion *ftsZ-yfp* utilisée pour cette expérience n'est pas une version totalement fonctionnelle de FtsZ, nous voudrions également confirmer ces résultats avec une version complètement fonctionnelle de FtsZ et par la même occasion tester l'effet de la surexpression de *ftsZ*_{E79K}, une version de FtsZ insensible à KidO.

Résultats

Plasmides d'intérêt	Souches cibles
pXC5- <i>kidO</i>	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}\Delta_{gdhZ}$
	<i>ftsZ</i> _{E79K} $\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
pXC5- <i>kidO</i> _{DD}	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}\Delta_{gdhZ}$
	<i>ftsZ</i> _{E79K} $\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
pXCHYC5- <i>kidO</i>	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
	$\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}\Delta_{gdhZ}$
	3FLAG-CC0088 $\Delta_{xylX}\Delta_{kidO}$
pXC5- <i>ftsZ</i>	Δ_{xylX}
	$\Delta_{xylX}\Delta_{gdhZ}$
pXC5- <i>ftsZ</i> _{E79K}	Δ_{xylX}
	$\Delta_{xylX}\Delta_{gdhZ}$

Table 1. Plasmides d'intérêts et souches dans lesquelles ils ont été transféré par croisement.

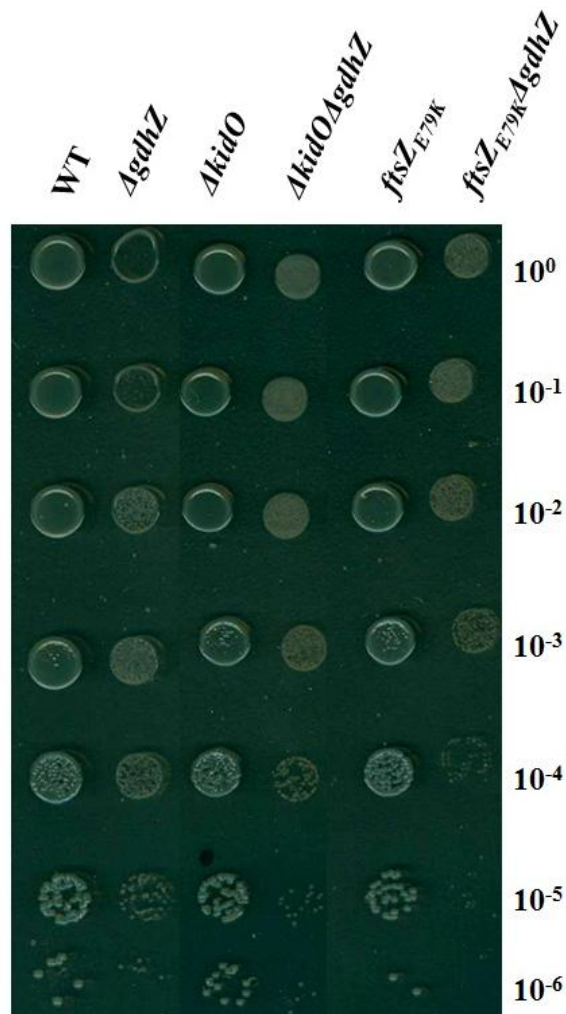


Figure 18. Dilutions sériées des souches WT, *AgdhZ*, Δ_{kidO} , $\Delta_{gdhZ}\Delta_{kidO}$, *ftsZ*_{E79K} et *ftsZ*_{E79K} Δ_{gdhZ} sur PYE agar. Les cultures des souches cultivées « overnight » ont été amenées à une densité optique à 660 nm (DO^{660}) de 0.2. Elles ont ensuite été diluées en série et 5 μ l de chacune des dilutions ont été déposés sur un milieu PYE agar. Après 3 jours d'incubation à 30°C, une photo de la boîte a été prise.

3. Résultats

Afin de mettre en évidence un lien possible entre GdhZ et KidO, nous tenterons de répondre à plusieurs questions :

- 1) Puisque les phénotypes des mutants $\Delta gdhZ$ et $\Delta kidO$ présentent certaines similarités, nous voudrions savoir si le phénotype du mutant $\Delta gdhZ$ est KidO-dépendant. En d'autres termes, est-ce que l'action de GdhZ sur FtsZ pourrait être attribué à KidO ?
- 2) Etant donné que les deux protéines interagissent avec FtsZ et sont présentes au niveau du Z-ring au même moment, nous souhaiterions savoir si elles interagissent ensemble.
- 3) Pour savoir si l'effet de KidO sur FtsZ dépend de GdhZ, nous avons surexprimé *kidO* et sa version stabilisée (*kidO_{DD}*) dans des souches *gdhZ⁺* et $\Delta gdhZ$.
- 4) Dans le même ordre d'idées que le point précédent, nous avons voulu savoir si la localisation de KidO dépend de la présence de GdhZ en exprimant une fusion KidO-mCherry dans les souches *gdhZ⁺* et $\Delta gdhZ$.
- 5) Enfin, nous voulions confirmer que la surexpression d'une version fonctionnelle de *ftsZ* peut pallier au défaut morphologique du mutant $\Delta gdhZ$ et observer les effets d'une surexpression de *ftsZ_{E79K}* sur cette même souche.

3.1 Constructions plasmidiques

Pour répondre à ces différentes questions, plusieurs constructions plasmidiques ont été réalisées et utilisées: pXC5-*ftsZ*, pXC5-*ftsZ_{E79K}*, pXC5-*kidO*, pXC5-*kidO_{DD}*, pXCHYC5-*kidO*. Les plasmides pXC5 et pXCHYC5 expriment un marqueur de résistance à la tétracycline. Le pXCHYC5 possède une séquence codante pour la protéine fluorescente mCherry (création d'une fusion en C-terminale du gène d'intérêt). Ce dernier sera donc exclusivement utilisé dans les expériences de localisation tandis que le pXC5 permettra de contrôler l'expression de versions fonctionnelles des différents candidats. Selon les manipulations à réaliser, les plasmides contiendront les séquences codantes de *ftsZ*, *ftsZ_{E79K}*, *kidO* ou *kidO_{DD}*. Ces plasmides s'intégreront au locus *xyIX* après un simple recombinaison, ce qui placera le gène d'intérêt sous contrôle du promoteur P_{*xyIX*}, inductible au xylose. Parce que le xylose est une des sources de carbone pouvant pallier au défaut morphologique et métabolique du mutant $\Delta gdhZ$, toutes les souches construites au cours de ce travail sont dépourvues du gène *xyIX* empêchant le catabolisme du xylose mais toujours sensible à l'induction². Notons également que les plasmides permettant l'expression de *kidO* ou *kidO_{DD}* ont été insérés dans des souches $\Delta kidO$ afin d'éviter l'effet létal de la surexpression de *kidO*.

Afin d'obtenir ces plasmides, plusieurs étapes ont été nécessaires. Tout d'abord, les séquences codantes des gènes d'intérêts (*ftsZ*, *ftsZ_{E79K}*, *kidO* ou *kidO_{DD}*) ont été amplifiées à partir d'ADN génomique par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant en amont et aval de la séquence cible (voir M&M); clonées et séquencées afin de vérifier l'absence de mutations non désirées ; et finalement sous-clonées dans les vecteurs adéquats (pXC5 et pXCHYC5) Les plasmides recombinants ont ensuite été transférés par croisement dans plusieurs souches de *Caulobacter crescentus* (**Table 1**).

² Notons que la délétion du gène *xyIX* dans les souches WT et $\Delta gdhZ$ ne change rien aux phénotypes des souches si ce n'est qu'elles sont incapables de métaboliser le xylose.

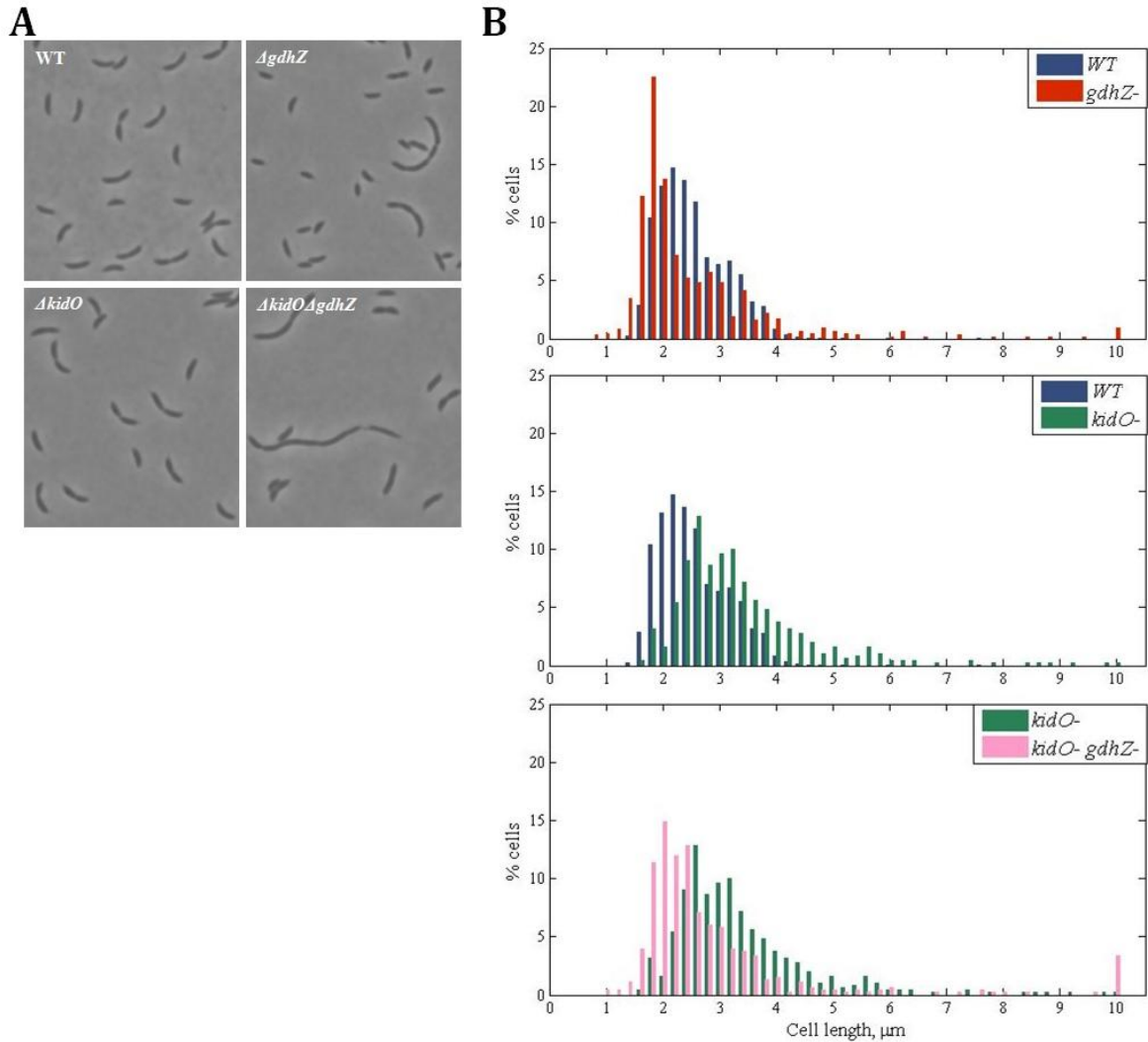


Figure 19. Micrographies et distributions de taille des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$ et $\Delta kidO \Delta gdhZ$. A. Les différentes souches sont cultivées en milieu PYE « overnight » et diluées dans du milieu frais le matin suivant. Les micrographies sont obtenues avec un microscope électronique pendant la phase de croissance exponentielle (densité optique à 660 nm entre 0,2 et 0,6). B. Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les distributions de taille de la souche WT (bleu) en comparaison à la souche $\Delta gdhZ$ (rouge) ; de la souche WT (bleu) en comparaison à la souche $\Delta kidO$ (vert); de la souche $\Delta kidO$ (vert) en comparaison à la souche $\Delta kidO \Delta gdhZ$ (rose) sont respectivement illustrées dans les graphiques du haut, du milieu et du bas.

3.2 GdhZ agit-elle sur FtsZ de manière KidO-dépendante ?

Pour répondre à cette question, nous avons d'abord comparé la croissance des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$ et $\Delta gdhZ\Delta kidO$, ainsi que celle des souches $ftsZ_{E79K}$ et $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$. Ensuite, nous avons analysé leur morphologie et la distribution de taille des différentes populations cellulaires. Pour rappel, $FtsZ_{E79K}$ est insensible à KidO (Radhakrishnan et al. 2010). Donc si la combinaison de $ftsZ_{E79K}$ et de $\Delta gdhZ$ résulte en une aggravation du phénotype de la souche $ftsZ_{E79K}$, cela signifiera que GdhZ agit sur FtsZ au moins d'une façon KidO-indépendante.

3.2.1 Croissance des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$, $\Delta gdhZ\Delta kidO$, $ftsZ_{E79K}$ et $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$ en PYE

La croissance des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$, $\Delta gdhZ\Delta kidO$, $ftsZ_{E79K}$ et $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$ a été testée sur milieu solide PYE. Pour cela, les cultures, à même densité optique, des différentes souches ont été diluées en série et des gouttes de ces dilutions ont été déposées sur PYE agar. La taille des colonies a ensuite été évaluée après deux jours de croissance à 30°C (**Figure 18**).

Comme nous pouvons le voir sur la **figure 18**, les simples mutants $\Delta kidO$ et $ftsZ_{E79K}$ présentent une croissance similaire à la souche WT. De la même façon, le double mutant $\Delta gdhZ\Delta kidO$ montre une croissance comparable à celle du simple mutant $\Delta gdhZ$, à savoir l'apparition de colonies plus petites que celles de la souche WT mais aucune différence dans le nombre de « Colony Forming Units » (CFU). Il semble donc que le problème métabolique du mutant $\Delta gdhZ$ impose le taux de croissance de la souche $\Delta gdhZ\Delta kidO$ et que la délétion additionnelle de $kidO$ n'aggrave pas cette croissance. Nous pouvons de plus constater que le mutant $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$ présente une croissance aussi lente que le mutant $\Delta gdhZ$ (petites colonies) mais un nombre réduit de CFU. Ces premières données suggèrent donc que GdhZ agit sur FtsZ au moins d'une manière KidO-indépendante.

3.2.2 Morphologie et distributions de taille des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$, $\Delta gdhZ\Delta kidO$, $ftsZ_{E79K}$ et $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$

Des micrographies des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$, $\Delta gdhZ\Delta kidO$, $ftsZ_{E79K}$ et $ftsZ_{E79K}\Delta gdhZ$ ont été réalisées pendant la phase de croissance exponentielle des bactéries (DO^{660} entre 0.2 et 0.6). Elles ont ensuite été analysées afin d'obtenir des graphiques de distribution de taille à l'aide du programme MicrobeTracker (<http://microbetracker.org/>) développé dans le laboratoire de Christine Jacobs-Wagner (Sliusarenko et al. 2011).

Comme l'illustre la **figure 19**, le mutant $\Delta kidO$ présente une morphologie légèrement allongée en comparaison avec la souche WT comme décrit dans la littérature (Radhakrishnan et al. 2010). En outre, le mutant $\Delta gdhZ$ présente une distribution de taille très hétérogène, avec une population globalement plus petite mais avec des filaments de taille très variée. Cependant, la combinaison des deux mutations n'aggrave en rien le phénotype du mutant $\Delta gdhZ$, suggérant que la délétion de $gdhZ$ est épistatique sur la délétion de $kidO$.

En outre, la combinaison des mutations $\Delta gdhZ$ et $ftsZ_{E79K}$ ³ engendre une filamentation beaucoup plus importante que celle détectée dans les simples mutants (**Figure 20**), ce qui montre à nouveau que GdhZ agit sur FtsZ d'une manière indépendante de KidO. Néanmoins, ces résultats n'excluent pas que GdhZ puisse agir aussi sur FtsZ de manière KidO-dépendante.

³ Pour rappel, $ftsZ_{E79K}$ est insensible à l'effet inhibiteur de KidO (Radhakrishnan et al. 2010)

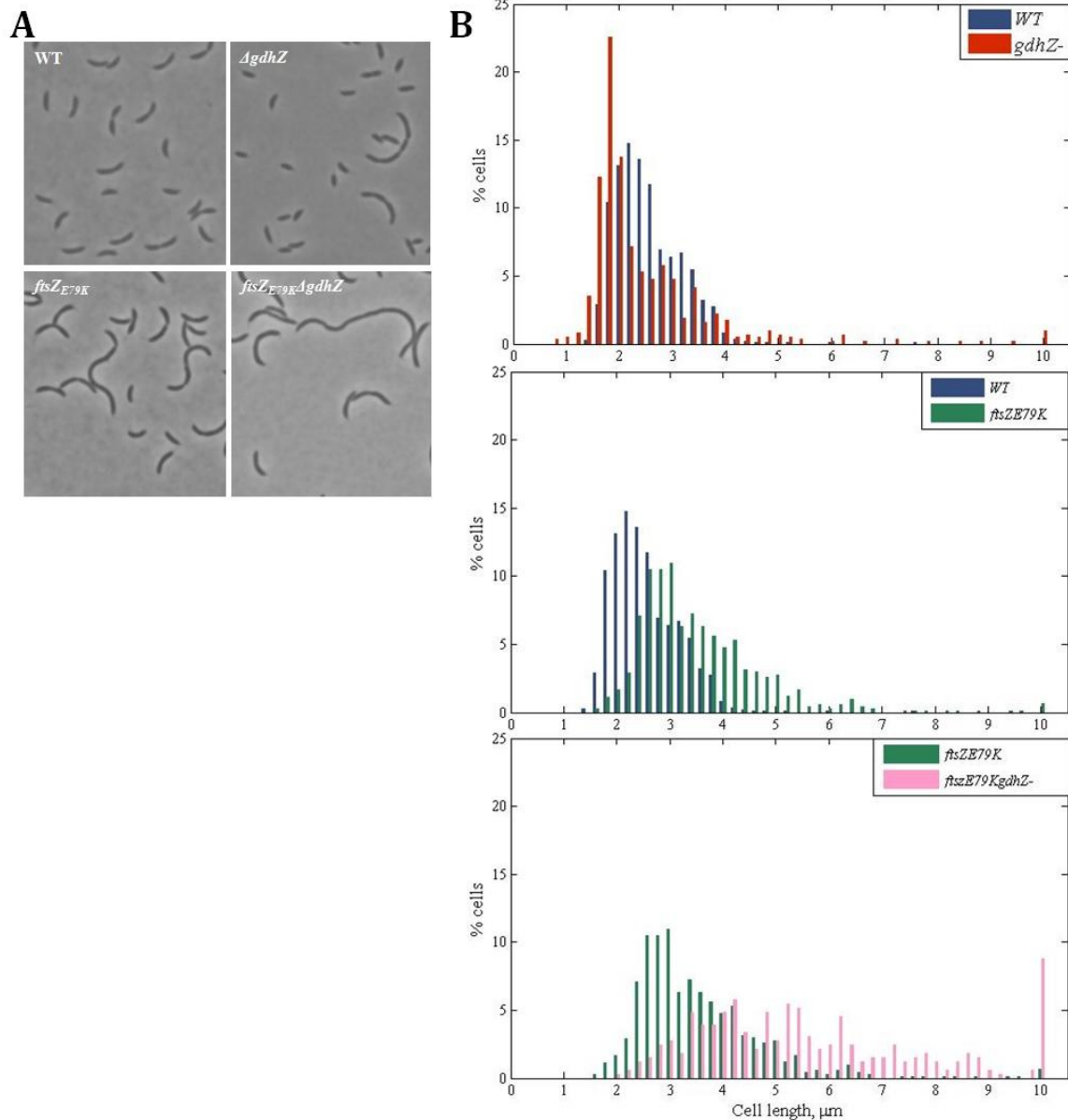


Figure 20. Micrographies et distributions de taille des souches WT, $\Delta gdhZ$, $\Delta kidO$, $fisZ_{E79K}$ et $fisZ_{E79K}\Delta gdhZ$. A. Les différentes souches sont cultivées en milieu PYE « overnight » et diluées dans du milieu frais le matin suivant. Les micrographies sont obtenues avec un microscope électronique pendant la phase de croissance exponentielle (densité optique à 660 nm entre 0,2 et 0,6). B. Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les distributions de taille de la souche WT (bleu) en comparaison à la souche $\Delta gdhZ$ (rouge) ; de la souche WT (bleu) en comparaison à la souche $fisZ_{E79K}$ (vert) ; de la souche $fisZ_{E79K}$ (vert) en comparaison à la souche $fisZ_{E79K}\Delta gdhZ$ (rose) sont respectivement illustrées dans les graphiques du haut, du milieu et du bas.

3.3 GdhZ et KidO font-elles partie du même complexe?

Comme GdhZ et KidO interagissent toutes deux avec FtsZ, il est possible que ces deux protéines fassent partie du même complexe protéique. Pour savoir si c'est le cas, nous avons réalisé une expérience de co-immunoprécipitation avec la souche *3FLAG-GdhZ ΔxylXAkidO pXCHYC5-kidO* (Figure 21). Tout d'abord, l'expression de KidO-mCherry a été induite par ajout de xylose pendant 2 heures. Après induction, les cellules sont lysées et une extraction protéique est réalisée (voir M&M). Un échantillon du lysat est prélevé et constituera l'« input » (IN) pour le western blot réalisé en fin d'expérience afin de comparer les quantités de protéines engagées. Ensuite, le lysat cellulaire est mis en présence de billes magnétiques « coatées » avec un anticorps anti-3FLAG. Après incubation, les billes sont soumises à plusieurs lavages afin d'éliminer les protéines non-liées. Suite à ces lavages, ne subsisteront, normalement, plus que les liaisons spécifiques, c'est-à-dire 3FLAG-GdhZ accompagnées des protéines qui lui sont liées. Enfin, 3FLAG-GdhZ et les protéines associées sont éluées par compétition avec un excès de peptides 3FLAG constituant ainsi l'« output » (IP). Un western blot anti-GdhZ et anti-mCherry est réalisé avec les échantillons protéiques IN et IP.

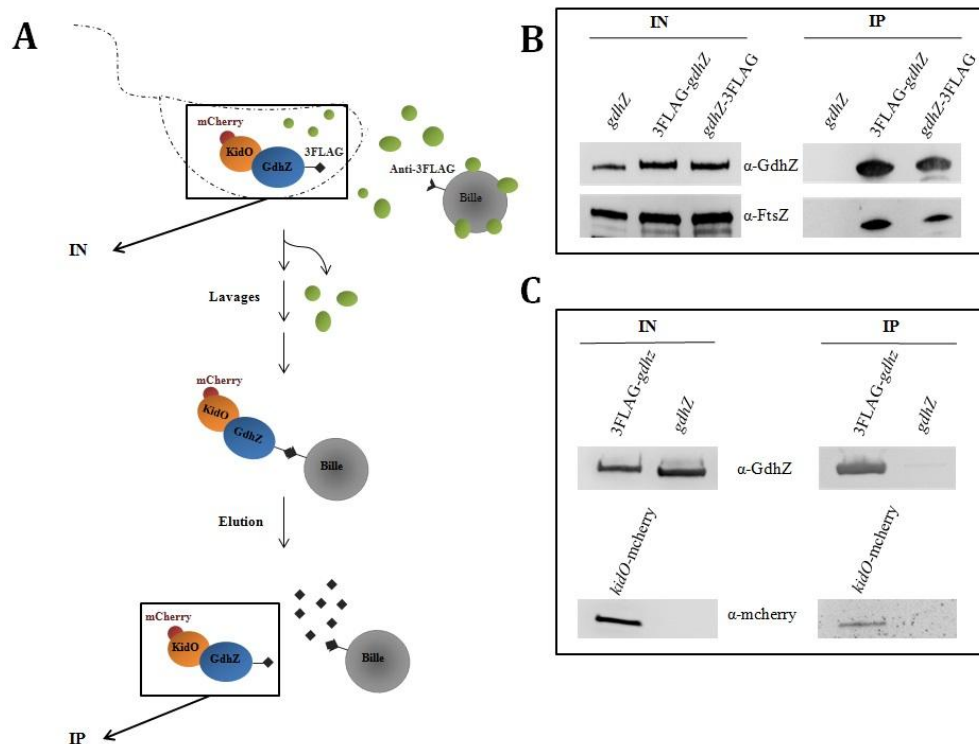


Figure 21. Expérience de co-immunoprécipitation. A. Schéma illustratif des étapes principales de la co-immunoprécipitation dans le cas où KidO et GdhZ font partie d'un même complexe protéique. B. La figure représente un western-blot anti-GdhZ (ligne supérieure) et anti-FtsZ (ligne inférieure) effectué sur des échantillons IN et IP d'une expérience de co-immunoprécipitation réalisée respectivement avec les souches WT, 3FLAG-GdhZ et GdhZ-3FLAG afin de démontrer une interaction physique entre GdhZ et FtsZ. La souche GdhZ-3FLAG est utilisée pour vérifier qu'une version stabilisée de la glutamate déhydrogénase (tag en C-terminal) est également capable d'interagir avec FtsZ. C. Western-blot anti-GdhZ (ligne supérieure) et anti-mCherry (ligne inférieure) réalisé sur des échantillons « input » (IN) et « output » (IP) de la souche *3FLAG-GdhZ ΔxylXAkidO pXCHYC5-kidO* (à gauche dans l'IN et de l'IP) et de la souche WT (à droite dans l'IN et dans l'IP).

La révélation à l'aide de l'anticorps anti-mCherry montre au niveau de l'échantillon IP de la souche *3FLAG-GdhZ ΔxylXAkidO pXCHYC5-kidO* que GdhZ et KidO ont bien été co-immunoprécipitées.

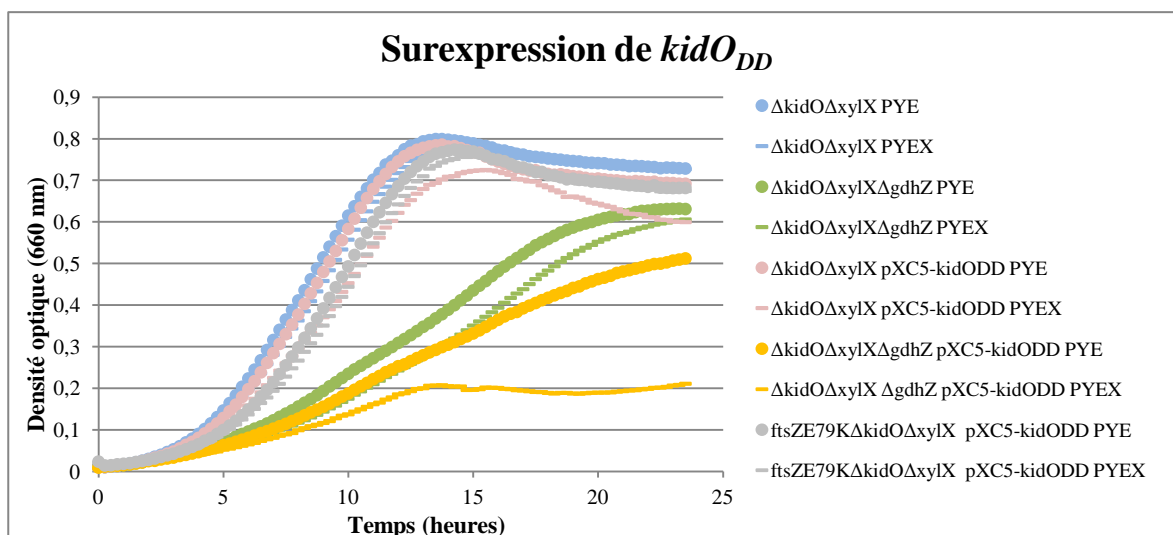
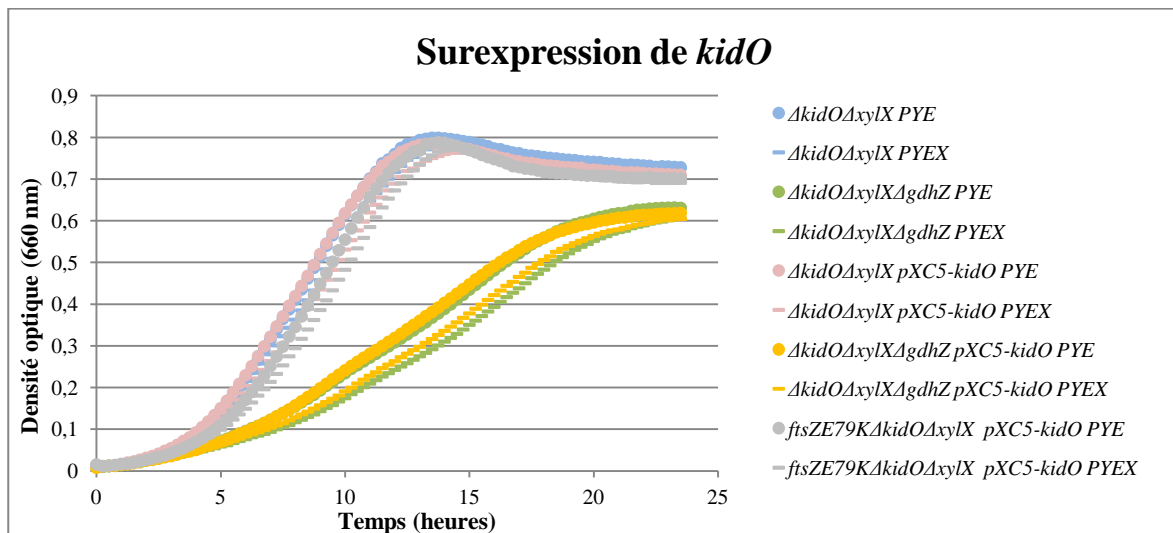


Figure 22. Courbes de croissance des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ surexprimant *kidO* ou *kidO_{DD}*. La croissance des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$, dans lesquelles nous avons induit la surexpression de *kidO* (haut) et de *kidO_{DD}* (bas), a été suivie pendant 24 heures à une température de 30°C (courbes roses et jaunes). La densité optique à une longueur d'onde de 660 nm a été mesurée pour chaque souche toutes les 15 minutes. Pour les deux graphiques, les courbes construites avec des ronds représentent la croissance dans le milieu PYE et les courbes composées de lignes représentent la croissance dans le milieu PYE xylose (0.1%) (induction). Les courbes bleues, vertes et grises correspondent à la croissance des trois souches contrôles.

3.4 KidO agit-elle sur FtsZ de manière GdhZ-dépendante ?

Puisque le mutant $\Delta kidO$ présente un phénotype similaire à celui du mutant $\Delta gdhZ$, il se pourrait que la régulation de KidO sur FtsZ soit GdhZ-dépendante. Pour savoir si c'est le cas, nous avons testé la surexpression de $kidO$ ou $kidO_{DD}$ dans des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ et observé la croissance, la morphologie et la distribution de taille de ces souches. Les contrôles utilisés pour ces tests sont d'une part les souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ servant de référence et d'autre part les souches $ftsZ_{E79K}\Delta xylX\Delta kidO pXC5-kidO$ et $ftsZ_{E79K}\Delta xylX\Delta kidO pXC5-kidO_{DD}$. Ces deux dernières souches ont été incluses en tant que contrôles négatifs dès lors que $ftsZ_{E79K}$ résiste à la surexpression de $kidO$ ou $kidO_{DD}$ (Radhakrishnan et al. 2010).

3.4.1 Croissance en PYE-PYEX

La croissance des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$, dans lesquelles $kidO$ ou $kidO_{DD}$ sont exprimés après induction, a été suivie en milieu PYE ou PYE xylose (0.1%) (**Figure 22**).

Comme nous pouvons le voir sur le graphique du haut, l'induction au xylose de la surexpression de $kidO$ ne semble pas influencer la croissance des souches. En ce qui concerne la surexpression de $kidO_{DD}$, nous constatons que la souche $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ semble plus sensible avec un arrêt complet de la croissance. Notons que cette expérience n'est considérée que comme un contrôle. En effet, la surexpression de $kidO$ induit un arrêt de la division et donc une filamentation, ce qui n'est pas observable avec cette expérience puisqu'on se contente de mesurer la densité optique et que nous savons que la croissance persiste dans ces souches.

3.4.2 Morphologie et distributions de taille

Des micrographies des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$, dans lesquelles $kidO$ ou $kidO_{DD}$ est surexprimé ont été prises après 1h et 3h d'induction au xylose (0.1%), et comparées à celles prises avant induction (0h). Ces micrographies ont ensuite été analysées afin d'obtenir des graphiques de distribution de taille (**Figures 23 et 24**).

Sur le **figure 23B**, nous pouvons percevoir une très légère augmentation de taille de la population $\Delta xylX\Delta kidO pXC5-kidO$ après induction au xylose. *A contrario*, en ce qui concerne la souche $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ pXC5-kidO$, nous constatons clairement une filamentation des cellules après induction au xylose à la fois sur les micrographies (**figure 23A**) et sur le graphique (**figure 23B**). Cette filamentation indique que la souche $\Delta gdhZ$ est particulièrement sensible à la surexpression de $kidO$.

Notons préalablement que la surexpression de $kidO_{DD}$ a des effets plus drastiques que celle de $kidO$ (Radhakrishnan et al. 2010). Dans le **figure 24**, nous observons, après 3 heures d'induction, que la surexpression de $kidO_{DD}$ mène à une filamentation dans les deux souches. Cependant, cette filamentation est nettement plus sévère pour la souche $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ suggérant, comme pour la surexpression de $kidO$, un effet additif de la délétion de $gdhZ$ et de la surexpression de $kidO_{DD}$.

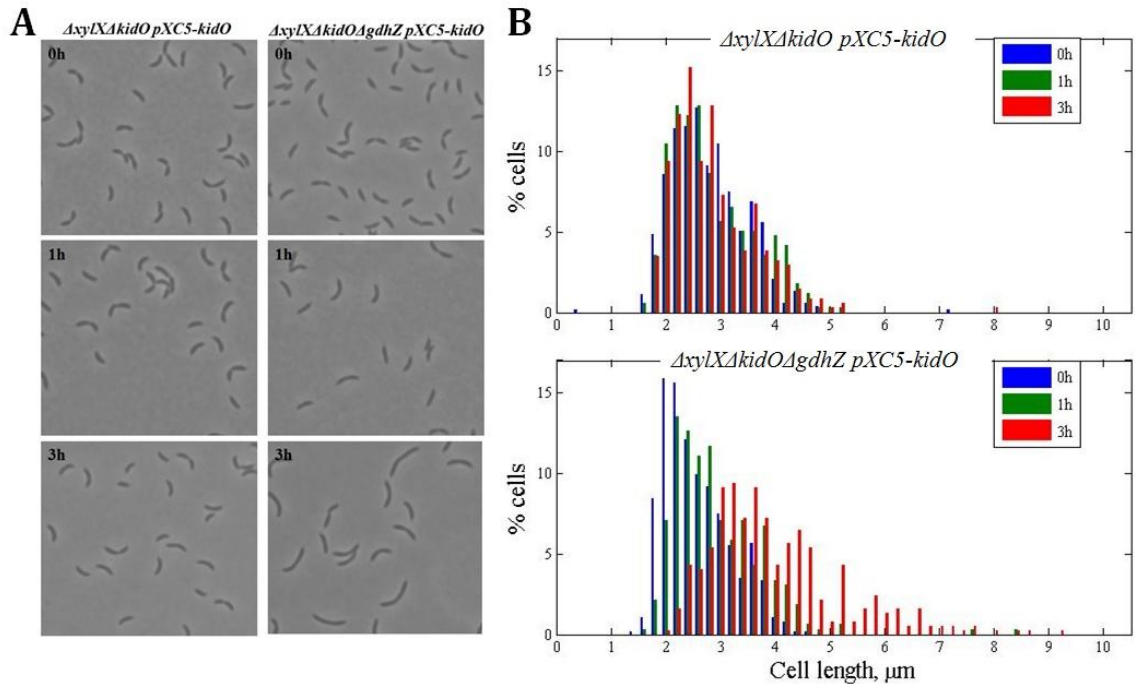


Figure 23. Micrographies et distributions de taille des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ surexprimant $kidO$. **A.** Les deux souches ont été cultivées en PYE jusqu'en milieu de phase exponentielle avant d'induire la surexpression de $kidO$ par l'ajout de xylose (0.1%). **B.** Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les graphiques représentent la distribution de taille des souches $\Delta xylX\Delta kidO pXC5-kidO$ (haut) et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ pXC5-kidO$ (bas) 0h (bleu), 1h (vert) et 3h (rouge) après induction.

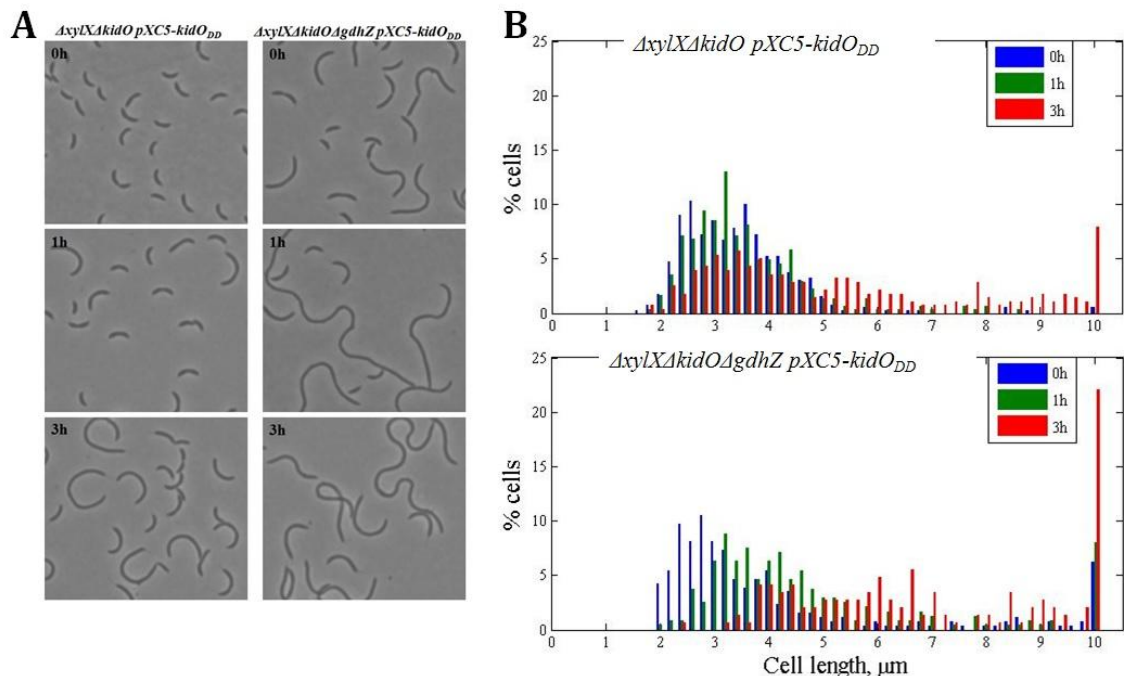


Figure 24. Micrographies et distributions de taille des souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ surexprimant $kidO_{DD}$. **A.** Les deux souches ont été cultivées en PYE jusqu'en milieu de phase exponentielle avant d'induire la surexpression de $kidO_{DD}$ par l'ajout de xylose (0.1%). **B.** Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les graphiques représentent la distribution de taille des souches $\Delta xylX\Delta kidO pXC5-kidO_{DD}$ (haut) et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ pXC5-kidO_{DD}$ (bas) 0h (bleu), 1h (vert) et 3h (rouge) après induction.

La **table 2** représente les moyennes et les écarts-type des distributions de taille de ces 4 souches (**Figures 23 et 24**). Dans chacune d'elles, nous pouvons observer une augmentation de la moyenne des tailles des cellules de la population après induction au xylose. Les écarts-type, quant à eux, dépeignent de l'hétérogénéité des populations cellulaires à chacun des temps étudiés. Notons les valeurs particulièrement importantes des écarts-type des souches surexprimant *kidO_{DD}*.

	Temps après induction au xylose	Moyenne	Ecart-type	Nombre de cellules analysées
<i>ΔxylXΔkidO pXC5-kidO</i>	0h	2.7958	0.68533	536
	1h	2.8488	0.74099	335
	3h	2.8611	0.77052	342
<i>ΔxylXΔkidOΔgdhZ pXC5-kidO</i>	0h	2.579	0.60275	654
	1h	2.9218	0.81355	325
	3h	3.9874	1.232	373
<i>ΔxylXΔkidO pXC5-kidO_{DD}</i>	0h	3.4786	1.5229	399
	1h	3.5601	1.1088	307
	3h	5.4983	2.7196	279
<i>ΔxylXΔkidOΔgdhZ pXC5-kidO_{DD}</i>	0h	4.5596	4.2065	258
	1h	5.2285	3.6047	238
	3h	8.1333	5.1308	145

Table 2. Moyennes et écarts-type des distributions de taille des souches *ΔxylXΔkidO* et *ΔxylXΔkidOΔgdhZ* surexprimant *kidO* et *kidO_{DD}*.

L'ensemble de ces données suggèrent donc que les cellules dépourvues de *gdhZ* sont plus sensibles à la surexpression de *kidO*.

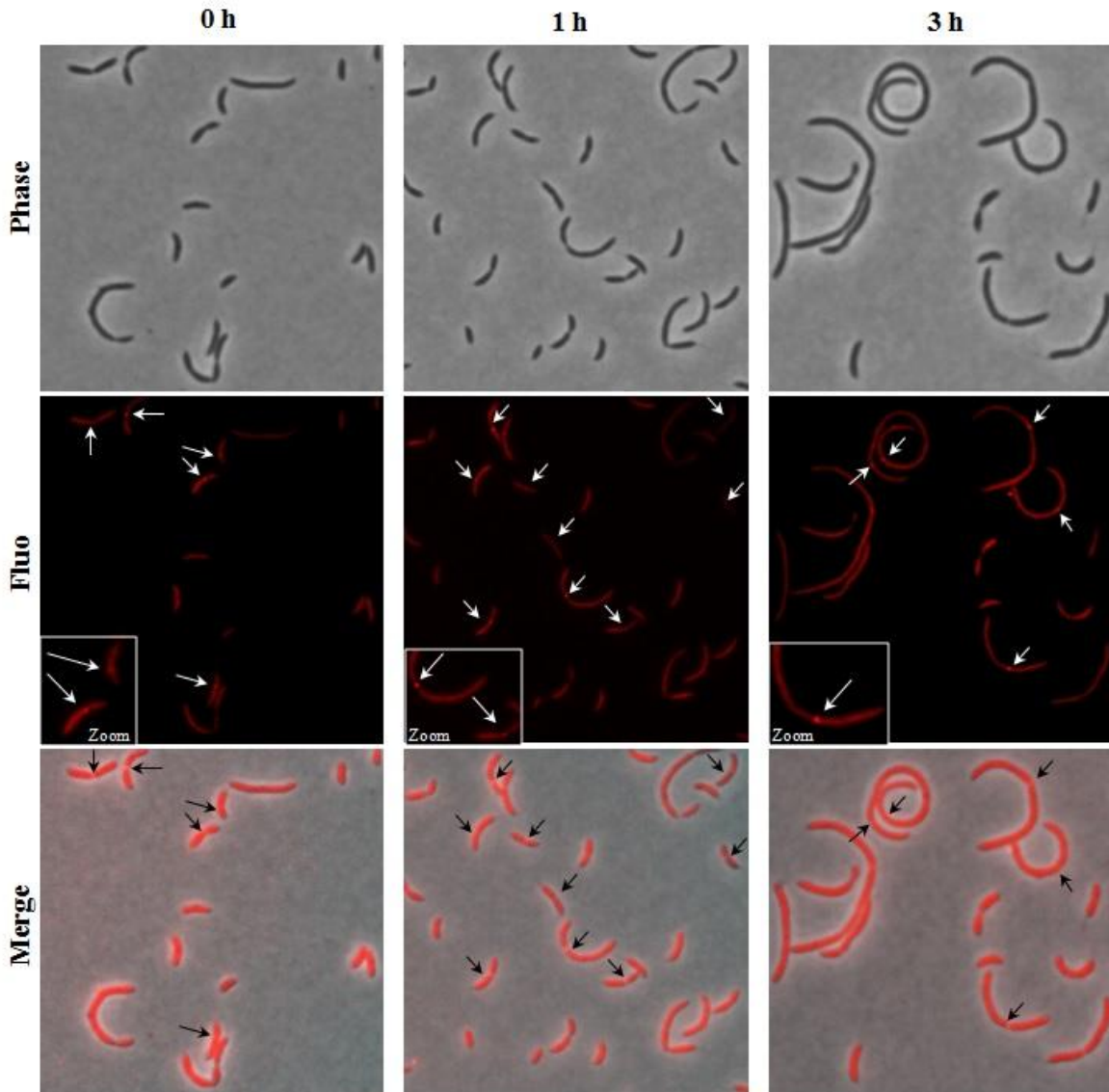


Figure 25. Localisation de KidO dans la souche $\Delta xylX\Delta kidO$. La localisation de KidO-mCherry dans la souche $\Delta xylX\Delta kidO$ est observée 0h, 1h et 3h après induction au xylose (0.1%). Les images du haut représentent les micrographies en contraste de phase (Phase), celles du milieu en fluorescence (Fluo) et celles du bas la superposition des images en contraste de phase et en fluorescence (Merge).

3.5 Les localisations de KidO et de GdhZ sont-elles interdépendantes ?

Afin de savoir si la localisation de KidO est dépendante de GdhZ, la localisation de la fusion KidO-mCherry a été déterminée dans les souches $\Delta xylX\Delta kidO$ et $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ (Figures 25 et 26).

D'après les micrographies des figures 25 et 26, la capacité de KidO à former des foci ne semble pas être perturbée par l'absence de *gdhZ*. Cependant, l'inhibition de la division cellulaire induite par l'expression même de la fusion KidO-mCherry⁴ nous empêche d'associer de manière certaine ces foci à un site de division, où se situe l'anneau Z.

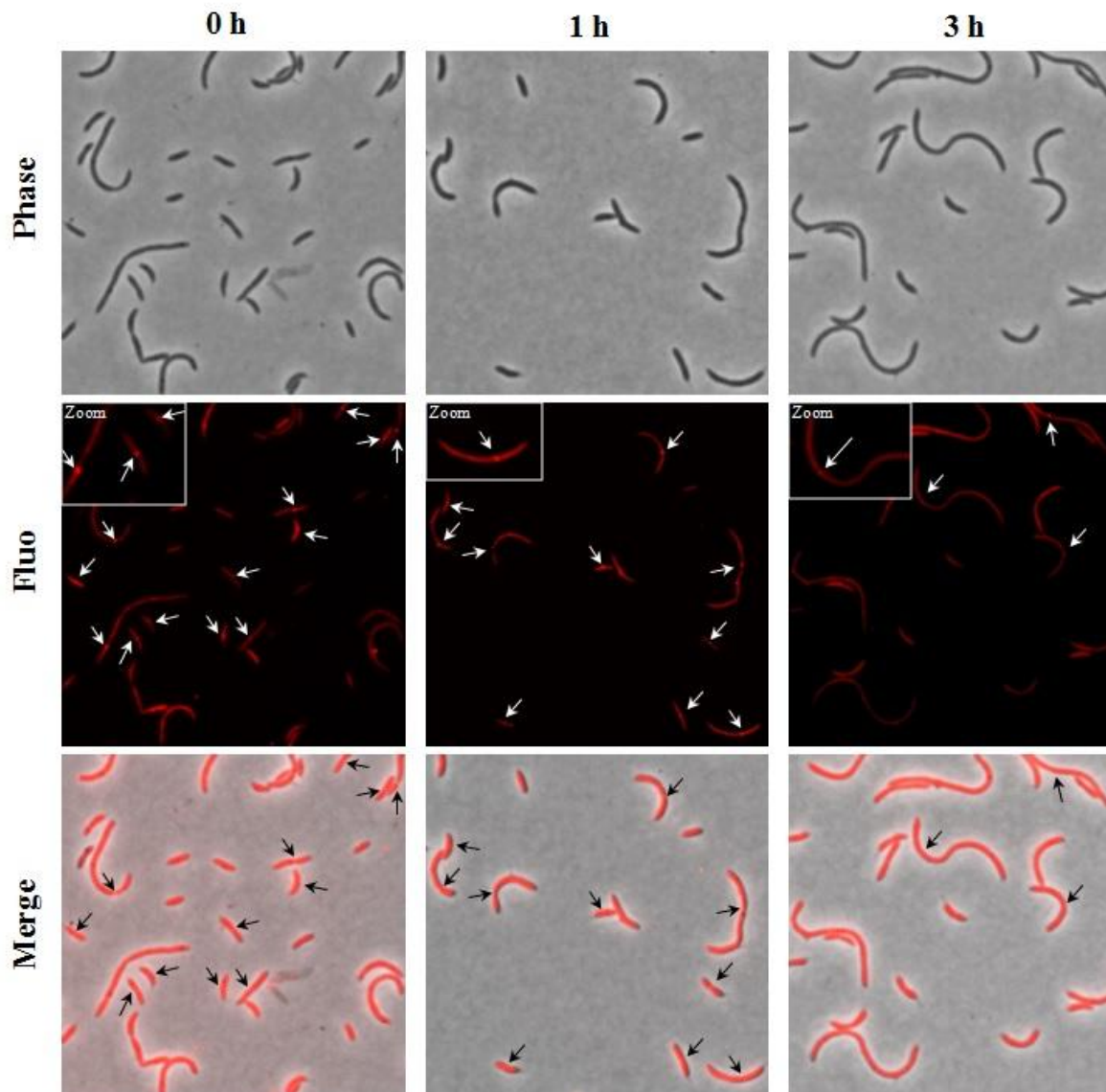


Figure 26. Localisation de KidO dans la souche $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$. La localisation de KidO-mCherry dans la souche $\Delta xylX\Delta kidO\Delta gdhZ$ est observée 0h, 1h et 3h après induction au xylose (0.1%). Les images du haut représentent les micrographies en contraste de phase (Phase), celles du milieu en fluorescence (Fluo) et celles du bas la superpositions des images en contrastes de phase et en fluorescence (Merge).

⁴ La fusion KidO-mCherry inhibe la division cellulaire de manière similaire à KidO_{DD} (Radhakrishnan et al. 2010).

De la même manière, nous avons utilisé une fusion GdhZ-GFP dans les souches WT et $\Delta kidO$ pour déterminer si la localisation de la glutamate déshydrogénase pourrait être KidO-dépendante (**Figure 27**).

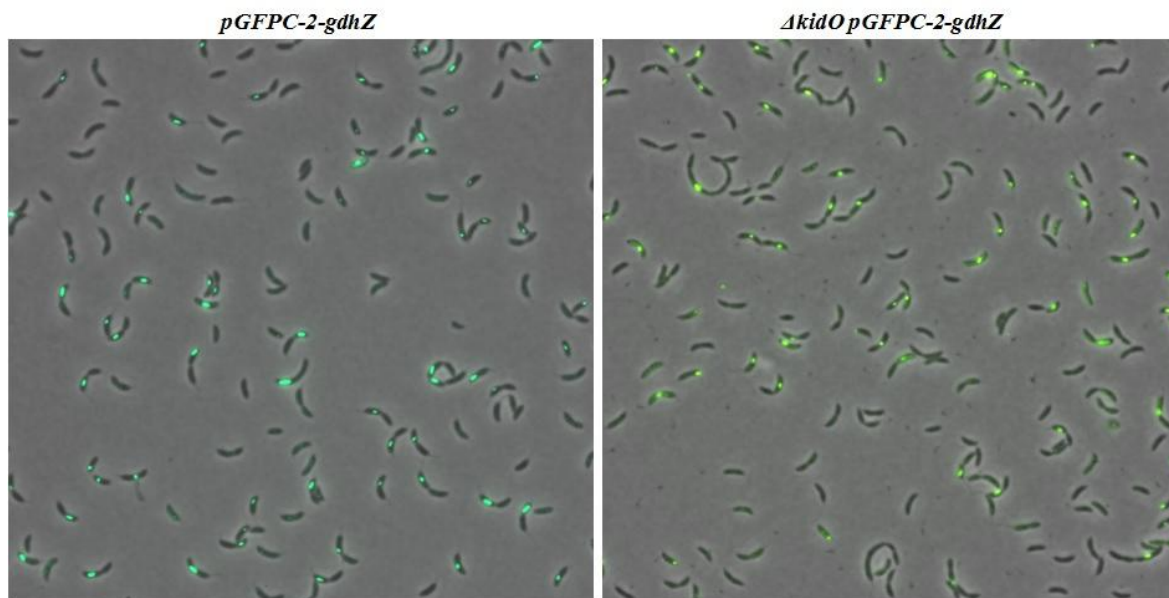


Figure 27. Localisation de GdhZ dans les souches WT et $\Delta kidO$. La localisation de GdhZ est observée dans la souche WT (gauche) et dans la souche $\Delta kidO$ (à droite) à l'aide d'une fusion *gdhZ-gfp*.

Comme nous pouvons l'observer sur les micrographies de la **figure 27**, la localisation de GdhZ dans les souches WT et $\Delta kidO$ est similaire, ce qui suggère que la localisation de GdhZ serait KidO-indépendante.

En conclusion, KidO et GdhZ localisent probablement indépendamment l'une de l'autre. Cependant, des expériences de colocalisation de KidO/FtsZ et de GdhZ/FtsZ dans des souches délétées respectivement pour *gdhZ* ou *kidO*, nous permettront de valider l'indépendance de la localisation de KidO et de GdhZ au niveau du Z ring.

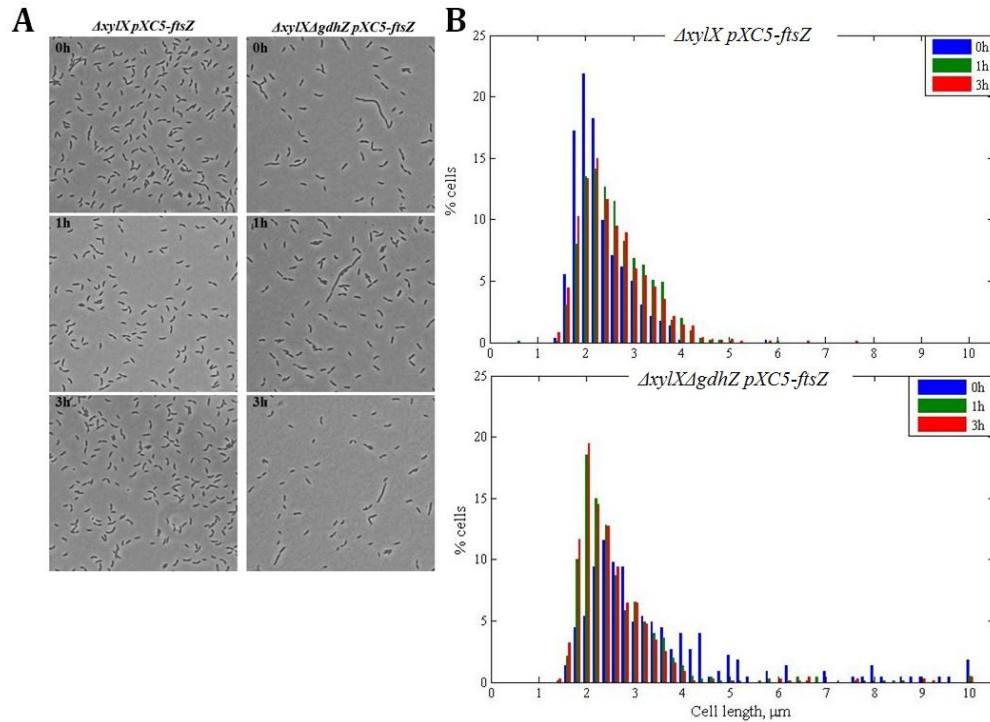


Figure 29. Micrographies et distributions de taille des souches *ΔxylX* et *ΔxylXΔgdhZ* surexprimant *ftsZ*. **A.** Les deux souches ont été cultivées en PYE jusqu'en milieu de phase exponentielle avant d'induire la surexpression de *ftsZ* par l'ajout de xylose (0.1%). **B.** Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les graphiques représentent la distribution de taille des souches *ΔxylX pXC5-ftsZ* (haut) et *ΔxylXΔgdhZ pXC5-ftsZ* (bas) 0h (bleu), 1h (vert) et 3h (rouge) après induction.

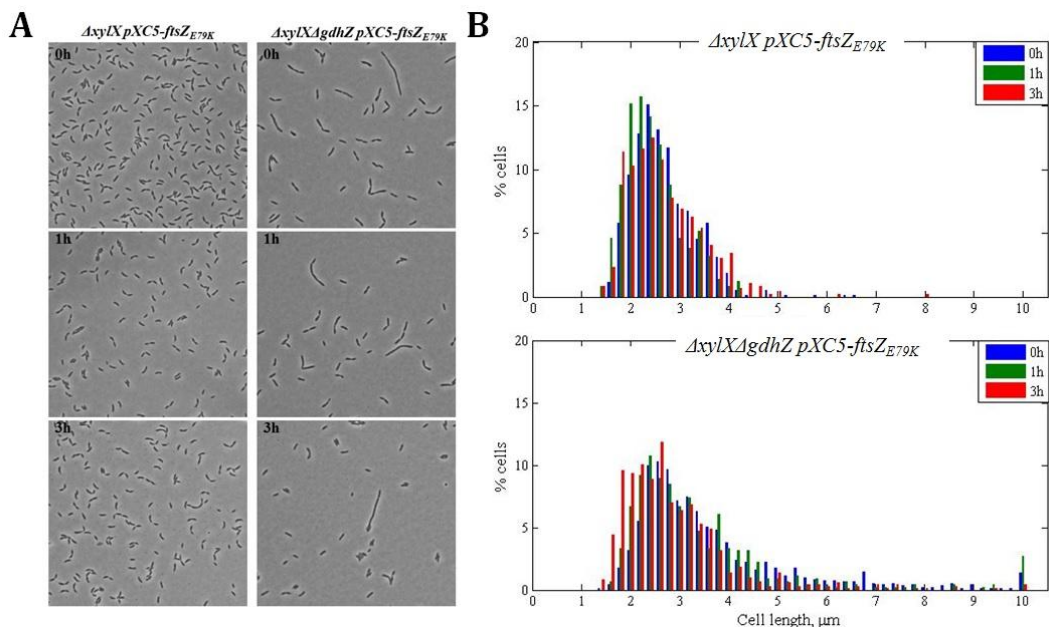


Figure 30. Micrographies et distributions de taille des souches *ΔxylX* et *ΔxylXΔgdhZ* surexprimant *ftsZ_{E79K}*. **A.** Les deux souches ont été cultivées en PYE jusqu'en milieu de phase exponentielle avant d'induire la surexpression de *ftsZ_{E79K}* par l'ajout de xylose (0.1%). **B.** Les graphiques sont obtenus à partir des analyses réalisées sur les micrographies avec le programme informatique MicrobeTracker. Les graphiques représentent la distribution de taille des souches *ΔxylX pXC5-ftsZ_{E79K}* (haut) et *ΔxylXΔgdhZ pXC5-ftsZ_{E79K}* (bas) 0h (bleu), 1h (vert) et 3h (rouge) après induction.

3.6 Surexpression de FtsZ et FtsZ_{E79K} dans les souches WT et Δ gdhZ

Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que la surexpression d'une fusion *ftsZ-yfp* peut partiellement corriger le défaut morphologique du mutant Δ gdhZ sans modifier le défaut de croissance, supportant donc un effet de *gdhZ* sur la division cellulaire indépendant du défaut de croissance. Néanmoins, cette version de FtsZ n'étant pas totalement fonctionnelle, nous avons voulu confirmer ces résultats à l'aide du pXC5-*ftsZ*. Nous avons également utilisé le pXC5-*ftsZ*_{E79K} pour observer l'effet de sa surexpression sur le mutant Δ gdhZ. De cette manière, nous pouvions tester si la surexpression d'une version de FtsZ insensible à KidO permet toujours de rétablir une morphologie WT. Nous avons donc induit la surexpression de *ftsZ* ou *ftsZ*_{E79K} dans les souches Δ xylX et Δ xylX Δ gdhZ et réalisé des micrographies des différentes souches 0h, 1h et 3h après ajout du xylose (0.1%) (**Figures 29A et 30A**). Des graphiques de distributions de tailles de ces souches sont également représentés (**Figures 29B et 30B**).

3.6.1 Western blot

Afin de vérifier que l'expression de *ftsZ* ou *ftsZ*_{E79K} augmente après induction au xylose (0.1%), un western blot au moyen d'anticorps anti-FtsZ a été réalisé sur des échantillons de protéines prélevés sur chaque souche aux temps 0h, 1h et 3h après ajout du xylose (**Figure 28**). Une révélation avec un anti-MreB a également été réalisée comme contrôle de charge afin de s'assurer qu'une quantité équivalente de protéines est chargée.

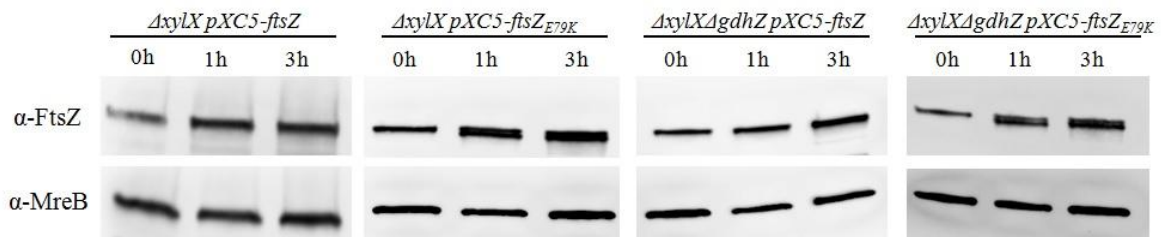


Figure 28. Western blot anti-FtsZ. Révélation d'un western blot anti-FtsZ (ligne supérieure) sur des échantillons protéiques (0h, 1h et 3h après induction au xylose) des souches WT et Δ gdhZ dans lesquelles ont été surexprimés *ftsZ* et *ftsZ*_{E79K}. La ligne inférieure représente la protéine MreB révélée au moyen des anticorps anti-MreB utilisé comme contrôle de charge.

Nous observons effectivement une augmentation du signal 3h après induction pour toutes les souches. Nous pouvons donc conclure que nous obtenons bien une surexpression de *ftsZ* ou *ftsZ*_{E79K}.

3.6.2 Morphologies et distributions de taille

Des micrographies des souches Δ xylX et Δ xylX Δ gdhZ, dans lesquelles *ftsZ* ou *ftsZ*_{E79K} sont surexprimées par induction au xylose (0.1%), ont été réalisées 0h, 1h et 3h après ajout de l'inducteur (**Figures 29A et 30A**). Elles ont ensuite été analysées afin d'obtenir des graphiques de distributions de taille (**Figures 29B et 30B**).

Sur la **figure 29**, nous pouvons voir que la morphologie et la distribution de taille de la souche Δ xylX pXC5-*ftsZ* ne varient pas après induction au xylose suggérant que la souche WT supporte une surexpression de *ftsZ*. Par contre, nous observons que les cellules filamenteuses de la souche Δ xylX Δ gdhZ pXC5-*ftsZ* disparaissent après 3h d'induction au

	Temps après induction au xylose	Moyenne	Ecart-type	Nombre de cellules analysées
<i>ΔxylX pXC5-ftsZ</i>	0h	2.2866	0.52674	935
	1h	2.5956	0.643	543
	3h	2.5548	0.7	817
<i>ΔxylXΔgdhZ pXC5-ftsZ</i>	0h	3.5477	1.9907	224
	1h	2.6549	1.1404	749
	3h	2.5507	1.0635	756
<i>ΔxylX pXC5-ftsZ_{E79K}</i>	0h	2.6908	0.63909	818
	1h	2.4779	0.57996	502
	3h	2.666	0.77402	466
<i>ΔxylXΔgdhZ pXC5-ftsZ_{E79K}</i>	0h	3.6854	1.7763	956
	1h	3.5326	2.2563	447
	3h	2.9064	1.28	719

Table 3. Moyennes et écarts-type des distributions de taille des souches *ΔxylX* et *ΔxylXΔgdhZ* surexprimant *ftsZ* et *ftsZ_{E79K}*.

xylose. En outre, nous constatons que la moyenne de taille des cellules de cette souche 3h après induction est similaire à la moyenne de la souche $\Delta xyfX$ *pXC5-ftsZ* (**Table 3**). De ces résultats nous pouvons conclure que la surexpression d'une version fonctionnelle permet de pallier, au moins partiellement, au défaut morphologique du mutant *gdhZ*.

Les données illustrées à la **figure 30** et dans la **table 3** montrent que la surexpression de *ftsZ_{E79K}* corrigent également, bien que dans une moindre mesure, la filamentation induite par l'absence de *gdhZ*.

De l'ensemble de ces observations, nous pouvons conclure que la surexpression d'une version fonctionnelle de *ftsZ*, et dans une moindre mesure de *ftsZ_{E79K}*, permet effectivement de résoudre partiellement le défaut morphologique d'un mutant *gdhZ*.

Discussion et perspectives

4. Discussion et perspectives

Précédemment, une interaction entre FtsZ et la glutamate déshydrogénase GdhZ a pu être mise en évidence chez *Caulobacter crescentus*. La délétion de *gdhZ* conduit à un retard de croissance, un défaut morphologique sévère et un défaut de division cellulaire. Certains phénotypes du mutant Δ *gdhZ* (e.g. recrutement précoce de l'anneau Z) ont été observés dans une souche dépourvue de *kidO*, une oxydoréductase caractérisée par l'équipe du Professeur Viollier (Radhakrishnan et al. 2010). Prenant en compte que (i) KidO et GdhZ interagissent toutes deux avec FtsZ et ont un profil de dégradation similaire ; (ii) les mutants Δ *gdhZ* et Δ *kidO* arborent des phénotypes comparables ; (iii) la liaison du cofacteur NAD(H) est indispensable à l'inhibition qu'exerce KidO sur FtsZ ; (iv) aucune activité enzymatique n'a pu être attribuée à KidO ; et (v) GdhZ convertit du glutamate en α -kétoglutarate en réduisant le NAD⁺ en NADH + H⁺ ; nous avons émis l'hypothèse que GdhZ pourrait réguler la division par l'intermédiaire de KidO en lui délivrant le NAD(H).

4.1 Caractérisation du lien entre GdhZ, KidO et FtsZ

Premièrement, nous avons voulu savoir si KidO et GdhZ interagissent physiquement dans la cellule. Nous avons, pour cela, réalisé une expérience de co-immunoprécipitation (Co-IP) à partir d'une souche co-exprimant 3FLAG-*gdhZ* et *kidO-mcherry*. Les résultats obtenus suggèrent en effet, que KidO et GdhZ interagissent ensemble (**Figure 21C**). Deux points importants doivent cependant être soulignés. Premièrement, le contrôle négatif utilisé dans cette expérience (souche WT) n'est pas adéquat. En effet, afin de s'assurer que KidO-mCherry ne s'accroche pas de façon aspécifique directement aux billes utilisées pour immunoprécipiter la fusion 3FLAG-GdhZ, nous devrions utiliser une souche n'exprimant que *kidO-mcherry*. En absence de la fusion 3Flag-GdhZ, KidO-mCherry ne devrait pas être immunoprécipitée. Malheureusement, au moment de ce test préliminaire nous ne disposions pas de cette souche. Deuxièmement,, soulignons que la co-immunoprécipitation ne signifie pas nécessairement une interaction directe. En effet GdhZ interagissant avec FtsZ, lui-même interagissant avec KidO, les 3 protéines pourraient être immunoprécipitées sans lien direct entre GdhZ et KidO. Pour savoir si KidO et GdhZ interagissent de manière directe, un test double hybride en utilisant une des deux protéines comme appât et l'autre comme proie pourrait être réalisé. Nous pourrions également effectuer une expérience de Co-IP avec les protéines purifiées.

Deuxièmement, nous voulions savoir si l'effet de GdhZ sur FtsZ est KidO-dépendant. Pour répondre à cette question, les phénotypes du mutant Δ *gdhZ* (défaut de croissance et homéostasie de la taille cellulaire perturbée) ont été étudiés dans un background Δ *kidO* ou *ftsZ_{E79K}* (insensible à KidO). Plusieurs conclusions ont pu être tirées de ces expériences. D'abord, nous avons constaté que la souche Δ *kidO* présente une croissance comparable à celle de la souche WT tandis que le double mutant Δ *gdhZ* Δ *kidO* présente une croissance similaire à celle du mutant Δ *gdhZ* (**Figure 18**). Ces résultats suggèrent que le problème métabolique du mutant Δ *gdhZ* impose le taux de croissance au double mutant Δ *gdhZ* Δ *kidO*. Ensuite, les micrographies et les distributions de taille de ces souches montrent que le mutant Δ *kidO* présente une légère filamentation alors que la population cellulaire du mutant Δ *gdhZ* comporte des petites cellules et des filaments (**Figure 19**). A nouveau, la souche combinant ces deux mutations présente une morphologie similaire à celle du simple mutant Δ *gdhZ* suggérant que la délétion de *gdhZ* est épistatique sur la délétion de *kidO*. D'autre part, nous avons également pu montrer que le double mutant *ftsZ_{E79K}* Δ *gdhZ* exhibe une filamentation exacerbée par rapport aux simples mutants (**Figure 20**). Ceci tend à confirmer que l'action de GdhZ sur FtsZ serait KidO-indépendante.

Toujours dans l'idée de mettre en évidence le lien éventuel entre GdhZ et KidO, nous avons utilisé des souches surexprimant *kidO* ou *kidO_{DD}* dans des souches Δ *gdhZ* ou *gdhZ*⁺. Que ce soit dans une souche WT ou dans une souche Δ *gdhZ*, la surexpression de *kidO_{DD}* conduit à une filamentation sévère (**Figures 23 et 24**). Ces observations montrent donc que KidO est toujours capable d'inhiber la division en absence de GdhZ. Ainsi, il semble que KidO et GdhZ agissent sur la division indépendamment l'une de l'autre.

Cependant, nous observons qu'une souche délétée pour *gdhZ* est nettement plus sensible à la surexpression de *kidO* ou *kidO_{DD}* par rapport à une souche WT. Ces résultats suggèrent que la filamentation des souches est due à un effet additif de la délétion de *gdhZ* et de la surexpression de *kidO*. Néanmoins, le fait que la surexpression de *kidO_{DD}* dans le mutant Δ *gdhZ* arrête la croissance (**Figure 22**) indique que cette souche est particulièrement malade. En outre, les écarts-type très importants calculés sur les mesures de tailles des souches surexprimant *kidO_{DD}* (**Table 2**) nous empêche d'effectuer un test statistique classique nécessitant une homogénéité des variances.

D'une manière similaire, il serait intéressant d'étudier la surexpression de *gdhZ* ainsi que de sa version stabilisée dans des souches Δ *kidO* et *kidO*⁺. Cependant, nous devrions alors prendre en compte le fait que, étant une enzyme métabolique, GdhZ est probablement soumise à plusieurs régulations post-traductionnelles qui pourraient interférer avec sa surexpression (Uno et al. 1984).

Enfin, nous avons localisé d'une part KidO dans un mutant Δ *gdhZ* et d'autre part GdhZ dans un mutant Δ *kidO* pour savoir si leur localisation est interdépendante. Dans les **figures 25 et 26**, nous pouvons voir que la formation de foci de KidO-mcherry ne semble pas être perturbée par l'absence de *gdhZ*. Néanmoins, étant donné la morphologie et le signal observé, co-localiser KidO-mcherry et FtsZ-yfp s'avère nécessaire afin de s'assurer que KidO est toujours bien recruté au futur site de division en absence de *gdhZ*. De la même manière, la localisation de GdhZ ne semble pas être perturbée par la délétion de *kidO* (**Figure 27**). GdhZ ayant un profil de localisation indépendant de FtsZ (F. Beaufay, thèse en cours), il n'est pas totalement surprenant que KidO, dont la localisation repose sur son recrutement par FtsZ, n'intervienne pas non plus dans la localisation de GdhZ. Toutefois la localisation de GdhZ étant dynamique au sein de la cellule, (F. Beaufay, thèse en cours), colocaliser GdhZ et FtsZ, au cours du cycle cellulaire serait également pertinent.

4.2 Effet d'une surexpression de *ftsZ* sur le mutant Δ *gdhZ*

Nous avons préalablement montré qu'une surexpression de *ftsZ-yfp* permet de pallier partiellement au défaut morphologique du mutant Δ *gdhZ*. La version *ftsZ-yfp* n'étant pas totalement fonctionnelle, nous avons testé la surexpression d'une version sauvage de *ftsZ*. D'une part, nous constatons que 3h après induction, la surexpression de *ftsZ* dans une souche Δ *gdhZ* permet de restaurer partiellement une morphologie WT, notamment en supprimant les cellules filamenteuses (**Figure 29**). De la même manière, la surexpression de *ftsZ_{E79K}* permet également, dans une moindre mesure, de restaurer partiellement le défaut morphologique du mutant Δ *gdhZ*. Notons que la surexpression de *ftsZ* n'influence en rien la croissance (F. Beaufay, thèse en cours). Ces données montrent donc clairement que le problème métabolique due à la délétion de *gdhZ* n'est pas la cause directe du défaut de morphologie. Il semble donc que GdhZ soit impliquée d'une façon ou d'une autre dans la régulation de la division.

La surexpression de *ftsZ_{E79K}* ne restaure que dans une moindre mesure le défaut de morphologie du mutant Δ *gdhZ*. Malheureusement les conséquences de la mutation E79K sur les propriétés physico-chimiques de FtsZ sont à ce jour inconnues. Néanmoins, une souche exprimant *ftsZ_{E79K}* comme seule copie de *ftsZ* présente une filamentation évidente suggérant

que FtsZ_{E79K} ne fonctionne pas de manière optimale par rapport à une version WT. Ce comportement pourrait expliquer la différence observée lorsque nous surexprimons *ftsZ* ou *ftsZ_{E79K}*. Afin de caractériser l'effet de cette mutation, l'activité GTPase de FtsZ_{E79K} sera mesurée et comparée à celle de la version WT (**figure 31**). De même, des observations en microscopie électronique à transmission seront également réalisées.

Puisque la surexpression de *ftsZ* permet de pallier partiellement au défaut morphologique du mutant Δ *gdhZ*, nous pourrions penser que ce défaut pourrait provenir d'un niveau de FtsZ insuffisant dans un mutant Δ *gdhZ* par rapport à la WT. Cependant, nos données montrent que la quantité de FtsZ est similaire dans les deux souches (F. Beaufay, thèse en cours). Il semble donc que GdhZ affecte FtsZ au niveau de son activité ou de sa capacité à former des protofilaments et des structures plus complexes. Différentes techniques existent afin de mettre en évidence l'effet de GdhZ sur FtsZ. Ainsi, nous proposons de réaliser des tests GTPase pour mesurer l'activité GTPase de FtsZ en absence et en présence de GdhZ selon le principe illustré à la **figure 31**. Notons que ce test pourrait également être réalisé en présence et en absence de KidO.

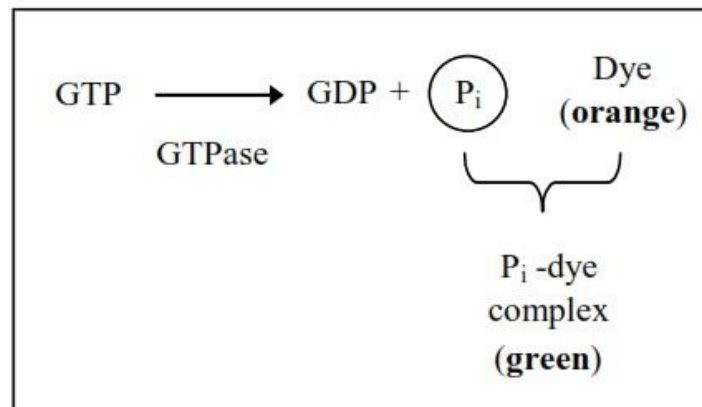


Figure 31. Principe d'un test d'activité GTPase. En présence d'une activité GTPase, le GTP est hydrolysé en GDP et en P_i. La quantité de P_i est ensuite estimée à l'aide d'un système colorimétrique.

Nous proposons également de visualiser par microscope électronique à transmission les filaments de FtsZ à nouveau en présence et en absence de GdhZ/KidO pour déterminer leur état de polymérisation. Néanmoins, ces techniques nécessitent la purification des différentes protéines impliquées.

La question que nous pourrions soulever est comment une surexpression de *ftsZ* pourrait conduire à une restauration de la morphologie ? Chez *E. coli*, une légère augmentation de la concentration en FtsZ mène à la formation de mini cellules suite à la formation d'un second anneau Z à un pôle. Cependant, une concentration encore plus importante de FtsZ conduit plutôt à la formation de filaments (Ward & Lutkenhaus 1985). Cette observation contre-intuitive peut s'expliquer par le fait qu'une forte surexpression conduit à la formation simultanée de plusieurs anneaux Z incomplets. Aucun de ces anneaux Z ne mature en divisome pour effectuer correctement la division. Il est donc possible que la surexpression de FtsZ diminue l'activité excédante de FtsZ d'un mutant Δ *gdhZ*.

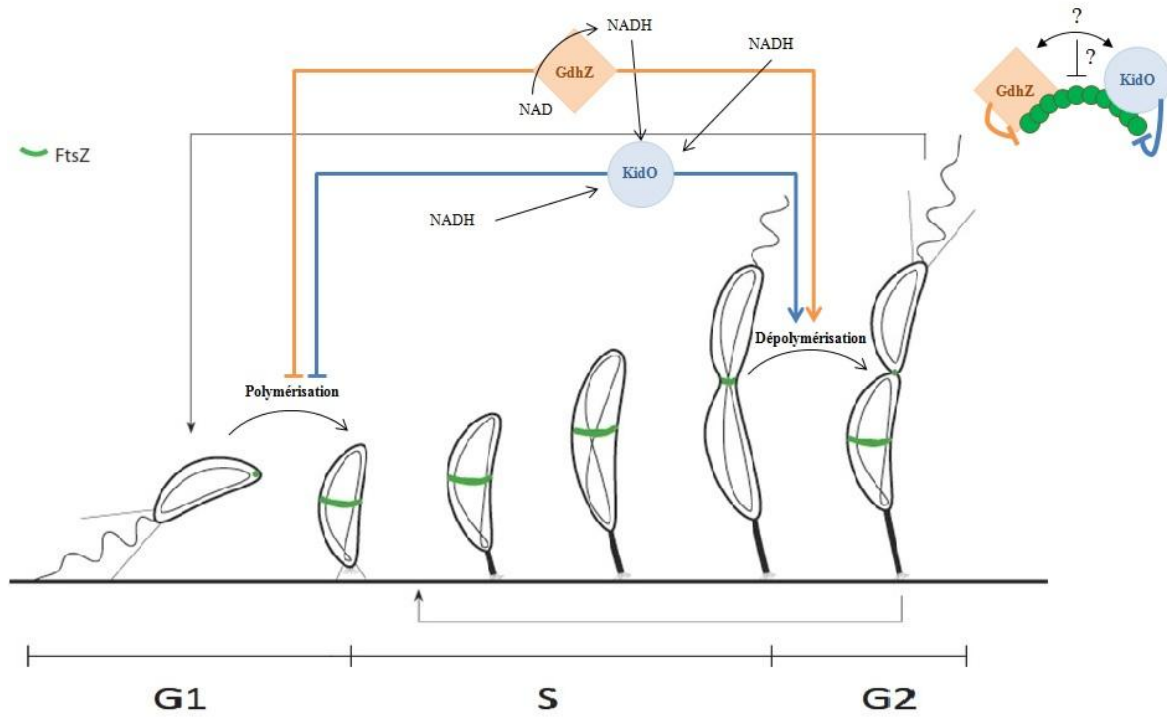


Figure 32. Modèle d'action de GdhZ et de KidO dans la souche WT.

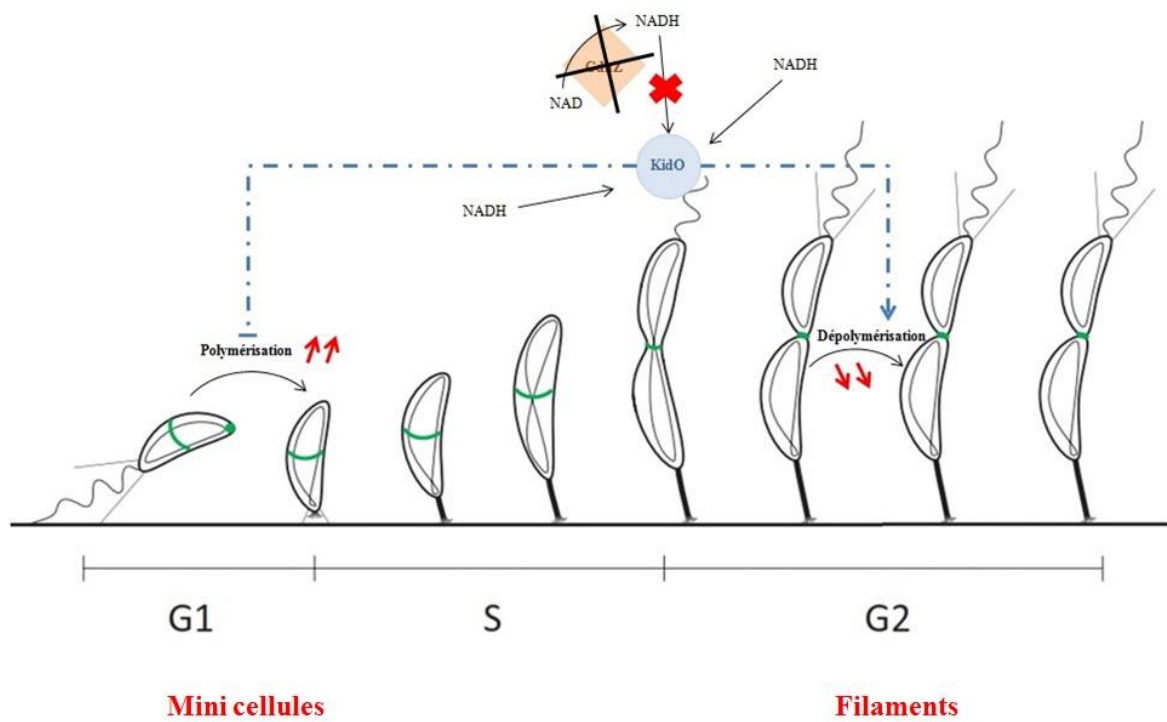


Figure 33. Modèle du cycle cellulaire dans un mutant *AgdhZ*.

4.3 Modèle proposé

Nous sommes à présent en mesure de proposer un modèle rassemblant les conclusions obtenues à partir de nos observations.

A la **figure 32**, le modèle proposé pour la souche WT est le suivant. Tout d'abord GdhZ et KidO agissent conjointement en début de cycle cellulaire pour empêcher la formation précoce d'un anneau Z. Ensuite, elles stimulent la dépolymérisation de l'anneau Z en fin de cycle cellulaire afin de permettre le bon déroulement de la cytokinèse. De part l'interaction entre KidO et GdhZ et leur co-localisation au niveau de l'anneau Z, le NADH produit par l'activité catabolique de GdhZ pourrait être directement lié par KidO et de ce fait stimuler son activité d'inhibiteur de l'anneau Z.

Le modèle proposé pour la souche Δ *gdhZ* est représenté dans la **figure 33**. Lorsque *gdhZ* est délété, ses actions en début et en fin de cycle cellulaire sont supprimées. En conséquence, l'anneau Z est précocément recuté durant la phase G1 et la cytokinèse retardée en phase G2. De plus, le NADH produit par GdhZ, hypothétiquement fourni à KidO, n'est plus disponible, ce qui diminuerait également l'activité de cette dernière sur FtsZ.

Matériel et méthodes

5. Matériel et méthodes

5.1 Souches, plasmides et amorces

5.1.1 Souches

5.1.1.1 *Escherichia coli*

RH#	Génotype	Plasmide	Caractéristiques	Commentaires
317	DH10B	pHR253 (pNPTS138)	oriT, sacB	Utilisée pour purifier le pHR253
319	MT607 pro-82 thi-I hsdR17 (r-m+) supE44 recA56	pRK600	oriT, chloramphénicol	Utilisée lors des croisements triparentaux
528	S17-1	pHR312 (pNPTS138- Δ CC0088)	oriT, sacB, kanamycine	Délétion de <i>gdhZ</i>
1119	Top 10	pHR485 (pNPTS138- Δ kidO)	oriT, sacB, kanamycine	Délétion de <i>kidO</i>
1273	Top 10	pHR516 (pNPTS138- Δ xylX)	oriT, sacB, kanamycine	Délétion de <i>xylX</i>
1481	Top 10	pHR561 (pXCHYC-5- <i>kidO</i>)	oriT, protéine de fusion, promoteur inductible, tétracycline	Intégration de <i>kidO-mCherry</i> au locus <i>xylX</i>
1482	Top 10	pHR562 (pXC-5- <i>ftsZ</i>)	oriT, promoteur inductible, tétracycline	Intégration de <i>ftsZ</i> au locus <i>xylX</i>
1483	Top 10	pHR563 (pXC-5- <i>ftsZ</i> _{E79K})	oriT, promoteur inductible, tétracycline	Intégration de <i>ftsZ</i> _{E79K} au locus <i>xylX</i>
1484	Top 10	pHR564 (pXC-5- <i>kidO</i> _{DD})	oriT, promoteur inductible, tétracycline	Intégration de <i>kidO</i> _{DD} au locus <i>xylX</i>
1486	Top 10	pHR566 (pXC-5)	oriT, promoteur inductible, tétracycline	
1512	Top 10	pHR569 (pXC-5- <i>kidO</i>)	oriT, promoteur inductible, tétracycline	Intégration de <i>kidO</i> au locus <i>xylX</i>

5.1.1.2 *Caulobacter crescentus*

RH#	Génotype	Caractéristiques	Commentaires
50	NA1000	Acide nalidixique	WT ou CB15N
534	NA1000 Δ CC0088	Acide nalidixique	Δ gdhZ
743	NA1000 3FLAG-CC0088	Acide nalidixique	3FLAG-GdhZ
903	NA1000 Δ kidO	Acide nalidixique	RH50 x RH319 x RH1119
904	NA1000 Δ CC0088 Δ kidO	Acide nalidixique	Δ gdhZ Δ kidO RH534 x RH319 x RH1119
984	NA1000 Δ xylX	Acide nalidixique	
1117	NA1000 <i>ftsZ</i> _{E79K}	Acide nalidixique	Résiste à la surexpression de <i>kidO</i>
1256	NA1000 Δ xylX Δ CC0088	Acide nalidixique	Δ xylX Δ gdhZ RH984 x RH528
1324	NA1000 3FLAG-CC0088 Δ xylX Δ kidO pXCHYC-5- <i>kidO</i>	Promoteur inductible, protéine de fusion, FLAG-tag, acide nalidixique, tétracycline	Utilisée pour la co- immunoprécipitation
1339	NA1000 <i>ftsZ</i> _{E79K} Δ xylX Δ kidO	Acide nalidixique	RH1494 x RH319 x RH1119
1368	NA1000 <i>ftsZ</i> _{E79K} Δ kidO	Acide nalidixique	RH1117 x RH319 x RH1119
1494	NA1000 <i>ftsZ</i> _{E79K} Δ xylX	Acide nalidixique	RH1117 x RH319 x RH1273
1495	NA1000 Δ xylX Δ kidO	Acide nalidixique	RH903 x RH319 x RH1273

1496	NA1000 <i>ΔCC0088ΔxylXΔkidO</i>	Acide nalidixique	<i>ΔgdhZΔxylXΔkidO</i> RH904 x RH319 x RH1273
1502	NA1000 <i>ΔxylXΔkidO</i> <i>pXCHYC-5-kidO</i>	Promoteur inductible, protéine de fusion, acide nalidixique, tétracycline	RH1495 x RH319 x RH1481
1503	NA1000 <i>ΔxylXΔkidOΔCC0088</i> <i>pXCHYC-5-kidO</i>	Promoteur inductible, protéine de fusion, acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔkidOΔgdhZ pXCHYC-5-kidO</i> RH1496 x RH319 x RH1481
1504	NA1000 <i>ΔxylX pXC-5-ftsZ</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH984 x RH319 x RH1482
1505	NA1000 <i>ΔxylX pXC-5-ftsZ_{E79K}</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH984 x RH319 x RH1483
1506	NA1000 <i>ΔxylXΔCC0088</i> <i>pXC-5-ftsZ</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔgdhZ pXC-5-ftsZ</i> RH1256 x RH319 x RH1482
1507	NA1000 <i>ΔxylXΔCC0088</i> <i>pXC-5-ftsZ_{E79K}</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔgdhZ pXC-5-ftsZ_{E79K}</i> RH1256 x RH319 x RH1483
1508	NA1000 <i>ΔxylXΔkidO pXC-5-kidO</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH1495 x RH319 x RH1512
1509	NA1000 <i>ΔxylXΔkidO pXC-5-kidO_{DD}</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH1495 x RH319 x RH1484
1510	NA1000 <i>ΔxylXΔkidOΔCC0088 pXC-5-kidO</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔkidOΔgdhZ pXC-5-kidO</i> RH1496 x RH319 x RH1512
1511	NA1000 <i>ΔxylXΔkidOΔCC0088 pXC-5-kidO_{DD}</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔkidOΔgdhZ pXC-5-kidO_{AA::DD}</i> RH1496 x RH319 x RH1484
1562	NA1000 <i>ftsZ_{E79K}ΔxylXΔkidO</i> <i>pXC-5-kidO</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH1339 x RH319 x RH1512
1563	NA1000 <i>ftsZ_{E79K}ΔxylXΔkidO</i> <i>pXC-5-kidO_{DD}</i>	Promoteur inductible, acide nalidixique, tétracycline	RH1339 x RH319 x RH1484
1564	NA1000 <i>3FLAG-CC0088</i> <i>ΔxylX</i>	FLAG-tag, acide nalidixique	RH743 x RH319 x RH1273
1566	NA1000 <i>3FLAG-CC0088</i> <i>ΔxylXΔkidO</i>	FLAG-tag, acide nalidixique	RH1564 x RH319 x RH1119
1578	NA1000 <i>ΔxylX pXC-5</i>	Acide nalidixique, tétracycline	RH984 x RH319 x RH1486
1579	NA1000 <i>ΔxylXΔCC0088</i> <i>pXC-5</i>	Acide nalidixique, tétracycline	<i>ΔxylXΔgdhZ pXC-5</i> RH1256 x RH319 x RH1486

5.1.2 Plasmides

pHR#	Plasmide	Caractéristiques	Résistance
253	pNPTS138	oriT, sacB	kanamycine
312	pNPTS138- <i>ΔCC0088</i>	oriT, sacB	kanamycine
403	psK-ftsZ	oriT, promoteur inductible	ampicilline
485	pNPTS138- <i>ΔkidO</i>	oriT, sacB	kanamycine
516	pNPTS138- <i>ΔxylX</i>	oriT, sacB	kanamycine
561	<i>pXCHYC-5-kidO</i>	oriT, promoteur inductible, protéine de fusion	tétracycline
562	<i>pXC-5-ftsZ</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline
563	<i>pXC-5-ftsZ_{E79K}</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline
564	<i>pXC-5-kidO_{DD}</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline
566	<i>pXC-5</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline
569	<i>pXC-5-kidO</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline
583	<i>pXC-5-3FLAG-CC0088</i>	oriT, promoteur inductible	tétracycline

5.1.3 Amorces

#	Nom	Séquence	Fonction
82	CC2540_rev6_pGB KT7	cttagtcGAATtcacagccctgggtgat ttgcac	Utilisée avec l'amorce 104 pour amplifier une partie du gène <i>ftsZ/ftsZ_{E79K}</i> (293 pb)
100	pGEMT_amont	gtttcccagtcacgacg	Amorce universelle utilisée avec l'amorce 174 pour amplifier les inserts dans les vecteurs de clonage
104	pxylX_for	cgctaccaagtgccgacgaa	Amorce universelle pour amplifier les inserts clonés sous contrôle du <i>P_{xyI}X</i> (avec les amorces 82, 176 et 775)
129	CC2540_NdeI_for	acattgaCATatggctatttctttccgccc	Utilisée avec l'amorce 576 pour amplifier <i>ftsZ/ftsZ_{E79K}</i> (1547 pb)
139	CC0088_up	gtcgcgctgcaggggatctt	Utilisée avec l'amorce 140 pour amplifier <i>CC0088</i> (~6000 pb) ou <i>ΔCC0088</i> (~1300 pb) – Utilisée avec l'amorce 170 pour amplifier <i>CC0088-3FLAG</i>
140	CC0088_down	acgetggacgccaagctgttt	Utilisée avec l'amorce 139 pour amplifier <i>CC0088</i> (~6000 pb) ou <i>ΔCC0088</i> (~1300 pb)
170	PCC0088_down_EcoRI_rev2	cttagtcGAATTCgcacgtcgaagagg gtttcgc	Utilisée avec l'amorce 139 pour amplifier <i>CC0088-3FLAG</i>
174	pGEMT_aval	ggaaacagctatgaccatg	Amorce universelle utilisée avec l'amorce 100 pour amplifier les inserts dans les vecteurs de clonage
176	mcherry_rev	ctccatgtgcacctgaagc	Amorce universelle pour amplifier les inserts clonés en amont de la séquence codante <i>mcherry</i> (utilisée avec l'amorce 104)
391	CC3576_EcoRI- STOP_rev	cttagtcGAATTCgcgaccaacgtcgc ggatc	Utilisée avec l'amorce 773 pour amplifier <i>kidO</i> (890 pb)
448	CC3576_up	ggtcaccaccgatcaccacc	Utilisée avec l'amorce 449 pour amplifier <i>kidO</i> (2092 pb) ou <i>ΔkidO</i> (1318 pb)
449	CC3576_down	ccttgatgacctcgacctcg	Utilisée avec l'amorce 448 pour amplifier <i>kidO</i> (2092 pb) ou <i>ΔkidO</i> (1318 pb)
576	CC2540_KpnI_rev	acattgaGGTACCaagcaaacgccc cgggagc	Utilisée avec l'amorce 129 pour amplifier <i>ftsZ/ftsZ_{E79K}</i> (1547 pb)
773	CC3576_NdeI_for	cttagtcCATAtgacttaaccctcggca agg	Utilisée avec l'amorce 391 pour amplifier <i>kidO</i> - Utilisée avec l'amorce 774 pour amplifier <i>kidO</i> ou avec l'amorce 775 pour amplifier <i>kidO_{DD}</i> (mutations V1606D et A1607D) (890 pb)
774	CC3576_KpnI_rev	cttagtcGGTACcggttagcgaccaac gtcg	Utilisée avec l'amorce 773 pour amplifier <i>kidO_{DD}</i> (mutations V1606D et A1607D) (890 pb)
775	CC3576_AA_DD_K pnI_rev	cttagtcGGTAcggttagTcgTccaac gtcg	Utilisée avec l'amorce 104 pour amplifier <i>kidO</i> sous contrôle du <i>P_{xyI}X</i> (1060 pb) - Utilisée avec l'amorce 773 pour amplifier <i>kidO</i> (890 pb)

5.2 Milieux, tampons et solutions

5.2.1 Milieux pour *Escherichia coli*

5.2.1.1 Milieu LB (*Luria Bertani*)

	LB liquide	LB solide
Bacto-tryptone	10 g	10 g
Yeast extract (Difco)	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar (Difco)	/	15 g
dH ₂ O	1L	1L

5.2.1.2 Milieu SOB

Bacto-tryptone	20 g
Yeast extract (Difco)	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,186 g
dH ₂ O	1L

5.2.2 Milieux pour *Caulobacter crescentus*

5.2.2.1 Milieu PYE (*Peptone Yeast Extract*)

	PYE liquide	PYE solide
Bacto-tryptone	2 g	2 g
Yeast extract (Difco)	1 g	1 g
0,5 M MgSO ₄	2 ml	2 ml
0,5 M CaCl ₂	1 ml	1 ml
Agar (Difco)	/	15 g
dH ₂ O	1L	1L

5.2.2.2 Milieu M2X/M2G

		Milieu liquide	Milieu solide
M2 salts 20X		50 ml	50 ml
Source de carbone	Xylose 10%	20 ml	20 ml
	Glucose 20%	10 ml	10 ml
0,5 M MgSO ₄		1 ml	1 ml
0,5 M CaCl ₂		1 ml	1 ml
10 mM FeSO ₄		1 ml	1 ml
dH ₂ O/ dH ₂ O Agar 1,5 %		Jusqu'à 1L	Jusqu'à 1L

5.2.3 Tampons et solutions

Tampon/solution	Composants	Quantité
PBS 10x	K ₂ HPO ₄ 18mM	2,4 g
	Na ₂ HPO ₄ 100 mM	14,4 g
	KCl 27 mM	2 g
	NaCl 1, 37 M	80 g
	H ₂ O	Jusqu'à 1L
PBS Tween 0,05%	PBS stock 10x	100 ml
	Tween 20%	500 µL
	H ₂ O	900 ml
Solution de blocking (WB)	PBS Tween 0,05%	1 L
	Lait en poudre	50 g

Tampon de chargement protéique 5x	Glycérol 100% β-mercaptoéthanol SDS 10% Tris-HCL pH 6,8 Bleu de bromophénol	25 ml 12,5 ml 5 g 12,5 ml Quelques grains
Running Buffer 10X	Glycine Tris SDS dH ₂ O	144,2 g (1,92 M) 30,05 g (0,25 M) 10 g (1%) 1L
Tris HCl pH 6,8	Tris dH ₂ O Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 1M dH ₂ O Autoclaver	61 g Jusqu'à 0,3 L Jusqu'à 1L
M2 salts 20X	K ₂ HPO ₄ Na ₂ HPO ₄ NH ₄ Cl dH ₂ O	21,2 g (155 mM) 34,8 g (245 mM) 10 g (187 mM) 0,5 L
Tampon TAE 50X	Tris HCl pH 8 EDTA Acide acétique	40 mM 50 mM 57,1 ml
Phosphate buffer 20X (0,4 M)	K ₂ HPO ₄ Na ₂ HPO ₄ dH ₂ O	21,2 g (156 mM) 34,8 g (245 mM) 1 L
Tampon d'extraction	Buffer 10X Leupeptin DTT PMSF Glycérol dH ₂ O	10 ml 1 ml 100 µl 1 ml 2 ml Jusqu'à 100 ml
Buffer 10X	Hepes MgCl ₂ EDTA EGTA Benzamidine Acide aminocapronic Ajuster le pH à 7,5 avec du KOH 10M dH ₂ O	200 ml 50 ml 25 ml 50 ml 25 ml 25 ml Jusqu'à 500 ml
100 mg/ml BSA	BSA sigma A8022 PBS 1X	1 g 10 ml
20 mg/ml BSA	100 mg/ml BSA PBS 1X	10 µl 40 µl
100 µg/ml BSA	100 mg/ml BSA PBS 1X	1 µl 999 µl
1 M Hepes (pH 7,4)	Hepes dH ₂ O NaOH pellets dH ₂ O	23,8 g 70 ml ~0,5 g (pH 7,4) Jusqu'à 0,1 L
100 mM PMSF	PMSF Ethanol	174 mg 10 ml
200 mM Benzamidine	Benzamidine dH ₂ O	2,4 g Jusqu'à 0,1 L

200 mM amino-caproic acid	Amino-N-Caproic acid dH ₂ O	2,62 g Jusqu'à 0,1 L
100 mM EDTA (pH 8 pour solubilisation)	EDTA dH ₂ O	7,5 g Jusqu'à 0,1 L
100 mM EGTA dans NaOH (100 mM)	EGTA NaOH (100 mM)	3,8 g Jusqu'à 0,1 L
2mM Leupeptin	Leupeptin H ₂ O	8,5 mg Jusqu'à 10 ml
250 mM DTT	DTT H ₂ O	385,5 mg Jusqu'à 10 ml
Tampon de lavage pour les billes	100 mg/ml BSA Tampon d'extraction Filtration stérilisante	50 µl Jusqu'à 5 ml
CoIP Wash Buffer	Tampon d'extraction 10% Triton X100	6 ml 30 µl (0,05%)

5.2.4 Sucres et antibiotiques (à filtrer)

	Solution de dissolution	Cc stock (µg/µl)	Pour 200 ml de milieu LB (µl)		Pour 200 ml de milieu PYE (µl)	
			Solide	Liquide	Solide	Liquide
Sucrose	dH ₂ O	30 %	/	/	2000	/
Xylose	dH ₂ O	10 %	/	/	2000	2000
Ampicilline	dH ₂ O	100	200	100	100	10
Kanamycine	dH ₂ O	50	200	120	80	20
Acide nalidixique	NaOH 0,2 M	20	300	150	200	150
Oxytétracycline	dH ₂ O	12,5	200	200	80	40

5.3 Techniques relatives à l'ADN

5.3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

5.3.1.1 PCR sur ADN génomique ou sur colonies de *C. crescentus* ou d'*E. coli*

Mix PCR			Programme
Réactif PCR	Quantité (µl)		
	ADN	Colonie	
AND génomique ou colonie	1 (~20 ng)	1 colonie	Dénaturation → 5' à 95°C Amplification : 30 cycles Dénaturation → 30'' à 95 °C Hybridation → 30'' à Tm Elongation → 1'/kb à 72 °C Elongation finale → 10' à 72 °C
dNTPs (5 mM)	2	1,2	
Tampon 5X (Taq polymérase)	10	6	
DMSO (pour <i>C. crescentus</i>)	1,5	1,5	
Taq polymérase	0,3	0,2	
Amorce forward (20 µM)	1	0,6	
Amorce reverse (20 µM)	1	0,6	
dH ₂ O	32,2	19,9	

5.3.1.2 PCR sur ADN génomique de *C. crescentus* (Polymérase proofreading)

Mix PCR		Programme
Réactif PCR	Quantité (µl)	
AND génomique de <i>Caulobacter crescentus</i>	1 (~20 ng)	Dénaturation → 10' à 95°C Amplification : 30 cycles Dénaturation → 1' à 95 °C Hybridation/élongation → 1'/kb à 68 °C Elongation finale → 10' à 72 °C
dNTPs (5 mM)	2	
2X PrimeSTAR GC buffer	25	
PrimeSTAR DNA Polymérase	0,5	
Amorce forward (20 µM)	0,75	
Amorce reverse (20 µM)	0,75	
dH ₂ O	20	

5.3.2 Procédure de clonage

5.3.2.1 Restriction

Insert	Matrice
0,5 µl d'enzyme de restriction 1	0,5 µl d'enzyme de restriction 1
0,5 µl d'enzyme de restriction 2	0,5 µl d'enzyme de restriction 2
3 µl de tampon approprié 10X	3 µl de tampon approprié 10X
X µl de produit PCR (~ 1µg)	Y µl de plasmide (~1 µg)
Porter le volume final à 30 µl avec dH ₂ O	Porter le volume final à 30 µl avec dH ₂ O

Incuber 3h à 37°C .

5.3.2.2 Purification des produits de restriction

- Pour l'insert : purification sur colonne (cf. protocole du kit MSB Spin PCRapace d'Invitex GmbH) et élution dans 30 µl d'dH₂O.
- Pour la matrice : purification sur gel d'agarose 1% (cf. protocole du kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen) et élution dans 30 µl d'dH₂O.

5.3.2.3 Ligation des produits de restrictions purifiés

- Utiliser cette formule afin de calculer la quantité d'insert requise :

$$\text{Quantité d'insert (ng)} = (\text{Quantité de matrice (ng)} \times \text{Taille de l'insert (pb)} \times 3) / \text{Taille de la matrice (pb)}$$

Produits	Quantité (µl)
Matrice restreinte et purifiée	X
Insert restreint et purifié	Y
ADN ligase T4 (Invitrogen)	1
Tampon T4 (5X)	3-4
dH ₂ O	Z
Volume total	15-20

Incuber à température ambiante durant une nuit.

5.3.3 Préparation d'ADN plasmidique

Se référer au protocole Plasmid DNA du kit Quiagen.

5.4 Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

5.4.1 Préparation de cellules électrocompétentes

- Inoculer la souche *E. coli* MC1061 (RH93) dans un milieu SOB et incuber une nuit à 37°C.
- Diluer 1ml de la culture dans 1L de milieu SOB.

- Incuber jusqu'à l'obtention d'une $DO_{550} \sim 0,8$.
- Récolter les cellules par centrifugation à 5000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.
- Resuspendre les cellules dans 500 ml de WB froid.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 minutes et laver les cellules avec 500 ml de WB froid.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 minutes et resuspendre dans ~ 4 ml de WB froid.
- Aliquoter par 55 µl et congeler les cellules à -80°C.

5.4.2 Transformation bactérienne par électroporation

- Sur glace, ajouter 2 µl de produit de ligation, préalablement dialysé 20 min sur filtre 0,022 µm, à 55 µl de cellules électrocompétentes dans une cuvette d'électroporation.
- Placer la cuvette dans la chambre d'électroporation, régler l'appareil sur 200 ohms, 25 µFD, 2,5 kV et appuyer simultanément sur les deux boutons.
- Après électroporation, ajouter immédiatement 1 ml de LB.
- Incuber les cellules électroporées à 37 °C pendant 1h.
- Etaler différentes dilutions des échantillons sur un milieu sélectif approprié (LB agar supplémenté avec un antibiotique) et incuber à 37 °C.

5.4.3 Conjugaison bi- et triparentale

- Inoculer une souche donneuse d'*E. coli* (S17-1) contenant un plasmide d'intérêt dans du milieu LB supplémenté avec l'antibiotique adéquat (et la souche « *Helper* » (RH319) dans du LB si conjugaison triparentale) et incuber à 37°C durant une nuit.
- Inoculer une souche receveuse de *C. crescentus* dans du milieu PYE à 30°C durant une nuit.
- Mélanger 50 µl de la souche donneuse avec 950 µl de la souche receveuse (Conjugaison triparentale : 50µl de la souche donneuse, 50 µl de la souche *helper* et 900 µl de la souche receveuse).
- Récolter les cellules par centrifugation à 9000 rpm pendant 2 minutes.
- Retirer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de PYE.
- Centrifuger à 9000 rpm pendant 2 minutes.
- Retirer le surnageant et resuspendre dans 50 µl de PYE.
- Déposer 50 µl sur un milieu PYE agar et incuber à 30°C durant une nuit.

5.4.4 Intégration du plasmide recombinant

- Introduire le plasmide d'intérêt dans *C. crescentus* par conjugaison.
- Strier le résultat de la conjugaison sur milieu PYE agar supplémenté avec l'antibiotique appropriée et avec l'acide nalidixique pour sélectionner l'intégration du plasmide au locus d'intérêt par simple recombinaison. Incuber 3-5 jours à 30°C.
- Strier 2 – 3 colonies sur PYE agar supplémenté avec l'antibiotique approprié sans acide nalidixique et incuber 1-2 jours à 30°C.

5.4.5 Excision du plasmide intégré

Certaines souches utilisées dans ce mémoire nécessitent l'excision du plasmide intégré pour obtenir une délétion d'un gène d'intérêt.

- Inoculer 3 intégrants en milieu PYE liquide sans antibiotique et incuber à 30°C durant une nuit.

- Etaler des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de 100 μ l de culture en phase stationnaire de croissance sur milieu PYE sucrose 3% pour éliminer les cellules dans lesquelles *sacB* est toujours présent et fonctionnel.
- Incuber à 30°C pendant 2-3 jours.
- Strier 50 clones à la fois sur PYE agar et sur PYE agar kanamycine pour discriminer les clones qui ont perdu *sacB* et le pNPTS138 (Suc^R/Kan^S) de ceux qui ont le pNPTS138 avec une version de *sacB* non fonctionnelle (Suc^R/Kan^R)*
- Réaliser une PCR avec des amorces qui s'hybrident en amont et en aval de la région de recombinaison pour discriminer les loci délétés des loci wt.

* Pour la délétion du gène *xytX*, les clones Suc^R sont striés sur PYE, PYE kanamycine et sur M2 xylose. Les clones Kan^S qui sont incapables de croître sur le M2 xylose sont stockés.

5.4.6 Croissance et viabilité

5.4.6.1 Courbes de croissances (Bioscreen)

- Inoculer les souches d'intérêt dans du milieu PYE liquide (supplémenté avec de la tétracycline pour les souches comportant une intégration plasmidique pour éviter l'excision de celle-ci) et incuber à 30°C pendant une nuit.
- Diluer les différentes cultures dans 2 ml de milieu PYE ou PYE xylose pour atteindre une densité optique de 0,03 à 660 nm. Utiliser la formule : $x (\mu\text{l}) = 0.03/\text{DO}_{660}$.
- Transférer 200 μ l par puits de la suspension cellulaire dans 4 puits d'une plaque Bioscreen 100 puits.
- Utiliser les première et dernière ligne pour le blanc (PYE ou PYEX).

5.4.6.2 Test de croissance sur milieu solide

- Les différentes souches de *C. crescentus* sont inoculées en milieu liquide PYE et incubées pendant une nuit à 30°C.
- Le lendemain, diluer les cultures pour atteindre une densité optique de 0,2.
- Diluer les différentes cultures en série (10^{-1} à 10^{-6}) et déposer des gouttes de ces dilutions sur PYE agar. Incuber à 30°C pendant 2-3 jours.

5.4.7 Synchronisation (sur glace)

- Inoculer une colonie fraîche de la souche à synchroniser dans 5 ml de PYE liquide et incuber à 30°C pendant une nuit.
- Le lendemain, transférer 100 μ l de cette culture dans 200 ml de PYE + 0,5 mM CaCl₂ et incuber à 30°C durant toute une journée.
- Au soir, diluer les cultures dans 300 ml de PYE + 0,5 mM CaCl₂ et incuber à 30°C jusqu'à obtention d'une densité optique (660 nm) de 0,7.
- Récolter les cellules par centrifugation à 7000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Enlever le supernatant et resuspendre le culot avec 60 ml de phosphate buffer froid.
- Ajouter 30 ml de Ludox froid aux 40 ml précédent et homogénéiser par inversion.
- Transférer les 90 ml dans des tubes Corex de 30 ml.
- Centrifuger les cultures à 9000 rpm pendant 40 minutes à 4°C (décélération lente).
- Enlever la partie supérieure du gradient (comprenant la bande des cellules pédonculées et prédivisionnelles) jusqu'à 1 cm au dessus de la bande inférieure (contenant les cellules flagellées).

- Prélever les bandes contenant les cellules flagellées et les transférer dans un nouveau tube Corex 30 ml.
- Ajouter du phosphate buffer froid jusqu'à 1 cm du bord du tube et homogénéiser par inversion.
- Centrifuger à 9000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 30 ml de phosphate buffer froid.
- Retirer 1 ml pour déterminer la densité optique à 660 nm.
- Centrifuger les 29 ml restants à 8000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Enlever le supernageant et resuspendre le culot dans du M2G liquide pour obtenir une densité optique de 0,3 (quantité de M2G relative à la densité optique mesurée).
- Transférer les cultures dans des Erlenmeyer et incuber à 30°C dans un bain-marie avec agitation. Attendre 2 minutes avant de commencer le prélèvement d'échantillons.
- Prendre des échantillons toutes les 15 minutes pendant 140 minutes.

5.4.8 Microscopie

5.4.8.1 Préparation des échantillons

- Inoculer la souche de *C. crescentus* d'intérêt dans le milieu adéquat et incuber à 30°C durant une nuit.
- Le lendemain, diluer la culture pour obtenir une densité optique (660 nm) de ~0,1 et incuber jusqu'à obtention d'une densité optique (660 nm) entre 0,2 et 0,6*.

* Si une induction au xylose doit être réalisée, diluer ensuite cette culture en milieu supplémenté en xylose (0,1%) et préparer des coupes pour les temps 0h, 1h et 3h après induction.

5.4.8.2 Préparation des coupes

- Sur une lame de microscopie, étaler uniformément 750 µl de milieu agar (pad).
- Ensuite déposer 3 µl au centre du pad et recouvrir avec une lame couvre-objet.

5.5 Techniques relatives à l'utilisation de protéines

5.5.1 Préparation d'échantillons protéiques pour la réalisation d'un Western blot

- Inoculer une souche de *C. crescentus* dans 5 mL de PYE avec antibiotique si nécessaire.
- Le lendemain matin, mesurer la densité optique à 660 nm.
- Centrifuger 2 ml de la culture à 9000 rpm pendant 2 minutes.
- Enlever le supernageant et resuspendre le culot dans du tampon de chargement protéique 1x en fonction de la densité optique mesurée (si densité optique ~0,5 ; resuspendre dans 50 µl).
- Faire bouillir les échantillons pendant 10 minutes à 100°C.

5.5.2 Analyse de l'expression des protéines par Western blot

5.5.2.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

- Utilisation d'un gel précoulé Biorad.
- Charger 10 µl d'échantillon protéique par puits, charger un marqueur de poids moléculaire dans un des puits, remplir la cuve avec du running buffer 10X.
- Régler le courant sur 45 mA/gel (200V) et laisser migrer jusqu'à ce que le front de migration disparaisse.

5.5.2.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) adjacente est assuré par un courant électrique (14V, 3mA par cm² de membrane) appliqué perpendiculairement au gel et permettant la migration des protéines chargées négativement.

Après transfert, placer la membrane dans une solution de blocking durant une nuit à 4°C.

5.5.2.3 Immunomarquage

- Enlever la solution de blocking et ajouter 10 ml d'une solution d'une solution de blocking dans laquelle se trouve l'anticorps primaire adéquat et incubé pendant 2-3h.
- Rincer la membrane 3 à 5x avec du PBS tween pendant 3 minutes.
- Ajouter la solution de blocking dans laquelle se trouve l'anticorps secondaire adéquat et incubé pendant 45 minutes.
- Rincer la membrane 5x avec du PBS tween pendant 5 minutes.

5.5.2.4 Immunodétection

- Mélanger les solutions de révélation selon un ration 1:1 (2 ml de solution A et 2 ml de solution B par membrane).
- Enlever la membrane du PBS tween et incubé celle-ci avec le mélange des solutions de révélation.
- Révéler.

5.5.3 Immunoprécipitation

5.5.3.1 Lyse cellulaire

- Inoculer une colonie fraîche de la souche de *C. crescentus* dans 5 ml de PYE et incubé à 30°C pendant une nuit.
- Le lendemain, diluer la culture dans 200 ml de PYE et incubé à 30°C jusqu'à obtention d'une densité optique (660 nm) ~0,5-0,7.
- Récupérer les cellules par centrifugation à 7000 rpm pendant 20 minutes à 4°C.
- Rincer le culot en le resuspendant dans 20 ml de phosphate buffer.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Répéter l'étape de lavage et resuspendre le culot dans 2 ml de tampon d'extraction.
- Soniquer les échantillons avec 6 cycles de 10 secondes et rester 50 secondes sur glace entre les cycles de sonication. Répartir les échantillons de 2 ml dans de nouveaux eppendorfs de 2 ml à raison de 500 µl chacun.
- Ajouter ¼ du volume final en bille de zirconium et lyser les cellules avec le Fastprep dans une chambre froide.
- Centrifuger les échantillons à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C pour retirer les membranes et les protéines non solubilisées.
- Quantifier le lysat protéique en utilisant le Bradford assay et diluer l'échantillon (idéalement 1 à 2 mg de protéines par ml).

5.5.3.2 *Bradford assay*

Bradford assay

- Préparer le standard BSA comme suit:

0 µg	/	800 µl PBS 1X
1 µg	10 µl 100 µg/ml BSA	790 µl PBS 1X
2 µg	20 µl 100 µg/ml BSA	780 µl PBS 1X
4 µg	40 µl 100 µg/ml BSA	760 µl PBS 1X
8 µg	80 µl 100 µg/ml BSA	720 µl PBS 1X
16 µg	160 µl 100 µg/ml BSA	640 µl PBS 1X

- Diluer les échantillons deux fois comme suit:
1 µl d'échantillon 799 µl PBS 1X
2 µl d'échantillon 798 µl PBS 1X
- Ajouter 200 µl de solution Bradford (5X) et incuber 2-30 minutes avant de mesurer la densité optique à 595 nm.
- Evaluer la concentration protéique en se basant sur la courbe standard BSA.

5.5.3.3 *Préparer les billes magnétiques*

Pour préparer l'équivalent d'une IP d'ANTIFLAG M2 Magnetic Beads :

- Transférer 50 µl de billes ANTIFLAG M2 Magnetic Beads dans un eppendorf 1,5 ml et le placer sur un aimant.
- Rincer 4x les billes avec du tampon de lavage de billes et les resuspendre dans 50 µl de PBS_20mg/ml BSA.

5.5.3.4 *Immunoprécipitation (IP)*

Vous avez besoin de 1 ml de solubilisé (1-2 mg/ml) par IP.

- Enlever une petite fraction (50 µl) du solubilisé (= Input), ajouter 12 µl de SDS Sample Buffer 5X et faire bouillir 5 à 10 minutes
- Ajouter les 950 µl de solubilisé restant aux billes.
- Incuber le mélange à 4°C pendant 1 heure avec une rotation end-over-end.
- Placer l'échantillon sur l'aimant et enlever le supernageant.
- Transférer 50 µl du supernageant dans un tube 1,5 ml (= flow trough : pour comparer à l'Input, ajouter 12µl de de SDS Sample Buffer 5X et faire bouillir 5 à 10 minutes.
- Rincer 3 à 6x dans 1 ml de CoIP Wash Buffer.
- Après le dernier rinçage, resuspendre les billes dans 100 µl de SDS Sample Buffer 1X.
- Ajouter 5 µl de peptide 3FLAG (de 0,5 mg/ml) et incuber pendant 5 minutes avec agitation.
- Faire bouillir 5 à 10 minutes.
- Placer le tube sur l'aimant et transférer le supernageant dans un nouveau tube 1,5 ml.
- Charger les échantillons sur un gel pour réaliser un Western blot comme suit :
Input 10 µl
Flowthrough 10 µl
IP 1 µl, 5 µl et 10 µl

Bibliographie

6. Bibliographie

- Aaron, M. et al., 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*, 64(4), pp.938–952.
- Adams, D.W. & Errington, J., 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews in Microbiology*, 7, pp.642–653.
- Anderson, D.E., Gueiros-filho, F.J. & Erickson, H.P., 2004. Assembly Dynamics of FtsZ Rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and Effects of FtsZ-Regulating Proteins. *Journal of Bacteriology*, 186(17), pp.5775–5781.
- Andersson, J.O. & Roger, A.J., 2003. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC evolutionary biology*, 3(14).
- Batut, J., Andersson, S.G.E. & O’Callaghan, D., 2004. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nature reviews in Microbiology*, 2(12), pp.933–945.
- Bernhardt, T.G. & de Boer, P. a J., 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular cell*, 18(5), pp.555–564.
- Biteen, J. et al., 2012. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of the Midplane Protein FtsZ in Live *Caulobacter crescentus* Cells Using Astigmatism. *ChemPhysChem*, 13(4), pp.1007–1012.
- De Boer, P. a J., Crossley, R. & Rothfield, L., 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359(6392), pp.254–256.
- Bramkamp, M. et al., 2008. A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Molecular microbiology*, 70(6), pp.1556–1569.
- Britton, K.L. et al., 1992. Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *European journal of biochemistry / FEBS*, 209(3), pp.851–859.
- Burns, R., 1998. Synchronized division proteins. *Nature*, 391, pp.121–123.
- Chen, Y. & Erickson, H.P., 2005. Rapid in Vitro Assembly Dynamics and Subunit Turnover of FtsZ Demonstrated by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *The Journal of biological chemistry*, 280(23), pp.22549–22554.
- Chien, P. et al., 2007. Direct and adaptor-mediated substrate recognition by an essential AAA+ protease. *PNAS*, 104(16), pp.6590–6595.

- Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases*, 3(2), pp.213–221.
- Curtis, P.D. & Brun, Y. V, 2010. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(1), pp.13–41.
- Durand-Heredia, J.M. et al., 2011. Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 193(6), pp.1405–1413.
- Ebersbach, G. et al., 2008. A multimeric pole-organizing protein critical for chromosome attachment, division and protein localization in *Caulobacter*. *Cell*, 134(6), pp.956–968.
- Erickson, H.P. et al., 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *PNAS*, 93(1), pp.519–523.
- Erickson, H.P., 1997. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends in cell biology*, 7(9), pp.362–367.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E. & Osawa, M., 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(4), pp.504–528.
- Gelvin, S.B., 2003. *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation : the Biology behind the “ Gene-Jockeying ” Tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), pp.16–37.
- Goley, E.D. et al., 2011. Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Molecular microbiology*, 80(6), pp.1680–1698.
- Goley, E.D., Comolli, L.R., et al., 2010. DipM links peptidoglycan remodelling to outer membrane organization in *Caulobacter*. *Molecular microbiology*, 77(1), pp.56–73.
- Goley, E.D., Dye, N.A., et al., 2010. Imaging-based identification of a critical regulator of FtsZ protofilament curvature in *Caulobacter*. *Molecular Cell*, 39(6), pp.975–987.
- Gueiros-Filho, F.J. & Losick, R., 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & development*, 16(19), pp.2544–2556.
- Hallez, R. et al., 2004. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends in microbiology*, 12(8), pp.361–365.
- Höltje, J. V, 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), pp.181–203.
- Kiekebusch, D. et al., 2012. Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Molecular cell*, 46(3), pp.245–259.
- Kirkpatrick, C.L. & Viollier, P.H., 2011. New(s) to the (Z-)ring. *Current Opinion in Microbiology*, 14, pp.691–697.

- Löwe, J. & Amos, L. a, 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391, pp.203–206.
- Lu, C. & Abdelal, A.T., 2001. The *gdhB* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes an Arginine- Inducible NAD⁺-Dependent Glutamate Dehydrogenase Which Is Subject to Allosteric Regulation. *Journal of Bacteriology*, 183(2), pp.490–499.
- Lutkenhaus, J., 2007. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.539–562.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S. & Du, S., 2012. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton*, 69(10), pp.778–790.
- Ma, X. & Margolin, W., 1999. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *Journal of bacteriology*, 181(24), pp.7531–7544.
- Marczynski, G.T., 1999. Chromosome methylation and measurement of faithful, once and only once per cell cycle chromosome replication in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology*, 181(7), pp.1984–1993.
- Margolin, W., 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiology reviews*, 24, pp.531–548.
- Marston, A.L. et al., 1998. Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes & Development*, 12(21), pp.3419–3430.
- Milam, S.L. & Erickson, H.P., 2013. Rapid in vitro assembly of *Caulobacter crescentus* FtsZ protein at pH 6.5 and 7.2. *The Journal of biological chemistry*, 288(33), pp.23675–23679.
- Miñambres, B. et al., 2000. A new class of glutamate dehydrogenases (GDH): Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *The Journal of biological chemistry*, 275(50), pp.39529–39542.
- Möll, A. et al., 2010. DipM, a new factor required for peptidoglycan remodelling during cell division in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*, 77(1), pp.90–107.
- Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J., 1994. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *Journal of bacteriology*, 176(9), pp.2754–2758.
- Nogales, E., Wolf, S.G. & Downing, K.H., 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391, pp.199–204.
- Osawa, M., Anderson, D.E. & Erickson, H.P., 2008. Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. *Science*, 320(5877), pp.792–794.
- Osteryoung, K.W. et al., 1998. Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *The Plant cell*, 10(12), pp.1991–2004.

- Patrick, J.E. & Kearns, D.B., 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 70(5), pp.1166–1179.
- Pichoff, S. & Lutkenhaus, J., 2005. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Molecular microbiology*, 55(6), pp.1722–1734.
- Poggio, S. et al., 2010. A protein critical for cell constriction in the Gram-negative bacterium *Caulobacter crescentus* localizes at the division site through its peptidoglycan-binding LysM domains. *Molecular microbiology*, 77(1), pp.74–89.
- Poindexter, J.S., 1981. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiological reviews*, 45(1), pp.123–179.
- Radhakrishnan, S.K., Pritchard, S. & Viollier, P.H., 2010. Coupling prokaryotic cell fate and division control with a bifunctional and oscillating oxidoreductase homolog. *Developmental cell*, 18(1), pp.90–101.
- Romberg, L. & Levin, P.A., 2003. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annual review of microbiology*, 57, pp.125–154.
- Roop, R.M. et al., 2004. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Molecular microbiology*, 52(3), pp.621–630.
- Schofield, W.B., Lim, H.C. & Jacobs-Wagner, C., 2010. Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *The EMBO journal*, 29(18), pp.3068–3081.
- Sliusarenko, O. et al., 2011. High-throughput, subpixel-precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Molecular microbiology*, 80(3), pp.612–627.
- Stricker, J. et al., 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *PNAS*, 99(5), pp.3171–3175.
- Sun, Q. & Margolin, W., 1998. FtsZ Dynamics during the Division Cycle of Live *Escherichia coli* Cells. *Journal of Bacteriology*, 180(8), pp.2050–2056.
- Thanbichler, M. & Shapiro, L., 2008. Getting organized — how bacterial cells move proteins and DNA. *Nature reviews Microbiology*, 6, pp.28–40.
- Thanbichler, M. & Shapiro, L., 2006. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*, 126(1), pp.147–162.
- Tipparaju, S. et al., 2008. Catalytic mechanism and substrate specificity of the β -subunit of the voltage-gated potassium (Kv) channel. *Biochemistry*, 47(34), pp.8840–8854.
- Uno, I., Matsumoto, K. & Adachi, K., 1984. Regulation of NAD-dependent glutamate dehydrogenase by protein kinases in Regulation of NAD-dependent Glutamate

- Dehydrogenase by Protein Kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 259(2), pp.1288–1293.
- Ursinus, A. et al., 2004. Murein (Peptidoglycan) Binding Property of the Essential Cell Division Protein FtsN from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(20), pp.6728–6737.
- Vaughan, S. et al., 2004. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *Journal of molecular evolution*, 58(1), pp.19–29.
- Vicente, M. et al., 2006. Septum Enlightenment : Assembly of Bacterial Division Proteins. *Journal of Bacteriology*, 188(1), pp.19–27.
- Ward, J.E. jr & Lutkenhaus, J., 1985. Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell*, 42(3), pp.941–949.
- Weart, R.B. et al., 2007. A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell*, 130(2), pp.335–347.
- White, C.L., Kitich, A. & Gober, J.W., 2010. Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Molecular microbiology*, 76(3), pp.616–633.
- Wu, L.J. et al., 2009. Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO journal*, 28(13), pp.1940–1952.
- Wu, L.J., Errington, J. & Williams, S., 2004. Coordination of Cell Division and Chromosome Segregation by a Nucleoid Occlusion Protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 117, pp.915–925.
- Yeh, Y.-C. et al., 2010. The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *Journal of bacteriology*, 192(19), pp.4847–4858.

