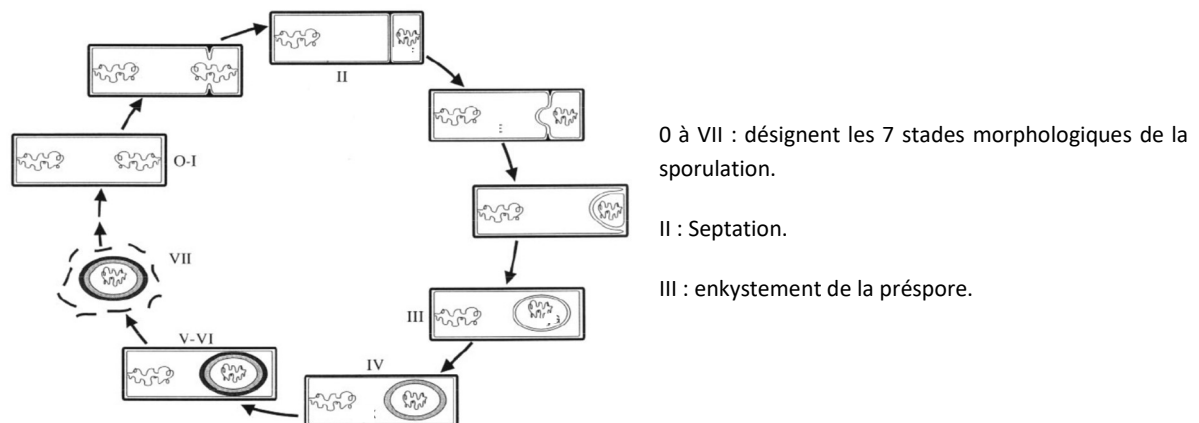


## TD EBM-Différenciation-Evolution-Bactériennes :

### I-Sporulation chez *B. subtilis* :

En condition de carence, la bactérie *Bacillus subtilis* a la possibilité d'entrer en **sporulation**. Ce mécanisme de survie, qui aboutit à la formation d'une spore, est schématisé dans la figure 1. Ce processus débute par un allongement de la cellule, accompagné de la réplication de son ADN; mais au lieu d'avoir une division cellulaire égale, comme dans le cas du cycle végétatif, il y a une invagination de la membrane cytoplasmique, qui découpe la cellule en deux parties inégales. La petite partie entoure une des deux molécules filles du chromosome bactérien, formant la préspore. Cette préspore, qui reste à l'intérieur de la cellule mère durant le processus de maturation, va s'entourer d'une paroi épaisse et très résistante, aboutissant à la formation de la spore. Pendant ce temps, la cellule mère se lyse progressivement, permettant en fin de processus, la libération de la spore. Ainsi, à partir d'une cellule, deux types cellulaires bien différenciés vont être créés. Ce processus de différenciation met en jeu plus de 125 gènes, dont la transcription est contrôlée dans l'espace (cellule mère versus préspore) et dans le temps, et ceci notamment grâce à 4 facteurs sigma ( $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ , et  $\sigma^K$ ).

Figure 1 : Stades de sporulation chez *B. subtilis*



### Première partie : Localisation spatiale et temporelle des activités de ces différents facteurs sigma.

Le gène *lacZ* (codant la  $\beta$ -galactosidase) a été placé sous le contrôle d'un promoteur d'un gène soit dépendant du facteur sigma  $\sigma^F$  (gène *omeS* : construction  $\text{prom}^{\text{omeS}}\text{-lacZ}$ ), soit dépendant du facteur sigma  $\sigma^E$  (gène *etiC* :  $\text{prom}^{\text{etiC}}\text{-lacZ}$ ), soit dépendant du facteur sigma  $\sigma^G$  (gène *niaL* :  $\text{prom}^{\text{niaL}}\text{-lacZ}$ ), et soit dépendant du facteur sigma  $\sigma^K$  (gène *esiS* :  $\text{prom}^{\text{esiS}}\text{-lacZ}$ ). Différentes souches de *B. subtilis* ont été construites porteuses de plusieurs copies d'une même construction donnée et ceci pour les 4 versions. Après induction de la sporulation, à

partir d'échantillons prélevés à différents stades, les cellules ont été fixées, préparées et sectionnées. Les coupes ainsi obtenues, ont été traitées avec des anticorps anti- $\beta$ -galactosidase, puis avec des anticorps secondaires conjugués à des grains d'or (voir figure 2). L'ensemble a été analysé par microscopie électronique. La figure 3 présente les stades où les grains d'or ont pu être visualisés.

Figure 2 : Suivi de l'expression du gène *lacZ*

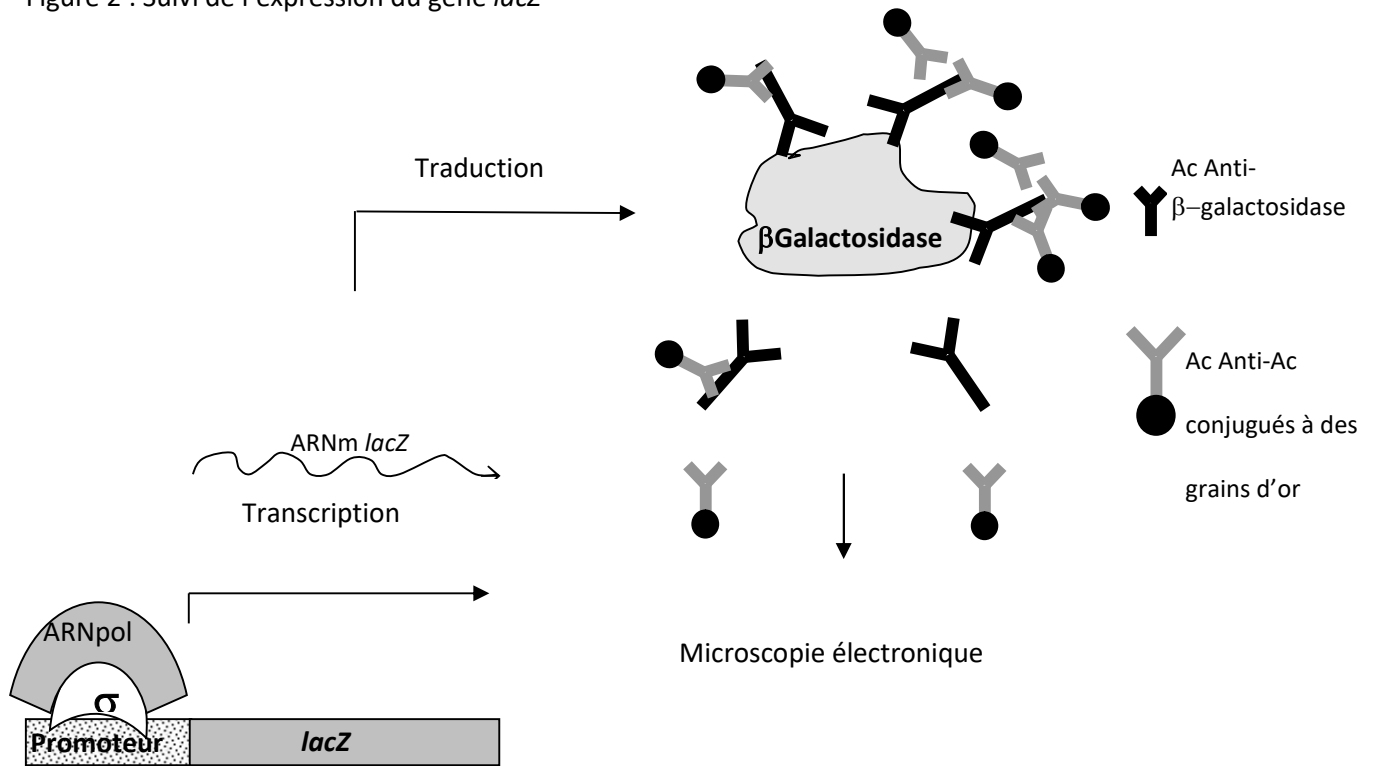
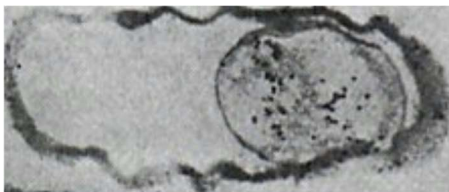
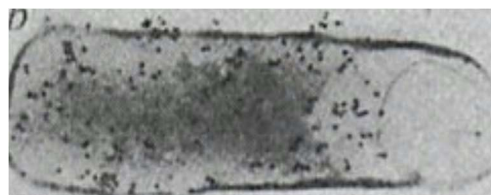


Figure 3 :

Construction  $\text{prom}^{\text{omeS}}\text{-lacZ}$



Construction  $\text{prom}^{\text{étic}}\text{-lacZ}$



Stades intermédiaires

(II)



Construction  $\text{prom}^{\text{niaL}}\text{-lacZ}$



Construction  $\text{prom}^{\text{ésis}}\text{-lacZ}$

Stades tardifs

(III - IV)

CM = Cellule mère

PS = Présore

Rappel : le gène *omeS* est sous le contrôle du facteur sigma  $\sigma^F$ . Pour le gène *étiC*, il s'agit du facteur sigma  $\sigma^E$ , pour le gène *niaL* : le sigma  $\sigma^G$  et pour le gène *ésiS* : le sigma  $\sigma^K$ .

- **Question 1** : Dans cette expérience, quel est le rôle du gène *lacZ* ?

- **Question 2** : Commentez la figure 2.

- **Question 3** : Quel est l'intérêt de travailler avec des souches porteuses de plusieurs copies de la construction *lacZ* ?

- **Question 4** : Décrivez les résultats obtenus en figure 3, puis interprétez -les. Quelles sont les hypothèses qui peuvent rendre compte de ces observations ?

Seconde partie : Régulation de l'activité du facteur sigma F.

Le facteur  $\sigma^F$  est codé par le gène *spoIIAC*, troisième cistron de l'opéron *spoIIA*. L'expression de cet opéron débute au tout début de la sporulation, avant la formation du septum, c'est-à-dire avant la compartimentation cellulaire. Le facteur  $\sigma^F$  est donc présent dans les deux compartiments dès les stades précoces de la sporulation. L'expression de *lacZ* sous le contrôle d'un promoteur dépendant de  $\sigma^F$  est cependant restreinte à la présore et ne se manifeste qu'à un stade plus tardif (stade II, voir figure 3).

- **Question 5** : Que vous suggèrent ces données ?

Les deux autres cistrons de l'opéron *spoIIA* (*spoIIAA* et *spoIIAB*) seraient impliqués dans cette régulation. Des mutations nulles dans *spoIIAA* (comme dans *spoIIAC*) bloquent la sporulation au stade II; par contre celles dans *spoIIAB* bloquent la sporulation au stade O. De plus, il a été mis en évidence que les produits des cistrons *spoIIAA* et *spoIIAB* peuvent interagir physiquement, et que ces protéines ne se fixent pas à l'ADN. Afin de comprendre leur rôle respectif, l'activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase a été mesurée dans des souches porteuses d'une construction  $\text{prom}^{\sigma^F}\text{-LacZ}$  et ceci dans différents contextes génétiques : soit en présence d'une mutation *spoIIAC*<sup>-</sup>, soit *spoIIAA*<sup>-</sup>, soit *spoIIAB*<sup>-</sup>, soit du double mutant *spoIIAA*<sup>-</sup> *spoIIAB*<sup>-</sup>. Les résultats sont donnés dans la table I.

Tableau I :

	$\beta$ -galactosidase (%*)
Sauvage	100
<i>spoIIAC</i> <sup>-</sup>	<2
<i>spoIIAA</i> <sup>-</sup>	<2
<i>spoIIAB</i> <sup>-</sup>	5000
<i>spoIIAA</i> <sup>-</sup> <i>spoIIAB</i> <sup>-</sup>	4000

\* Pourcentage d'activité  $\beta$ -galactosidase accumulée par rapport au sauvage.

**Question 6** : Décrivez, puis analysez les données de la table I.

## II-Différenciation et évolution chez les bactéries à pédoncules :

*Partie I : avec des outils « anciens » (tirés d'un article de 1971).*

Un bactériophage à ADN ( $\phi$ CbK) capable d'infecter *C. crescentus* a été isolé. Des expériences d'infections ont été réalisées sur différentes souches (tableau 2).

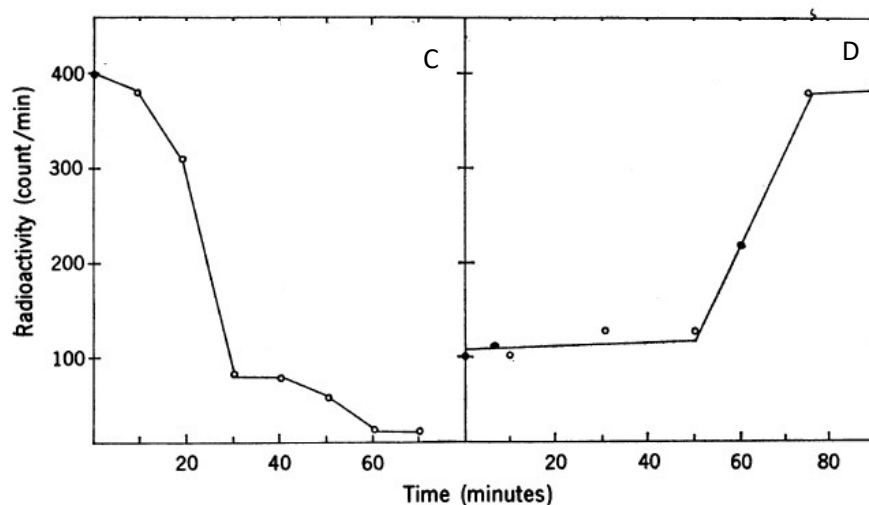
Table 2. The ability of bacteriophage  $\phi$ CbK to adsorb, infect, and inject its DNA into swarmer and stalked cells of wild-type and mutant host strains (27).

Cell type	Phage adsorption (%)	Phage eclipsed (%)	Phage $^{32}$ P-DNA recovered in host cell (count/min)
Wild-type swarmer	90	80	558
Wild-type stalked	80	1	19
$\phi$ -Resistant I swarmer	0	4	96
$\phi$ -Resistant I stalked	0	3	62
$\phi$ -Resistant II swarmer	90		64
$\phi$ -Resistant II stalked	95		69

**Question 1 :** Quels renseignements et hypothèses peut-on tirer de ces données ?

Il est assez facile de séparer les cellules nageuses des cellules avec pédoncules par centrifugation différentielle. Grâce à ce moyen technique il est possible d'obtenir des cultures synchronisées.

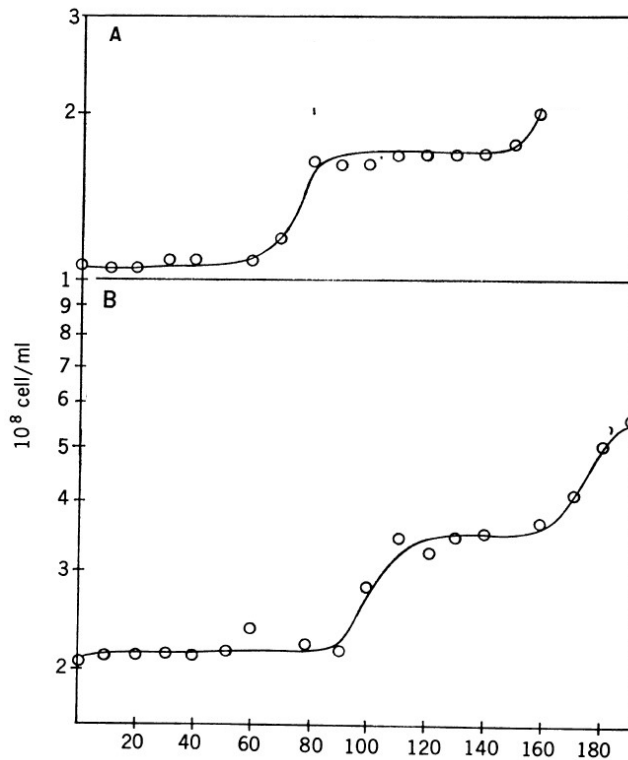
Un autre bactériophage, à ARN cette fois, a été isolé, celui-ci est uniquement capable de s'adsorber sur les pilis de *C. crescentus*. En utilisant ce bactériophage dont le génome a été marqué avec de l'ATP( $\alpha$ -P $^{32}$ ), dans une expérience de filtration douce, après mise en contact avec des cellules nageuses, les résultats de la figure C sont obtenus.



Dans la figure D une expérience d'infection, avec le phage  $\phi$ CbK dont le génome a été marqué par du dATP( $H^3$ ), sur des cellules pédonculées a été entreprise.

**Question 2 :** Interprétez les résultats obtenus.

En ensemençant cellules nageuses (figure B) ou cellules pédonculées (figure A) à 30°C dans un nouveau milieu de culture, des cultures synchronisées sont obtenues.



**Question 3 :** en utilisant les données précédentes interprétez les différentes phases de croissances observées.

Deux expériences de croisement génétique de souches caractérisées par des génotypes différents ont été réalisées (tableau 3).

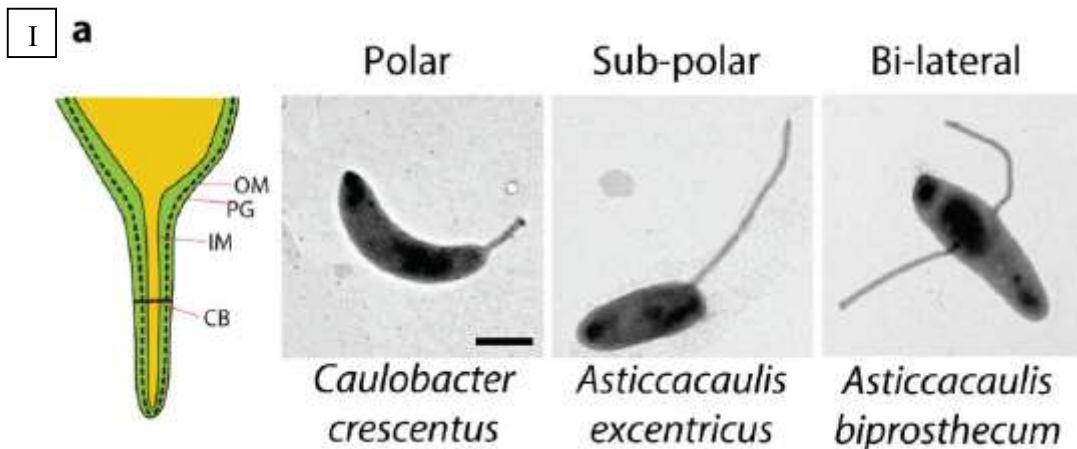
Tableau 3 : croisement génétique (CFU= colony-forming units)

Strains or crosses	Complete media (CFU)	Selective media (CFU)
<i>Cross I</i>		
CB15Str <sup>R</sup> Bio <sup>+</sup>	$3.8 \times 10^{10}$	$1.0 \times 10^2$
CV115Str <sup>R</sup> Bio <sup>-</sup>	$8.6 \times 10^{10}$	0
CB15Str <sup>R</sup> Bio <sup>+</sup> $\times$ CV115Str <sup>R</sup> Bio <sup>-</sup>	$1.1 \times 10^{11}$	$1.9 \times 10^5$
<i>Cross II</i>		
CV163Str <sup>R</sup> Pro <sup>+</sup> Vit <sup>-</sup> yellow	$1.0 \times 10^9$	0
CB13Str <sup>R</sup> Pro <sup>+</sup> Vit <sup>+</sup> white	$5.8 \times 10^9$	$4.2 \times 10^1$
CV163Str <sup>R</sup> Pro <sup>+</sup> Vit <sup>-</sup> yellow $\times$ CB13Str <sup>R</sup> Pro <sup>+</sup> Vit <sup>+</sup> white	$1.0 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^6$

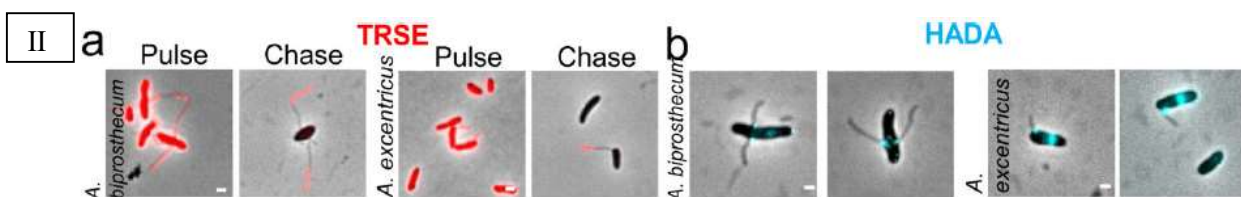
**Question 4 :** Donnez la composition des milieux sélectifs utilisés dans cette expérience. Utilisez les données du tableau afin d'interpréter les croisements effectués ? Que peut-on en déduire ?

**Partie II :** avec des outils « modernes » (tirés d'un article de 2014).

Parmi les bactéries vivant dans des environnements oligotrophes, certaines ont développé la capacité de produire un pédoncule. Chez les Caulobacteraceae, différents genres et différentes espèces ont été isolées et elles présentent un pédoncule polaire (*C. crescentus*(Cc)) ou sub-polaire (*Asticcacaulis excentricus*(Ae)), ou deux pédoncules latéraux (*Asticcacaulis biprosthecum*(Ab)). Les pédoncules sont constitués des membranes, du peptidoglycane et par des protéines spécifiques appelées cross-bands (cb) (figure I a).



Chez *C. crescentus*, il est connu que le pédoncule est synthétisé à partir de la « base » par insertion de peptidoglycane. Afin de savoir si le même mécanisme est en jeu chez *Ae* et *Ab* des expériences de pulse chase labeling ont été mené avec du TRSE (Texas red Succinimydil Ester : marquage des enveloppes (outer-membranes proteins)) et un marquage bref spécifique du peptidoglycane avec du HADA (7-hydroxycoumarin-amino-D-Alanine) (figure IIa et IIb).

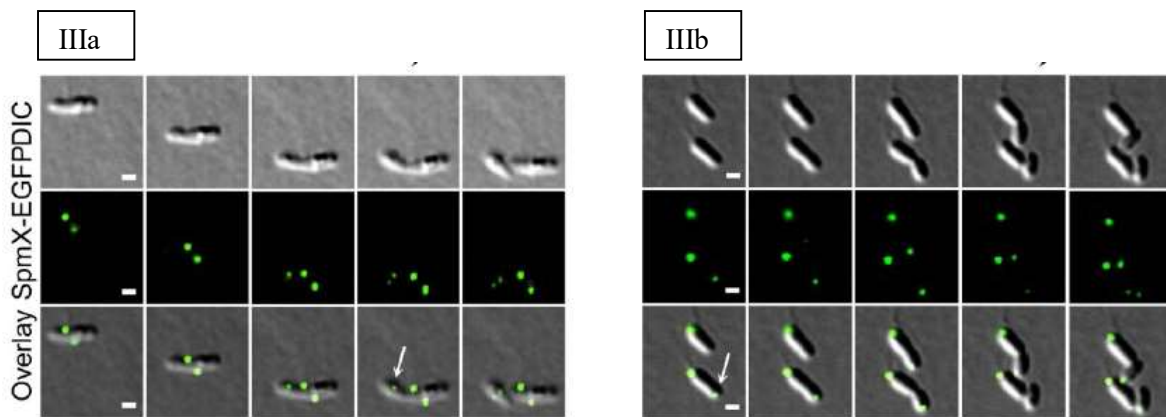


**Question 5 :** qu'en déduisez vous quant aux mécanismes de synthèse des pédoncules chez *Ae* et *Ab* ?

Afin d'identifier le « morphogène » impliqué dans la localisation du pédoncule, des fusions avec la EGFP ont été réalisées dans plusieurs protéines déjà connues pour être localiser à la base du pédoncule chez *Cc*. DivJ, PleC, PopZ et SpmX. Ces fusions ont été étudiées chez *Ab*.

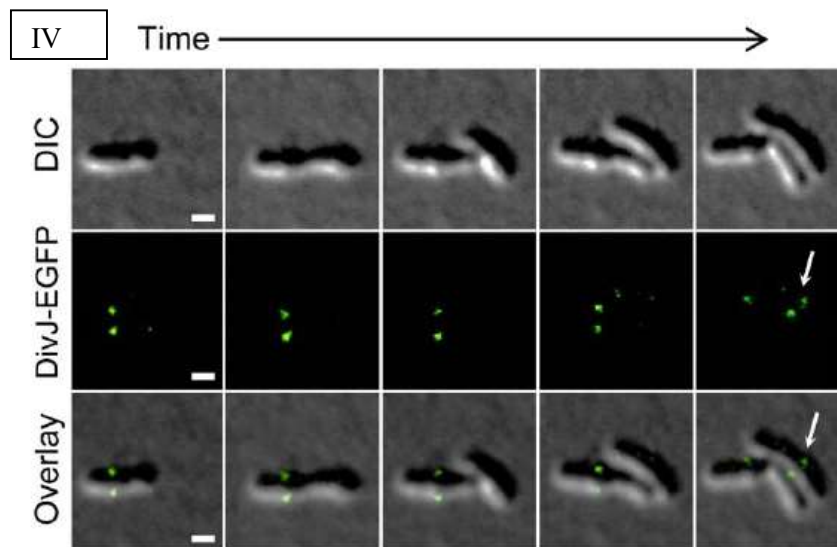
Or seulement DivJ et SpmX se localisent à la base du pédoncule chez cette souche.

Un suivi dans le temps de la localisation de SpmX-EGFP dans *Ab* (IIIa) et *Ae* (IIIb) a été effectué :



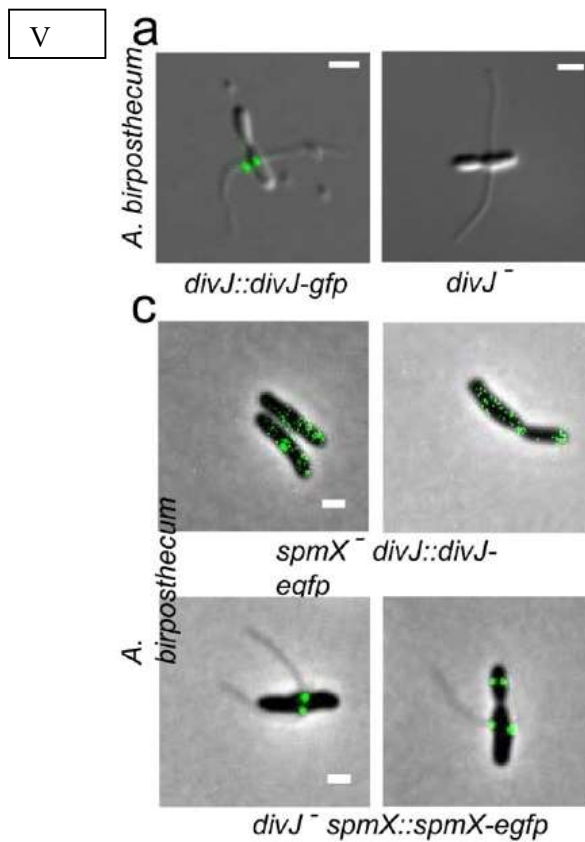
**Question 6 :** Réalisez un schéma montrant la localisation de SpmX en fonction du cycle cellulaire chez *Ab* et *Ae*.

La même expérience a été réalisée avec DivJ-EGFP chez *Ab*. (Même résultats obtenus avec *Ae*) (figure IV).



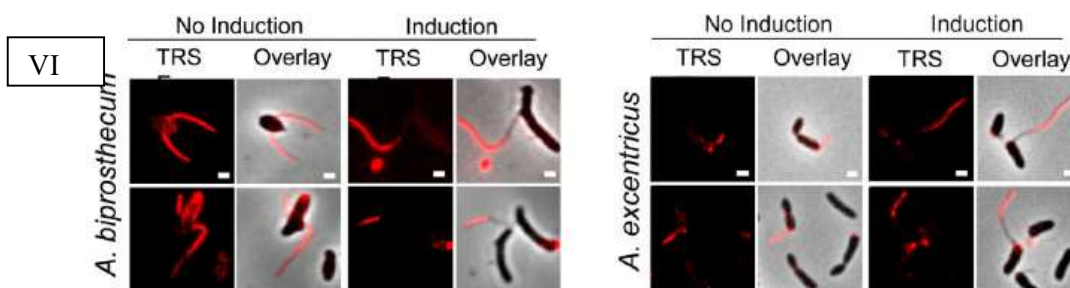
**Question 7 :** Réalisez un schéma montrant la localisation de SpmX en fonction du cycle cellulaire chez *Ab*.

Des expériences similaires ont été réalisées dans des contextes génétiques différents (figure V).



**Question 8 :** qu'en déduisez vous concernant l'ordre d'apparition à la base du pédoncule de DivJ et SpmX ?

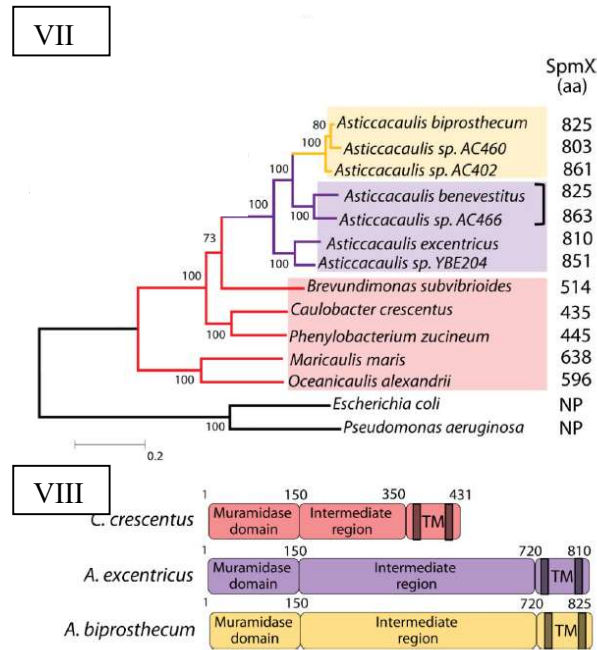
Chez *Ae* et *Ab* des constructions permettant de mettre le gène codant SpmX sous l'influence d'un promoteur inductible (xylose-inductible) ont été obtenues. Des expériences de pulse-chase en présence de TRSE ont été réalisées (figure VI).



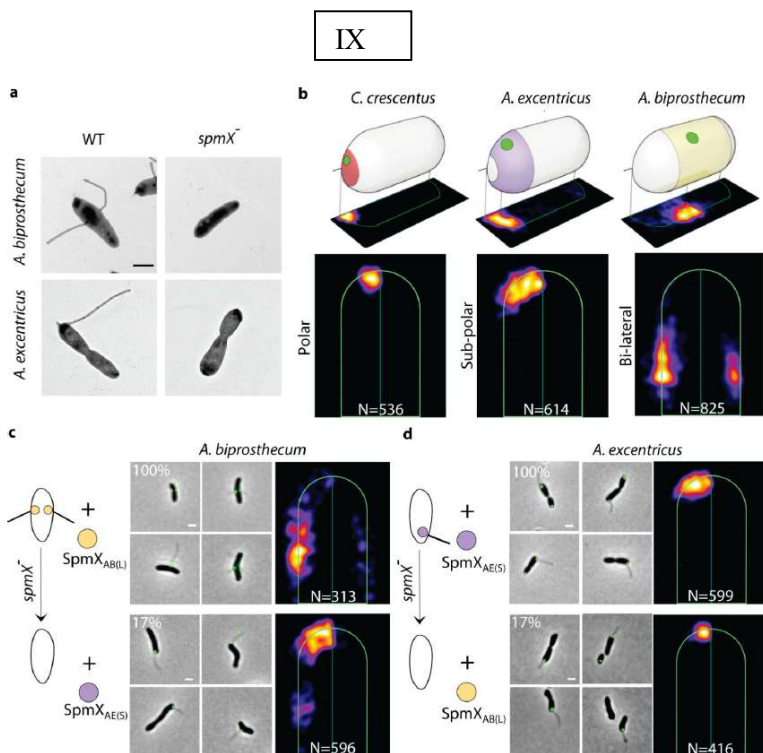
**Question 9 :** Interprétez les résultats.



**Question 10** : Sachant que chez *Cc*, SpmX n'est pas nécessaire à la formation des pédoncules et en analysant l'arbre phylogénétique (basé sur l'ADNr 16S) ci-dessous (figure VII) et la comparaison de l'organisation des domaines de SpmX (figure VIII), formulez une ou des hypothèses concernant l'évolution de l'apparition des différentes localisation des pédoncules.



Pour affiner le modèle évolutif, des expériences de complémentation croisées ont été menées (figure IX).



SpmX specifies the location of stalk synthesis in *Asticcacaulis*. (a) SpmX is required for stalk synthesis in *Asticcacaulis*. Transmission electron microscopy images of *Asticcacaulis* species and their respective *spmX*<sup>-</sup> mutants. Data are representative of five biological repetitions. (b) Heat maps of the localization patterns of SpmX-EGFP in three species with differentially positioned stalks. The number (N) of foci quantified is shown at the bottom of each map. For simplicity throughout the paper, we use SpmX<sub>CC(P)</sub>, SpmX<sub>AE(S)</sub> and SpmX<sub>AB(L)</sub> to denote SpmX from *C. crescentus* (CC), *A. excentricus* (AE), and *A. biprosthecum* (AB), with the subscripts P, S, and L indicating their native polar, sub-polar, and lateral positioning, respectively. (c-d) Microscopy images and heat maps of the *A. biprosthecum* and *A. excentricus* *spmX*<sup>-</sup> mutant expressing SpmX<sub>AB(L)</sub>-EGFP or SpmX<sub>AE(S)</sub>-EGFP. The percentage represents the stalk synthesis ability for each strain compared to the control *spmX*<sup>-</sup> mutant expressing native SpmX-EGFP.

Des expériences complémentaires ont également montré que c'est le domaine C-Terminale de SpmX qui est impliqué dans la localisation du pédoncule chez *Ae* et *Ab*.

**Question 11** : réalisez un schéma récapitulatif de l'évolution de cette différenciation cellulaire bactérienne.