



HAL
open science

Mécanismes moléculaires de l'acquisition de la forme cellulaire chez *Bacillus subtilis*

Arnaud Chastanet

► **To cite this version:**

Arnaud Chastanet. Mécanismes moléculaires de l'acquisition de la forme cellulaire chez *Bacillus subtilis*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Sud (Faculté des sciences d'Orsay), 2015. tel-04283793

HAL Id: tel-04283793

<https://hal.inrae.fr/tel-04283793v1>

Submitted on 14 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Habilitation à Diriger des Recherches

Mémoire présenté par
Arnaud Chastanet

CR1 I.N.R.A.
Groupe Développement de la Cellule Procaryote (ProCeD)
Laboratoire Micalis, UMR1319, INRA, Jouy-en-Josas

Mécanismes moléculaires de l'acquisition de la forme cellulaire chez *Bacillus subtilis*

Devant le jury composé de :

Mme A. Galinier, DR2 CNRS
M. C. Grangeasse, DR CNRS
M. A. Boudaoud, PR1, ENS
M. V. Fromion, DR2 INRA
M. N. Bayan, PR1, Université P-Sud

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président

Sommaire :

CV	3
Activités de Recherche	8
I - Du pré- au post-doctorat...	
A- Le stage pré-doctoral (1997-1998).	9
B- Le DEA et le doctorat (1998-2003)	10
C- Le post-doctorat (2004-2009)	13
II – Travaux en cours	
A- Présentation de la thématique	19
B- Recherche de protéines en interactions avec MreB	22
C- Comprendre l'organisation spatio-temporelle de MreB	23
D- Révéler la fonction de MreB	28
E- Bilan et perspectives	32
Références bibliographiques	33
Annexes	
I - Projets associés ou collaboratifs	36
II - Sélection de publications	36

CV

Etat Civil

Nom : Chastanet
Prénom : Arnaud
Date de naissance : 05/04/1976
Statut actuel : CR1 (INRA)
Laboratoire : Micalis, INRA, Jouy-en-Josas
Email : achastanet@jouy.inra.fr Tel : 01 34 65 25 81
Web : <http://www.micalis.fr/micalis/Poles-et-Equipes/Pole-Biosys/ProCeD-Carballido-Lopez>
Adresse: INRA, Domaine de Vilvert, Bat 440, 78352, Jouy-en-Josas

Titres Universitaires

- **Thèse de Doctorat en Microbiologie**, Université Paris VII-Denis Diderot
(très honorable avec félicitation du jury). **2003**
- **DEA de Microbiologie**, Université Paris VII-Denis Diderot;
(major de promotion) **1999**
- **Diplôme de Microbiologie Générale**, Institut Pasteur
(major de promotion) **1999**
- **Maitrise de Biochimie**, Université Paris XI-Orsay **1997**
- **Licence de Biochimie**, Université Paris XI-Orsay **1996**
- **DEUG SNV**, Université Paris XI-Orsay **1995**

Parcours de Recherche

- Chargé de recherche (CR1)**, Unité Micalis, UMR1319,
INRA France Depuis 01/2012
- Chercheur postdoctoral**, INRA, France.
Supervision: Dr. Rut Carballido-López 07/2009 à 12/2011
- Chercheur postdoctoral**, MCB, Harvard University,
Cambridge, MA, USA. Supervision: Pr. Richard Losick 02/2004 à 06/2009
- Thèse de Doctorat**, Institut Pasteur-Université Paris VII-
Supervision: Dr. Tarek Msadek 10/1999 à 07/2003
- D.E.A.** Institut Pasteur-Université Paris VII-
Supervision: Dr. Tarek Msadek 09/1998 à 09/1999
- Stage de recherche**, Institut Curie- Orsay.
Supervision: Dr. Suzanne Sommer (laboratoire Devoret) 09/1997 à 08/1998

Participation à des comités, Editorial boards, séminaires...

- Participation (2014) à un jury de recrutement pour un poste INRA d'ingénieur de recherche (IRA05) lors de la campagne de recrutement sur concours externe.

- Membre depuis 2013, de deux comités de thèse:

<u>Doctorant(e)</u>	<u>Supervision</u>	<u>Unité, Institut</u>
Sébastien Gélis	L. Slamti & D. Lereclus	Micalis, INRA
Christelle Bressuire	V. Broussolle & F. Carlin	UMR 408, INRA

- Relectures (review) d'articles scientifiques pour :

- Molecular Microbiology
- BMC microbiology
- PNAS

- Evaluation de projets de recherche :

- Sir Henry Dale Fellowship, co-financement Royal Society/Wellcome Trust (2014)
- ANR (2015)

Activités d'enseignements

Intervenant : au M2 de Microbiologie de l'université Paris-sud (Orsay) :

Dans le cadre du M2, j'ai donné deux cours sur :

- le cytosquelette bactérien et son influence sur la morphogénèse, et sur
- les techniques d'imagerie et en particulier les approches de super-résolution.

"Teaching Assistant" à l'université Harvard (Cambridge, MA, USA) pour le cours "MCB 100: Experimental course in molecular and cellular biology" durant mon post-doctorat à l'étranger.

Le MCB100 est un cours pratique ouvert aux étudiants de niveau Licence et Master allant au delà de ce qu'ils ont acquis au cours de leurs travaux pratiques de biologie, et dont le but est de les placer dans un contexte aussi proche que possible de la recherche. Les travaux s'étendent sur un semestre et visent à résoudre une problématique de recherche actuelle. Mon rôle a été de concevoir (projet et design expérimental), proposer (présentation orale pour mise en compétition des projets) puis organiser (préparation du matériel puis encadrement, organisation de réunion de discussion et d'analyse) un des trois projets de recherche proposés cette année là.

Encadrement (étudiants en master, thèse et post-doctorants)

Au total, j'ai encadré 4 étudiants de niveaux M2 ou équivalent et 3 doctorants avec des niveaux d'implication croissants :

Année	Nom	Niveau	Publication associée
<u>EUA :</u>			
2005	Nilay Karahan	Eq. Master2	
2006	John Woo	Eq. Master2	
2007	Thomas Norman	Eq. Master2	
2008-09	Thomas Norman	Thèse	Chastanet <i>et al.</i> , 2010 ¹
<u>France :</u>			
2009-11	Anne-Stéphanie Rueff	Thèse	Rueff <i>et al.</i> , 2014 ²
2013	Alba de San Eustaquio	Post-Master2	
2013-16	Alba de San Eustaquio	Thèse	

¹ **Chastanet A**, Vitkup D, Yuan GC, **Norman TM**, Liu JS, Losick RM. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; May 4;107(18):8486-91

² **Rueff AS***, **Chastanet A***, Dominguez-Escobar J, Yao Z, Yates J, Prejean M-V, Delumeau O, Noirot P, Wedlich-Soldner R, Filipe SR, and Carballido-Lopez R. Mol. Microbiol. 2014, Jan;91(2):348-62. [*co-premier]

Durant la période 2005-09, j'ai encadré aux Etats-Unis trois étudiants en première année de thèse (« rotation students »). Durant celle-ci, les étudiants font des stages de quelques semaines ou mois dans différents laboratoires du département afin de choisir leur futur laboratoire de thèse. Ces étudiants sont confiés à des post-doctorants qui définissent un sujet de recherche et les encadrent pendant toute la durée du stage. Ceci est donc à peu près équivalent à un stage de M2 en France.

En 2008, à l'issue de son stage avec moi, T. Norman a rejoint notre laboratoire afin d'entreprendre sa thèse sur un sujet connecté au mien. Faisant preuve d'une grande autonomie, Thomas a proposé son propre sujet de recherche en concertation avec le responsable du laboratoire et moi. Je l'ai encadré au quotidien jusqu'à mon retour en France en 2009. La grande autonomie des étudiants américains et mon départ à la fin de la première année de sa thèse a limité mon implication dans le projet à 20%. Par son travail, il est associé à une de mes publications en 2010 dans les PNAS.

En 2009, j'ai rejoint le groupe de R. Carballido-Lopez, j'ai partiellement encadré l'un des doctorants du groupe, A-S. Rueff, depuis le début de seconde année jusqu'à sa soutenance en Juillet 2011. Le sujet ayant été défini avant mon arrivé, j'ai été impliqué principalement dans le suivi quotidien des approches expérimentales ainsi que dans les choix tactiques plutôt que dans la stratégie globale. J'ai également effectué la relecture critique de la thèse et la préparation à la soutenance. Les travaux ont donné lieu à une publication sur laquelle nous sommes co-premiers auteurs.

En mai 2013, j'ai recruté une étudiante, Alba de San Eustaquio, déjà diplômée d'un Master en microbiologie (cursus britannique) et désireuse d'effectuer une thèse. J'ai donc conçu un projet de recherche et l'ai embauché sur mon financement (IRG-Reintegration Grant- Marie Curie) jusqu'en septembre 2013. Durant cette période, tandis qu'Alba se familiarisait avec le modèle et commençait le projet, je l'ai préparé pour le concours de l'école doctorale GGC en vue de l'attribution d'un financement de thèse ministériel. Suite à son obtention, Alba a commencé sa thèse sous ma direction en octobre 2013.

Liste de publications (revues internationales avec comité de lecture)
--

15. Mirouze N, Ferret C, Yao Z, **Chastanet A**, Carballido-López R. **PLoS Genet.** **2015** Jun 19;11(6): e1005299.
14. Rueff AS*, **Chastanet A***, Dominguez-Escobar J, Yao Z, Yates J, Prejean M-V, Delumeau O, Noiro P, Wedlich-Soldner R, Filipe SR, and Carballido-Lopez R. **Mol. Microbiol.** **2014**, Jan; 91(2):348-62.
13. **Chastanet A** and Carballido-Lopez R. **Front Biosci (Schol Ed.)** **2012**, Jun 1;4:1582-606.
12. Dominguez-Escobar J, **Chastanet A**, Crevenna AH, Fromion V, Wedlich-Soldner R, Carballido-Lopez R. **Science** **2011**, 333; 225 - 228
11. **Chastanet A** and Losick R. **J. Bacteriol.** **2011**, 193(22):6366-74
10. **Chastanet A**, Vitkup D, Yuan GC, Norman TM, Liu JS, Losick RM. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **2010**; May 4;107(18):8486-91
9. Banse AV, **Chastanet A**, Rahn-Lee L, Hobbs EC, Losick R. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **2008**;105(40):15547-52.
8. **Chastanet A** and Losick. R. **Mol. Microbiol.** **2007** 64:139-52.
7. Arnaud M, **Chastanet A** and Débarbouillé M. **Appl. Environ. Microbiol.** **2004** 70: 6887-91.
6. Frees D, **Chastanet A**, Qazi S, Sorensen K, Hill P, Msadek T and Ingmer H. **Mol. Microbiol.** **2004** 54:1445-62.
5. **Chastanet A**, Derré I, Nair S and Msadek T. **J. Bacteriol.** **2004** 186:1165-1174
4. **Chastanet A**, Fert J and Msadek T. **Mol. Microbiol.** **2003** 47:1061-73.
3. **Chastanet A**, Msadek T. **J. Bacteriol.** **2003** 185:683-87
2. **Chastanet A**, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T. **J. Bacteriol.** **2001** 183:7295-307.
1. Venderbure C, **Chastanet A**, Boudsocq F, Sommer S, Bailone A. **J. Bacteriol.** **1999** 181:1249-55.

(*co-premier)

Communications

Conférencier invité à donner un séminaire

- Institut de Microbiologie de la Méditerranée – CNRS – Marseille, le 10/03/2010
- Séance publique commune Académie des sciences et Académie d’agriculture de France, Académie des Sciences, Paris, le 13/03/2012
- Centre de Recherche PACA – INRA – Avignon, le 08/07/2014

Communications orales et affiches dans des conférences nat^{al} & internat^{al}

Orateur invité

- Bacterial Cell Surfaces - Gordon Research conferences, 2012, Mont Snow, Vt, USA
- 4th ASM conference on Prokaryotic and Cell Biology Development, 2012, Montréal, Canada

Orateur sélectionné

- 7th int^{al} conference on Gram-positive microorganisms, 2013, Montecatini terme, Italie.
- 15th Boston Bacteriology Meeting, 2009, Boston, MA, USA
- BLAST-X meeting, 2009, Cuernavaca, Mexico
- 7th Molecular Microbiology Meeting –Bacterial Pathogenesis- 2002, Institut Pasteur, France
- Resistance and virulence of Gram-positive bacteria, SFM, 2002, Institut Pasteur, France

Affiches

- 4th ASM conference on Prokaryotic and Cell Biology Development, 2012, Montréal, Canada
- Bacterial Network 2010, 2010, San Feliu, Spain
- 14th Boston Bacteriology Meeting, 2008, Boston, MA, USA
- 2nd ASM Conference on Prokaryotic Development, 2005, Vancouver, BC, Canada
- 12th International Conference on *Bacilli*, 2003, Baveno, Italia
- 6th ASM Conference on Streptococcal Genetics, 2002, Asheville, USA
- 11th International Conference on *Bacilli*, 2001, San Diego, USA

Activités de Recherche

I - Du pré- au post-doctorat...

Stage pré-doctoral

Inhibition de la recombinaison homologue chez *E. coli* par le complexe mutagène MucA'B

DEA et Thèse

Etude des gènes de réponse aux stress chez les bactéries pathogènes à Gram positif.

Post-doctorat

Différenciation cellulaire chez *B. subtilis* : régulation génétique et morphogénèse

(du control de l'entrée en sporulation au phénomène d'internalisation)

Ma formation à la recherche a débuté en 1998 par un travail bénévole à l'institut Curie, où j'ai intégré le laboratoire du Professeur R. Devoret (Institut Curie – Orsay, France) comme stagiaire afin de m'initier à la recherche d'une part, et de me former à la microbiologie d'autre part. En 1999, j'ai intégré le DEA de microbiologie de l'institut Pasteur de Paris au cours duquel j'ai effectué mon stage dans le laboratoire du Pr G. Rapoport sous la direction scientifique du Dr T. Msadek (institut Pasteur, Paris). J'ai poursuivi l'année suivante par une thèse de doctorat dans ce même laboratoire sur les mécanismes de réponse aux stress chez les bactéries Gram-positives. La période post-doctorale a commencé par un premier séjour, entre 2004 et 2009, dans le laboratoire du Pr R. Losick (Harvard University, Cambridge, Ma, EUA), pour travailler sur la différenciation cellulaire. Elle s'est poursuivie à partir de 2009 dans le groupe du Dr. Carballido-López (INRA, Jouy-en-Josas, France) jusqu'à mon recrutement dans ce même groupe en 2012. Du fait de la redondance thématique, les travaux postdoctoraux en France seront présentés conjointement avec les travaux post-recrutement dans la partie II « travaux en cours ». Cette première partie présente donc l'ensemble des travaux réalisés jusqu'en 2009.

A- Le stage pré-doctoral (1997-98).

Le laboratoire du Dr Devoret a été un pionnier de l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN, de la recombinaison homologue et de la mutagenèse SOS. Sous la direction scientifique des Drs Suzanne Sommer et Adriana Bailone, j'ai participé à l'étude du complexe MucA'B chez *Escherichia coli*. Ce complexe, encodé par des gènes plasmidiques et connu pour sa forte activité mutagène, est homologues du complexe UmuD'C, encodé chromosomiquement chez *E. coli*. Ces deux complexes étaient suspectés d'interagir avec l'ADN polymérase afin de lui permettre de passer à travers les lésions en cas d'endommagement de l'ADN. Ce mécanisme permet de limiter les pauses et cassures consécutives aux lésions, mais au prix d'une fidélité moindre, et constitue un dispositif de secours de dernier ressort. MucA'B et UmuD'C se sont depuis révélés être en réalité eux-mêmes des ADN polymérases non fidèles (dites polymérases Y). Le but des travaux auxquels j'ai participé était alors d'une part de quantifier l'abondance relative du complexe MucA'B dans les cellules de *E. coli* puis d'autre part, via des approches classiques de génétique (conjugaison, transfert de marqueur d'auxotrophie, mutagenèse par irradiation...), de caractériser le rôle inhibiteur pour la recombinaison homologue et par conséquent l'inhibition du mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison, du complexe mutagène MucA'B (1).

Publication issue de ce travail :

Venderbure C, **Chastanet A**, Boudsocq F, Sommer S, Bailone A. "Inhibition of homologous recombination by the plasmid MucA'B complex". **J Bacteriol.** **1999** 181:1249-55.

B- Le DEA et le doctorat (1998-2003)

J'ai réalisé mon DEA puis ma thèse de doctorat dans le laboratoire du Pr G. Rapoport sous la direction du Dr T. Msadek. Pour résumer, mes travaux ont porté sur les stratégies adoptées par différents genres bactériens pour s'adapter aux stress environnementaux. Je me suis intéressé à la fois aux fonctions cellulaires dans lesquelles sont impliquées les protéines clefs de la résistance au stress (chaperons moléculaires, protéases Clp), ainsi qu'aux mécanismes de contrôle de l'expression des gènes qui les encodent. Mes travaux ont révélé l'étendue des fonctions possibles de ces protéines dans les différentes espèces étudiées, de l'adaptation au stress à la virulence, mais également que, bien que ces organismes aient en commun des régulateurs contrôlant des gènes cibles homologues, les mécanismes de régulations sont spécifiques de chaque espèce étudiée, offrant un programme adapté de réponse au stress.

Au sein de leur environnement, les bactéries rencontrent rarement des conditions de croissances idéales permettant une multiplication exponentielle (autrement dit, le LB à 37° se fait rare!). A l'inverse, elles sont perpétuellement soumises à des variations des conditions comme les sources de nutriments, la salinité ou l'oxygénation, dont certaines seraient directement délétères en absence de réponses appropriées (augmentation de température, radicaux libres...). La réponse au stress permet une adaptation, via la modification de l'expression génique, en faisant intervenir senseurs (systèmes à deux composants...), régulateurs de transcriptions (facteurs sigma alternatifs, répresseurs...) et effecteurs (enzymes détoxifiantes, protéases...)(Fig.1A). Dans le cas du stress thermique, celui-ci agit de façon non spécifique sur les protéines, entraînant un mauvais repliement, voire l'accumulation d'agrégats, et donc une perte d'activité. La réponse cellulaire consiste à augmenter l'expression d'une part de chaperons moléculaires (GroESL, DnaK, ATPase Clp...), lesquels vont agir préventivement et de façon curative sur le repliement, et d'autre part de protéases qui vont éliminer les protéines dénaturées et permettront leur recyclage (DegP, Lon, Protéase Clp...)(Fig.1B.).

Mes travaux de thèse visaient à mettre en évidence les stratégies adoptées par différents genres bactériens en réponse aux stress environnementaux. Ils ont suivi pour cela deux axes principaux : l'étude des mécanismes de régulation de l'expression des gènes de réponse aux stress, et la caractérisation de la fonction des protéines qu'ils encodent, en particulier les Clp (2, 3). Les protéines Clp étaient connues pour être des acteurs clés de la réponse aux stress du fait de leur fonction duale (elles sont à la fois chaperon moléculaire et protéase ; Fig.1C) mais elles semblaient également impliquées dans de multiples fonctions cellulaires (sporulation, division...). Ces travaux se faisaient dans un contexte d'explosion des programmes de séquençage complets des génomes, révélant similitudes et disparités entre ces derniers, alors que les modèles comme *E. coli* et *Bacillus subtilis* étaient les seuls largement maîtrisés à l'époque. Ils visaient donc à évaluer dans quelle mesure les connaissances des « modèles » étaient extrapolables (comme les voies de régulations) et à mettre en évidence les spécificités liées à la physiologie de différentes espèces comme l'impacte sur le pouvoir pathogène de *Listeria* ou sur la compétence naturelle des streptocoques.

La caractérisation fonctionnelle des protéines de réponse aux stress a ainsi conduit à

plusieurs découvertes. J'ai pu montrer le rôle des ATPases Clp dans différentes fonctions dont l'adaptation au stress chez *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* mais aussi leur impact sur la virulence chez *L. monocytogenes* and *Streptococcus pneumoniae* grâce à deux collaborations avec le Pr P. Berche (Inserm, Centre Hospitalo-universitaire Necker, Paris) et le Dr E. Azoulay-Dupuis (Hôpital Bichat, Paris) respectivement (4, 5). D'autre part, ces travaux ont révélé chez *S. pneumoniae* un lien inattendu entre ClpP et le contrôle de son état de compétence naturelle (un mécanisme permettant l'internalisation et l'incorporation d'ADN exogène, source de variabilité génétique). Dans le cadre d'une étude collaborative avec le groupe du Dr. Jean-Pierre Claverys (Université Paul Sabatier, Toulouse, France), nous avons montré comment la protéase ClpP, lorsque les conditions ne supportent pas le développement de l'état de compétence, agit comme un inhibiteur de ce programme développemental (6).

Le second axe de recherche sur les mécanismes de régulation des gènes de réponse aux stress a été également riche d'enseignement. Premièrement, nous avons montré que les gènes *clp* de *S. pneumoniae*, *S. aureus* ainsi que *clpB* chez *L. monocytogenes* étaient tous sous contrôle direct du répresseur transcriptionnel CtsR, découvert peu avant au laboratoire chez *B. subtilis* (4-6). D'autre part, nous avons mis en évidence chez *S. aureus* un nouveau mode de réponse au stress des chaperons moléculaires DnaK et GroESL (7). Les opérons spécifiant ces complexes sont tous deux sous contrôle de deux régulateurs de réponse au stress agissant en tandem au niveau de leur promoteur respectif: CtsR et HrcA. Cette double régulation directe n'est pas redondante mais permet une répression synergique suggérant une possible adaptation graduelle en fonction des stress rencontrés. De plus, cette double régulation s'est révélée partiellement conservée, au niveau de l'opéron *groESL* uniquement, dans le groupe des Streptocoques et Lactocoques. Enfin, nous avons mis en évidence un cas unique de gène *clp* présentant ce double contrôle chez *Streptococcus salivarius* (8).

Enfin, j'ai également participé au cours de ma thèse au développement d'un outil pour l'inactivation propre de gènes chez les bactéries non naturellement transformables, le pMAD (9). Celui-ci permet de générer facilement des mutants d'interruption en phase et est maintenant largement utilisé par la communauté scientifique et particulièrement chez les spécialistes de *Staphylococcus* et *Listeria*.

En résumé, mes travaux de thèse ont apporté deux contributions majeures. D'une part l'analyse fonctionnelle des protéines Clp a révélé l'étendue des fonctions possibles de ces protéines dans les différentes espèces étudiées. D'autre part, nous avons pu montrer que, bien que ces organismes aient en commun des régulateurs contrôlant des gènes cibles homologues, les mécanismes de régulations sont spécifiques de chaque espèce étudiée, offrant un programme de réponse au stress adapté (Fig. 2). Ensemble, ces résultats ont révélé les limites de l'utilisation de bactéries modèles et ont montré que l'existence de gènes ou de régulateurs conservés entre espèces est peu prédictive de la fonction potentielle ou du mode de régulation des gènes considérés.

Durant ma thèse, j'ai pu acquérir une maîtrise des techniques de génétique moléculaire et de biochimie, ainsi que la maîtrise d'un sujet de recherche, incluant le développement de plusieurs fructueuses collaborations au niveau national et international. J'ai obtenu ma thèse en Juillet 2003 avec les félicitations du jury et j'ai pu poursuivre mes travaux pendant quelques mois grâce à l'obtention d'une bourse (CANAM).

Publications issues de ces travaux :

Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T. "Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival". **J. Bacteriol.** **2001** 183:7295-307.

Chastanet A, Msadek T. "*clpP* of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in Gram-positive bacteria". **J Bacteriol.** **2003** 185:683-87

Chastanet A, Fert J and Msadek T. "Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram positive bacteria". **Mol. Microbiol.** **2003** 47:1061-73.

Chastanet A, Derré I, Nair S and Msadek T. "*clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance". **J. Bacteriol.** **2004** 186:1165-1174

Frees D, **Chastanet A**, Qazi S, Sorensen K, Hill P, Msadek T and Ingmer H. "Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*". **Mol. Microbiol.** **2004** 54:1445-62.

Arnaud M, **Chastanet A** and Débarbouillé M. "New vector for efficient allelic replacement in naturally non-transformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria". **Appl Environ Microbiol.** **2004** 70: 6887-91.

(surlignée = fournie en annexe)

C- Le post-doctorat (2004-2009)

Intéressé par les questions de devenir cellulaire, de différenciation et de développement au sens large, j'ai rejoint le groupe du Pr R. Losick à Harvard en 2004 où j'ai développé des projets sur la morphogenèse et la régulation des voies de différenciation, en utilisant le processus de sporulation de *B. subtilis* comme modèle.

Aujourd'hui délaissé par nombre de laboratoires pour des organismes d'intérêt biomédical ou industriel, *B. subtilis* reste un formidable sujet d'étude, tant pour sa praticité que pour la richesse des mécanismes mis en évidence au cours des 7 décennies d'étude dont il a fait l'objet. Ainsi, la compétence naturelle pour la transformation, initialement décrite chez les streptocoques, a fait l'objet chez *Bacillus* de longues recherches illustrant plusieurs mécanismes de régulation génétique fondamentaux comme, entre autres, le quorum-sensing ou l'importance des processus stochastiques dans la différenciation (10-13). De même, la mise en évidence des facteurs sigma alternatifs, lesquels permettent une reprogrammation génétique globale et instantanée de la cellule, a conduit à l'étude poussée du phénomène de sporulation qui en dépend (14-16). Ce dernier est un processus passionnant à plus d'un titre. C'est tout d'abord une illustration de différenciation cellulaire chez les bactéries générant deux cellules de formes et de devenir différents (un caractère davantage répandu chez les eucaryotes). Cette différenciation n'est pas appliquée à l'ensemble de la population car elle fait intervenir un système de régulation permettant stochastiquement une « prise de décision » de chaque cellule (sporuler ou pas ?), ainsi qu'un système retardateur de cette décision par une « cannibalisation » des cellules voisines (17). Le processus de développement utilise ensuite un mécanisme morphogénétique ressemblant à une phagocytose, puis une « mise sous perfusion » de la future spore par sa cellule mère et de nombreux autres mécanismes moléculaires (activation de régulateurs, mouvement de membranes, ancrage et pompage de chromosomes...) tout aussi captivants qu'il serait trop long d'énumérer ici (18).

La sporulation peut être vue comme un système de sauvegarde ultime des *Bacilli* qui conduit à la fabrication de la forme de vie la plus résistante connue (froid, chaleur, acidité, dessiccation, irradiation...). Celui-ci a cependant un coût car la mise en place d'une telle cellule requiert un processus de plusieurs heures durant lequel la croissance est bloquée et, qui plus est, devient rapidement irréversible (Fig.3). Il constitue donc une certaine prise de risque face à des compétiteurs qui pourraient bénéficier d'un retour de conditions favorables. Le déclenchement de ce processus est donc soigneusement pesé, intégrant de nombreux signaux, et présentant des systèmes d'échappement (pourcentage de la population ne sporulant pas, cannibalisme...). Un de mes projets (I-2) a consisté en une étude pluridisciplinaire visant à comprendre le déterminisme dans cette différenciation cellulaire conduisant à l'établissement irréversible du processus de sporulation. Au cours de cette étude collaborative, nous avons élaboré un modèle décrivant le contrôle de l'entrée des cellules dans la voie de sporulation par l'accumulation hautement hétérogène du régulateur chef d'orchestre des processus de phase stationnaires (sporulation, compétence, biofilm), Spo0A. J'ai également revisité la mécanistique du contrôle de l'expression de son gène, *spo0A*, révélant de multiples niveaux de régulation.

Une fois la « décision » de sporuler prise, la cellule entame un long processus de

développement conduisant, après division asymétrique, à la différenciation des cellules filles via des programmes génétiques spécifiques. Cette division est suivie par un mécanisme morphogénétique conduisant à l'internalisation (littéralement « englobement ») de la petite cellule issue de la division asymétrique lors d'un processus ressemblant à une phagocytose. Dans un autre projet (I- 1), je me suis intéressé à ce processus d'internalisation et en particulier à des protéines membranaires, essentielles à ce mécanisme, mais dont les fonctions étaient alors inconnues.

1- Des autolysines en tandem contrôlent le processus d'internalisation durant la sporulation chez *B. subtilis*.

Le but était de résoudre une question posée de longue date, non résolue et fondamentale, concernant le changement morphologique majeur que constitue l'internalisation (engulfment) durant la sporulation. Il était connu depuis de nombreuses années qu'une triade de protéines SpoIIIP (P) SpoIID (D) et SpoIIM (M) était absolument essentielle à ce phénomène (19-21). Pourtant seule la fonction de D –une autolysine- avait pu être mise en évidence (22).

A l'aide de techniques de cytologie, j'ai pu tout d'abord montrer que la co-localisation de ces 3 facteurs –nécessaire pour leur fonction- requérait une hiérarchie de recrutement, avec M comme élément fondateur du complexe, suivi de P puis finalement D (Fig. 4). Afin de démontrer une possible interaction directe entre P et M, j'ai développé un crible phénotypique me permettant de sélectionner des mutants de P et M. J'ai ainsi montré que des mutations ponctuelles entraînant une délocalisation de P pouvaient être compensées par des mutations ponctuelles dans M, suggérant une interaction directe. Ensuite, à l'aide d'expériences *in vitro*, j'ai pu montrer la co-purification de D et P, suggérant là aussi une interaction.

D'autre part, j'ai mis en évidence par une analyse informatique une similitude significative entre la structure secondaire prédite de P et la structure établie d'une autolysine. Grâce à ce lien, j'ai alors purifié la protéine recombinée P, et réalisé des zymogrammes, des tests biochimiques *in vitro*, qui ont révélé l'activité autolytique de P. Logiquement, les mutants de P obtenus précédemment qui s'étaient révélés déficients pour l'englobement mais dont la localisation était pourtant normale, s'avèrent après purification non fonctionnels pour leur activité catalytique *in vitro*.

Finalement, j'ai montré que la localisation de M (pilier du complexe et première protéine de la cascade) nécessitait un quatrième acteur, SpoIIB (B), liant les processus de division et d'englobement (Fig.4). L'implication de cette protéine dans ce processus était suspectée depuis longtemps, mais son mode d'action incompris. Ces résultats ont ainsi suggéré que B, positionnée au centre du septum dès l'étape de la division, attend l'expression –plus tardive- des protéines P, D et M afin de recruter et positionner correctement M et par extension le complexe autolytique.

En résumé, cette étude a révélé que le complexe PDM est constitué de deux autolysines agissant en tandem, liées par une protéine d'ancrage membranaire, le tout positionné au centre du septum par l'intermédiaire de B (Chastanet and Losick, 2007). Durant ce projet, je me suis spécialisé en microbiologie cellulaire grâce à l'utilisation de différentes techniques de microscopie à fluorescence et acquis une expertise dans les

domaines des protéines membranaires, des autolysines et de la synthèse du peptidoglycane (PG), tous sujets de première importance pour mes projet de recherche suivants en France. Ce fut également une période riche dans l'apprentissage de la transmission des savoirs, avec l'encadrement d'une première étudiante (équivalent à un Master II), et l'enseignement d'un cours pratique de microbiologie (Molecular and Cellular Biology-100, Harvard University), depuis sa conception (projet et design expérimental) jusqu'à sa préparation pratique et son encadrement.

2- Activation non-bimodale et largement hétérogène du régulateur clef de l'entrée en sporulation chez *B. subtilis*

Dans mon second projet de recherche à Harvard, j'ai cherché à comprendre par une approche de biologie systémique comment fonctionnait un circuit complexe de régulation de gènes impliqués dans le développement cellulaire. Pour cela, j'ai réalisé une étude multidisciplinaire combinant des méthodes de génétique, cytologie et mathématiques, en coordonnant le travail de deux statisticiens (Pr J. Liu - Harvard Department of Statistic- et Pr Assistant G. Yuan -Dana Farber Medical Institute) et un informaticien biologiste des systèmes (Pr Assis. D. Vitkup -Columbia University). Là encore mon modèle de développement a été la sporulation de *B. subtilis*, dont j'ai étudié le réseau extrêmement complexe de régulation contrôlant son initiation.

Les phénomènes dits de transition de phase (lors de la sortie de phase exponentielle de croissance) et de phase stationnaire, comme la compétence naturelle pour la transformation, la formation de biofilms, le cannibalisme et la sporulation sont tous dépendant du facteur de transcription Spo0A (Fig. 3). Ce régulateur est un membre de la famille des systèmes à deux composants, lesquels deviennent actifs sous forme dimérique suite à leur phosphorylation (Fig.5.A). Celle-ci est normalement due à l'action du second composant du binôme, une kinase sensible à un stimulus. Le système Spo0A est particulièrement complexe puisque pas moins de cinq kinases (Kin) associées ont été identifiées et que leurs groupements phosphates ne sont pas transmis directement mais via 2 intermédiaires constituant ce qu'on appelle la cascade de phosphorylation (18). Différents modulateurs viennent également interagir avec cette cascade permettant l'intégration de signaux variés comme la densité cellulaire (via le phénomène de Quorum-sensing), l'intégrité de l'ADN etc. Les différentes options (ne rien faire, sporuler, développer un biofilm ; Fig.3) dépendent, entre autre, de la concentration de Spo0A actif (OA~P) (Fig.5B). De tous les phénomènes dépendant de Spo0A, la sporulation requiert les taux les plus élevés de OA~P qui permettront d'exprimer les gènes les moins sensibles au régulateur (23, 24). De plus, le niveau basal de Spo0A étant faible et donc limitant, l'expression du gène *spo0A* doit elle aussi augmenter durant ce processus, ce qui est permis grâce à l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive : OA~P induisant *spo0A* (25) Enfin il avait été proposé qu'un contrôleur bistable (bistable switch) permette de générer les sous-populations sporulantes et non sporulantes au cours de ce processus, sans que les bases moléculaires de ce mécanisme aient été élucidées (26).

Le but de ce projet était d'intégrer la complexité de cette voie de régulation au sein d'un modèle mathématique afin de comprendre comment une accumulation lente et graduelle du régulateur pouvait être contrôlée, comment les boucles de régulations

positives pouvaient prendre le pas sur les boucles négatives et pourquoi une fraction de la population totale échappait finalement au processus. Autrement dit, quelle pouvait être la base moléculaire du contrôleur bistable supposé contrôler l'hétérogénéité de la sporulation au sein d'une population génétiquement homogène.

Dans ce but, j'ai tout d'abord collecté de nombreuses données sur la cinétique d'apparition des différents acteurs de la cascade d'activation de Spo0A par l'utilisation de systèmes rapporteurs et de quantifications protéiques par western blot. Ceci m'a permis, entre autre, d'évaluer le rôle d'un anti-répresseur, *AbbA*, nouvellement identifié dans le laboratoire (27), mais surtout de revoir drastiquement la chronologie des événements dans cette cascade d'activation. Grâce à ce travail préliminaire, indispensable à l'étape de modélisation, j'ai pu réduire le réseau de régulation à sa fraction essentielle.

Sur cette base, nous avons, avec nos collaborateurs, réalisé un modèle mathématique décrivant la voie d'induction de Spo0A qui nous a permis de simuler la cinétique d'activation de ce régulateur lors de la sporulation. Ce modèle a ainsi prédit l'accumulation inattendue de certaines protéines de la cascade d'activation, accumulation qui a depuis été confirmée par un groupe indépendant. D'autre part, en revisitant les hypothèses formulées sur le régulateur bistable, nous avons montré que la sporulation de *B. subtilis* n'est pas contrôlée par un tel mécanisme. En effet le système ne génère pas deux populations distinctes (présentant dans l'une un niveau élevé et dans l'autre un niveau faible de Spo0A active) mais au contraire une population largement hétérogène présentant une très grande diversité de concentrations de Spo0A activée (Fig. 5C). A partir de nos observations, nous avons ainsi proposé un modèle (Fig. 5D) expliquant comment ce mécanisme permettrait à la fois d'intégrer efficacement les signaux de l'environnement (les stimuli qui président à la sporulation) et de maximiser les chances de chaque cellule d'échapper à son destin en retardant le point de non-retour conduisant à la sporulation effective (28).

L'important travail préliminaire entrepris pour cette étude m'a également conduit à revisiter le mécanisme de contrôle de l'expression du gène *spo0A*. Celui-ci a fait l'objet d'études dans les années 90 qui ont conduit à l'observation d'une bascule d'activité entre deux promoteurs au cours de la sporulation (Fig.6A). Cependant, le fonctionnement de ces promoteurs et les bases moléculaires de cette bascule étaient restés incompris. A l'aide d'expériences classiques de génétique en utilisant *lacZ* comme système rapporteur dans différents contextes mutants, j'ai pu définir plusieurs opérateurs contrôlant l'induction ou l'extinction des deux promoteurs (Fig.6.b). Les données montrent également que Spo0A pourrait polymériser sur son propre promoteur grâce à la présence d'un motif répété, suggérant un modèle de fixation coopératif. Enfin, en comparant l'expression du gène rapporteur, le niveau des transcrits et celui de la protéine, j'ai montré l'existence d'un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel limitant la production de Spo0A en dehors des périodes de sporulation. Au final, ce travail révèle l'existence d'une région promotrice inhabituellement complexe, combinant des mécanismes de régulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles, et jette un éclairage nouveau sur le système de bascule (29).

L'ensemble des travaux sur Spo0A m'a donné l'opportunité de développer de nouvelles connaissances pratiques en biologie cellulaire (technique de FRET, cytométrie en flux) et en microbiologie (transduction, biofilms), mais surtout une large indépendance intellectuelle dans l'initiation, la conduite et la maîtrise de mes sujets de recherche. J'ai

surtout eu l'opportunité, grâce à cette approche pluridisciplinaire, non seulement d'interagir et d'échanger des connaissances avec des scientifiques de spécialités différentes et de grande qualité, mais en plus de gérer et coordonner leur travail. J'ai également encadré deux étudiants (équivalent au Master II) au cours de cette période, dont l'un a poursuivi une thèse dans le laboratoire du Pr Losick.

Publications issues de ce travail :

Chastanet A and Losick R. "Engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins". **Mol. Microbiol.** **2007** 64:139-52.

Banse AV, **Chastanet A**, Rahn-Lee L, Hobbs EC, Losick R. "Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **2008**;105(40):15547-52.

Chastanet A, Vitkup D, Yuan GC, Norman TM, Liu JS, Losick RM. "Broadly heterogenous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **2010**; May 4;107(18):8486-91

Chastanet A and Losick R. "Just-in-time control of Spo0A synthesis in *Bacillus subtilis* by multiple regulatory mechanisms". **J Bacteriol.** **2011**, 193(22):6366-74

(surlignée = fournie en annexe)

Activités de Recherche

II – Travaux en cours

Projets de recherche

En Juillet 2009, j'ai rejoint l'équipe émergente du Dr Rut Carballido-López au sein de l'unité Micalis à l'INRA de Jouy-en-Josas, puis en janvier 2012, j'ai pu intégrer cette équipe de façon permanente en tant que CR1.

Mes travaux, initialement soutenus d'une part par une bourse européenne de réintégration (IRG – Marie Curie) et une ANR JCJC du laboratoire, se sont placés en droite ligne de la thématique du groupe : l'acquisition et le maintien de la forme cellulaire chez *B. subtilis*. La plupart de mes projets de recherche visent donc à comprendre les mécanismes mis en jeu afin de contrôler l'acquisition et le maintien de la forme cellulaire en se focalisant sur le rôle de l'actine bactérienne MreB dans ce processus. Plus particulièrement, j'essaie de mettre en évidence la ou les fonctions biologiques de MreB dans la cellule ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués et de déterminer ses propriétés biochimiques et dynamiques. A ces fins, je mets en œuvre une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo*, génétiques, génomiques et de biologie cellulaire (IFM, épifluorescence, FRAP, TIRF, SIM, PALM...). Dans le cadre de mes travaux, je supervise actuellement une doctorante, Alba de San Eustaquio-Campillo, une assistante ingénieur (partagée à 50%), Charlène Cornilleau, et co-supervise plusieurs post-doctorant(e)s (Xavier Henry, Ruth Keary, Zhizhong Yao) dont les noms seront indiqués dans les parties qui les concernent.

Mes projets seront organisés ci-après en trois parties :

- Recherche de protéines en interaction avec MreB (B),
- Comprendre l'organisation spatio-temporelle de MreB (C),
- Révéler la fonction de MreB au niveau moléculaire (D).

Après une présentation générale de la thématique (A), un « état de l'art » correspondant à nos connaissances au tout début de mes projets en 2009, les deux parties suivantes (B, C) correspondent à deux projets présentés dans leur ordre chronologique depuis le début du post-doctorat dans l'équipe jusqu'au développement des approches de super-résolution actuellement en cours. Ceci devrait permettre de suivre aisément le cheminement scientifique qui a suivi l'évolution du modèle supposé de fonctionnement de MreB. Ces parties contiennent donc principalement des projets terminés ou en cours de finition (les publications correspondantes sont indiquées en fin de chaque partie). La partie « D » regroupe différents projets, liés thématiquement mais ne requérant pas d'être placés chronologiquement, et tous en cours de développement. Les projets collaboratifs sont listés en annexe 1.

A- Présentation de la thématique : l'acquisition et le maintien de la forme cellulaire chez *B. subtilis*

Les déterminants de la forme

La façon dont les cellules contrôlent leur forme est une question fondamentale de biologie (30). Chez les bactéries, le principal déterminant physique de la forme est la paroi qui forme une structure rigide, résistante à la pression interne et offrant une protection à la cellule (31). Cette paroi est, chez les bactéries Gram-positives, majoritairement constituée

de polymères : le peptidoglycane (PG) et les acides téichoïques (AT). Le PG est un assemblage de chaînes de sucres liées par des penta-peptides formant le sacculus, un maillage continu entourant la cellule et sur lequel se greffent les AT. Ce sacculus constitue le déterminant physique de la forme cellulaire. Les voies de biosynthèse et la composition biochimique de la paroi sont relativement bien connues mais son ultra-structure et la manière dont sa forme est générée et maintenue ne le sont pas. En d'autres termes, l'analyse biochimique révèle le type et le nombre de briques constituant le mur mais pas sa taille, sa forme, bref son organisation, ni la façon dont il s'étend lors de la croissance cellulaire. Le PG est donc nécessaire pour le maintien de la forme cellulaire mais non suffisant et de nombreux déterminants génétiques de la synthèse de la paroi ont pu être mis en évidence (32). Cependant, à l'exception des enzymes réalisant les réactions d'assemblage et de désassemblages des briques (les PBPs ou penicillin binding proteins), la fonction de la plupart des autres protéines impliquées (Mre, Rod...) demeurent mystérieuse. On regroupe cependant sous le concept vague de machinerie de synthèse de la paroi (MSP) l'ensemble des protéines semblant de près ou de loin impliquées dans le processus, avec l'idée sous-jacente (mais peu étayée) que celles-ci formeraient un complexe à la manière des machineries de réplication ou de transcription (Fig. 7A.)(33). On distingue généralement deux sous catégories (fonctionnelles, car de nombreux acteurs sont communs aux deux): les machineries d'élongation de la paroi (MEP) permettant l'accroissement de la cellule et les machineries de division (MD).

Les protéines Mre

Un déterminant particulièrement étudié appartenant aux MEP est une protéine présente chez la plupart des bactéries à formes complexes (non-coccoïdes) : MreB (34, 35). Il est à noter que chez les *Bacilli*, le génome encode trois paralogues, MreB, Mbl et MreBH, dont les fonctions semblent partiellement redondantes (36). Les deux premières sont synthétisées en conditions de croissance exponentielle et sont essentielles tandis que MreBH pourrait être une protéine de réponse au stress synthétisée dans des conditions spécifiques encore mal comprises (36-40).

L'intérêt pour cette famille de protéines est double. Tout d'abord elle est essentielle à la croissance bacillaire, son absence entraînant une perte de contrôle de la forme, voire chez certaines bactéries la lyse de la cellule (fig.7.B) (36, 37, 40, 41). D'autre part, elle présente une forte similitude dans sa structure tri-dimensionnelle avec l'actine eucaryote (42), laquelle est une protéine essentielle aux rôles multiples (division, mouvements...).

Le gène codant MreB (B) est co-exprimé avec deux autres gènes eux aussi essentiels, de fonction inconnue et impliqués dans le contrôle de la forme : *mreC* et *mreD* (43, 44). MreC (C) est requise pour le maintien de la forme bacillaire mais son absence est possible sous certaines conditions de croissance, tandis que MreD (D) est absolument essentielle dans toutes les conditions testées à ce jour (44, 45). Contrairement à B qui est une protéine soluble associée à la membrane, C et D sont des protéines intégrales de membrane. D est quasi intégralement insérée dans la bicouche lipidique tandis que C est très largement exposée à l'extérieur de la cellule, ce qui pourrait suggérer que ces deux protéines forment une sorte de pont entre les enzymes de synthèse de la paroi (PBP) présentes à l'extérieur, et MreB présente dans le cytosol. Cependant, à part quelques interactions protéines/protéines (46-48), peu d'information ont été récoltées pour le moment sur C et D, et leur fonctions

exactes restent inconnues. C et D étant présentes également chez les bactéries de formes coccoïde, contrairement à B, il est supposé que ces protéines pourraient porter les fonctions les plus essentielles du contrôle de la synthèse de la paroi, tandis que B permettrait de moduler cette machinerie de synthèse afin d'opérer l'élongation des cellules en forme de tube.

MreB, une hélice chef d'orchestre des processus cinétiques ?

Le rôle des MreBs dans la synthèse de la paroi est supposé depuis leur identification dans les années 90 (d'où leur nom: "Murein region B"), du fait des phénotypes de perte de forme et de lyse cellulaire observés chez les mutants (49-51). Au tournant du siècle, l'émergence des techniques de biologie cellulaire en microbiologie a révélé, via l'observation *in situ* de protéines recombinantes fluorescentes, la localisation tout à fait originale de ces protéines: au contraire de la plupart des localisations répertoriées jusque là, généralement diffuse dans le cytosol, diffuse dans la membrane ou formant une ou quelques structures discrètes, MreB formait un réseau original de structures tri-dimensionnelles plus ou moins ponctuées, et dynamiques (Fig.7.C)(37, 40, 52, 53). Décrite alors comme une localisation en hélice, cette observation marquera durablement le domaine et donnera lieu à une littérature abondante décrivant des protéines soi-disant localisées elles-aussi en hélice. L'association de la protéine avec la membrane (sa séquence suggérait une localisation cytoplasmique) entraîna l'hypothèse que MreB pourrait être associée à des MEP trans-membranaires, dont elle pourrait réguler l'activité. Mais rapidement, d'autres fonctions biologiques associées aux MreBs vont être postulées (54).

En effet, quasi simultanément aux observations décrites ci-dessus, la purification d'une MreB d'une espèce thermophile Gram-négative (*Thermotoga maritima*) a permis sa cristallisation, révélant des similitudes évidentes de structure entre celle-ci et l'actine eucaryote, mais aussi dans sa capacité à polymériser et hydrolyser les nucléotides *in vitro* (42). L'hypothèse qu'actine et MreB seraient des homologues, tant structurels que fonctionnels, a alors commencé à faire son chemin ; d'une part à cause des similitudes structurelles et biochimiques *in vitro*, et d'autre part du fait de l'observation simultanée de la localisation "en hélice" sous forme de longues structures dynamiques rappelant le cytosquelette eucaryote. Une troisième raison est peut-être liée à l'analogie fonctionnelle entre ces protéines, toutes deux requises dans le contrôle de la forme cellulaire (bien que sur ce point leur mode d'action respectif soit totalement différent). On imaginait donc un échafaudage de MreB qui, comme l'actine, serait rendu dynamique via les phénomènes de polymérisation/dépolymérisation (treadmilling) et dont les longs filaments permettraient non seulement la synchronisation des MEP, mais aussi contribueraient physiquement à la rigidité cellulaire, au support du trafic intracellulaire et pourquoi pas de la dynamique des chromosomes (35, 54).

B- Recherche systématique de protéines en interactions avec MreB

Dans le modèle de fonctionnement de MreB qui prévalait en 2009, c'est-à-dire fonctionnant de manière analogue à l'actine eucaryote, on imaginait un rôle d'organisateur central coordonnant spatialement différentes fonctions cellulaires (synthèse de paroi, ségrégation d'ADN, adressage de protéines...)(54)), régulant le trafic intracellulaire et dont les filaments permettaient de coordonner, guider, déplacer d'autres molécules. Dans cette hypothèse, il devait être possible d'identifier des protéines positionnées par MreB, des protéines effectrices et motrices se déplaçant le long des filaments, ainsi que (toujours par analogie avec l'actine) de possibles molécules modulatrices, contrôlant l'état de polymérisation des filaments de MreB et organisant le réseau.

Afin de mettre en évidence de telles protéines partenaires, deux approches globales visant à révéler le réseau potentiel d'interaction protéines/MreB furent mises en place : un crible en double hybride chez la levure, et une approche de co-purification par affinité en tandem (SPA) couplée à une analyse par spectrométrie de masse. Celles-ci ont révélé un nombre restreint de candidats interagissant spécifiquement avec MreB, dont l'un a fait l'objet d'une étude plus poussée. Identifié par l'approche de double hybride, le gène *ykuR* a en effet retenu notre attention par son rôle supposé (bien que mal annoté!) dans la synthèse de précurseurs cytosoliques de la paroi.

Notre étude nous a permis de montrer que cette protéine (renommée Dapl) fait partie de la voie de biosynthèse d'un précurseur du PG, le *meso*-diaminopimelate (m-DAP). Dapl est par conséquent indispensable à la croissance, son mutant de déplétion perdant rapidement forme et intégrité et conduisant à la lyse rapide par arrêt de la synthèse du PG (Fig.8.A). La raison de l'interaction entre MreB et Dapl (confirmée *in vitro*) est *a priori* moins évidente. La localisation par épifluorescence de la protéine recombinante GFP-Dapl, cytosolique et diffuse, est aussi différente que possible de celle de MreB (ponctuée et membranaire). Cependant, nous avons observé grâce à une technique de microscopie avancée, le HILO (ou "TIRF sale"), que Dapl formait, et seulement en présence de MreB, des foci diffusant rapidement dans le cytosol (Fig.8.B). Ceci nous a conduit à proposer un modèle dans lequel la fraction soluble de MreB (connue mais sous-étudiée) interagirait avec Dapl lors de la synthèse des précurseurs. On pourrait ainsi imaginer un mécanisme d'optimisation de la production dans lequel MreB lors de son passage de la fraction soluble à la fraction membranaire, donc associée aux MEP, rapprocherait la chaîne de synthèse des précurseurs de leur cible dans un processus de "canalisation" de la production (Fig.8.C)(55).

Le nombre restreint de protéines identifiées dans ces cribles a contribué à affaiblir le modèle d'un MreB organisateur de la cellule et impliqué dans de multiples fonctions. Le changement de paradigme intervenu en 2011 (voir partie C) a favorisé le développement d'autres approches (voir D).

Publication issue de ce travail :

Rueff AS*, **Chastanet A***, Dominguez-Escobar J, Yao Z, Yates J, Prejean M-V, Delumeau O, Noiro P, Wedlich-Soldner R, Filipe SR, and Carballido-Lopez R. "An early cytoplasmic step of peptidoglycan synthesis is associated to MreB in *Bacillus subtilis*." **Mol. Microbiol.** **2014**, Jan; 91(2):348-62.

(*les auteurs ont contribué de façon égale aux travaux)

C- Comprendre l'organisation spatio-temporelle de MreB: vers le changement de paradigme

Depuis la mise en évidence de la localisation tout à fait particulière des protéines de type MreB au début des années 2000, plusieurs études avaient essayé d'affiner nos connaissances sur leurs propriétés cinétiques *in vivo*, avec des succès limités (46, 53). Si elles avaient permis d'évaluer grossièrement la vitesse de déplacement des "hélices", leur structure fine restait incomprise et leurs déplacements semblaient bien plus complexes que le modèle de simples "hélices en rotation" pouvait le laisser penser.

1- La microscopie TIRF: un saut technologique remet en cause le dogme des "hélices" de MreB

Une limitation importante de la collection d'information en microscopie photonique tenait aux approches utilisées. En épifluorescence "classique" les couches supérieures et inférieures aux plans observés émettent une lumière parasite diffuse qui brouille l'image. Afin d'obtenir de meilleures acquisitions, nous nous sommes tournés vers la microscopie TIRF (microscopie de fluorescence à réflexion interne totale). Dans cette technique les fluorophores ne sont pas directement illuminés par la lumière incidente. Celle-ci arrive sur l'échantillon avec un angle rasant tel qu'elle est entièrement réfléchi (d'où son nom). Au point de réflexion se créent des ondes évanescentes se propageant dans l'échantillon sur une courte distance (la puissance décroissant proportionnellement au carré de la distance) et excitant les molécules fluorescentes proches de l'interface support/échantillon. Ainsi seules les protéines très proches du support (donc en pratique presque exclusivement les protéines membranaires) peuvent être excitées, éliminant le bruit de fond dû à l'excitation des molécules en dehors du plan. Un autre avantage de la technique est qu'en se focalisant sur la couche supérieure de la cellule et pas sur le plan équatorial, on a pu littéralement "voir passer les complexes" sous la surface de la membrane permettant des calculs précis sur leurs paramètres dynamiques, chose difficile lorsque les acquisitions se font dans le plan équatorial puisque les complexes les mieux focalisés se déplacent alors dans le plan Z. Troisième avantage, l'illumination plus faible autorisée (du fait du meilleur rapport signal/bruit) permet de limiter le photo-blanchiment et d'augmenter ainsi la résolution temporelle en plus de la résolution spatiale. Au cours de cette étude collaborative avec le groupe du Dr R. Wedlich-Soeldner (Max Planck Institute – Allemagne), nous avons pu caractériser avec une finesse inégalée les paramètres cinétiques de déplacement des 3 paralogues MreBs de *B. subtilis* permettant plusieurs avancées majeures dans le domaine. Nous avons ainsi montré que 1- le déplacement des protéines MreB, contrairement au modèle en vigueur, se faisait perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule, sous forme d'amas discrets et non en filaments hélicoïdaux (Fig.9), 2- le mécanisme de treadmilling (mouvement apparent d'un filament dû à une polymérisation directionnelle) n'était pas le moteur du déplacement, 3- la synthèse de la paroi bactérienne était requise pour ce déplacement, 4- plusieurs autres protéines associées aux MEP co-localisaient avec MreB (MreC, MreD, RodA, PBPH, Pbp2A...)(56).

Ces résultats surprenants, heureusement confirmés simultanément par deux autres équipes (57, 58), ont obligé à un changement drastique de modèle. Non seulement la

structure "corporelle" et non filamenteuse de MreB s'accordait mal avec le concept même de squelette cellulaire, mais le fait que le moteur du mouvement ne soit pas la polymérisation de MreB mais plutôt la synthèse de la paroi elle-même relançait la question fondamentale de sa fonction "actine-like". Nous avons ainsi proposé que MreB, formant peut-être de petits polymères (plus petit que la limite de résolution du microscope), puisse agir comme plateforme de recrutement des composants des MEP agissant potentiellement comme régulateur de leur activité. Le problème de la synchronisation des machines (comment physiquement MreB connaîtrait-il la taille de la cellule pour adapter la synthèse de la paroi), qui pouvait s'expliquer auparavant avec des structures hélicoïdales parcourant l'ensemble de la cellule, en était cependant totalement relancé.

2- Le débat : patch ou filaments?

Après une décennie de publications sur diverses protéines organisées en hélices ces résultats ont été une vraie surprise pour la communauté. Mais comment réconcilier ceux-ci avec les travaux précédents? Comment expliquer les longs polymères de MreB observés lorsque celle-ci est exprimée dans un hôte hétérologue? Comment expliquer qu'une protéine formant de petits corpuscules pourrait donner l'impression en épifluorescence de l'existence de longues structures connectées? Comment expliquer les images parfois impressionnantes de MreB chez *E. coli* formant des "8" presque parfaits (Fig.10)? La publication récente de travaux en super-résolution montrant de longues structures filamenteuses de MreB chez *B. subtilis* et un "point de vue" remettant en cause l'approche TIRF dans l'étude de MreB et arguant littéralement qu'il est plus facile d'imaginer un modèle avec des longues structures de MreB que des patches, ont relancé l'hypothèse que MreB formerait bien un cytosquelette de type actine (59-61).

Afin de clarifier la situation nous avons repris l'étude de MreB en comparant les différentes approches utilisées par le passé (épifluorescence, immunofluorescence) et récentes (TIRF, SIM) ainsi que les différentes souches de *B. subtilis* utilisées dans différents laboratoires. Nous avons ainsi montré (Fig.11) que:

- 1- l'approche TIRF permet bien de mettre en évidence de longues structures lorsque celles-ci existent ;
- 2- en condition de croissance exponentielle, toutes les souches de *B. subtilis* testées en sont dépourvues; ces conditions sont celles utilisées dans les études publiées en 2011;
- 3- des structures légèrement allongées commencent à apparaître lorsque les cellules quittent la phase exponentielle de croissance et que les niveaux de MreB s'accroissent. Ces structures s'accumulent alors durant la phase stationnaire mais uniquement dans les souches où *mreB* est inductible. Ces conditions sont celles qui étaient utilisées dans les publications originales du fait de la moindre sensibilité des matériels nécessitant des niveaux plus élevés de protéines de fusion pour être observées.
- 4- Les structures sont d'autant plus longues dans les souches dans lesquelles le niveau de MreB est élevé, et leur vitesse n'est pas corrélée à leur taille mais à la vitesse de croissance de la cellule ;
- 5- le niveau naturel de MreB baisse lorsque les cellules quittent la phase exponentielle de croissance et une souche exprimant une fusion GFP-MreB sous promoteur natif ne présente aucune longue structure quelles que soient les conditions de croissance.

En résumé, la formation de structures filamenteuses longues (visibles en microscopie photonique non super-résolutive) est artéfactuelle, due à des niveaux de protéines bien supérieurs aux taux naturels et dans des conditions dans lesquelles les cellules ne sont plus en phase active de croissance. Au niveau naturel de MreB, lorsque les cellules croissent activement, ces protéines forment au mieux des structures non résolues, ou "patch". L'observation des artefacts est cependant informative puisqu'elle suggère une tendance à la formation de filaments *in vivo*. Cela permet de supposer que l'organisation des patchs, en deçà de la limite de résolution, puissent être filamenteuse, mais leur organisation comme leur taille restent pour le moment des inconnues. (Ces travaux font l'objet d'un manuscrit en cours de préparation).

3- La quantification des données TIRF révèle différents modes de croissance des bactéries bacillaires

Après l'acquisition d'un microscope TIRF et la mise en place au laboratoire des protocoles précédemment réalisés en collaboration, nous développons actuellement une automatisation des analyses de données tant au niveau des caractéristiques des cellules (tailles, formes...) que des données cinétiques sur les protéines fluorescentes (vitesse, densité, comportement dynamique (calcul du Mean Square Displacement...) via le développement de scripts (ImageJ, Matlab)). En revisitant les analyses des cinétiques de mouvement de MreB en microscopie TIRF, nous avons ainsi pu mettre en évidence que les particules effectuant des mouvements lents dirigés perpendiculairement au grand axe de la cellule (que l'on suppose associées aux MEP) ne constituent en fait qu'un tiers de l'ensemble. Les particules restantes sont soit statiques, soit diffusent librement de façon brownienne, la fonction de celles-ci restant pour le moment inconnue. Il est cependant tentant d'imaginer qu'elles puissent servir de réservoir, évitant aux MreB d'être le facteur limitant de la synthèse.

De façon plus intéressante, nous avons pu mettre en évidence deux modes de régulation de la croissance différent chez deux bacilles (*E. coli* et *B. subtilis*). En effet lors d'une transition d'un mode de croissance lent à un mode rapide, les cellules doivent adapter leur outil de production de la paroi afin d'augmenter sa capacité. On peut en théorie imaginer deux grands types de mécanismes: soit garder un nombre constant de machines mais fonctionnant plus vite, soit conserver la même capacité de production par machine mais produire plus de machines (Fig. 12). Nous avons observé que *B. subtilis* suit le premier modèle en conservant une densité de patch constant quelque soit la richesse nutritionnelle du milieu testé, mais que la vitesse des patchs augmentait proportionnellement à la vitesse de croissance. A l'inverse, *E. coli* garde une vitesse des patchs constante quelle que soit sa vitesse de croissance, mais fait varier la densité de patch par unité de surface (Yao *et al*, soumis).

4- Au delà du TIRF... La super-résolution

Si le TIRF a permis une révolution dans notre vision de l'organisation de MreB, il a aussi ouvert de nouvelles questions auxquelles il ne peut apporter de réponse, appelant à

l'utilisation de techniques plus pointues encore.

La question la plus évidente est : quelle est finalement la taille et la structure native des patchs de MreB lors de la phase de croissance active des cellules (fig.13)? Ce problème de la taille est important car il permettra de postuler le nombre d'enzymes de synthèse de la paroi potentiellement associées, la largeur putative d'une nouvelle "bande de PG" synthétisée (on peut imaginer qu'une seule chaîne de PG soit insérée par patch de MreB ou à l'inverse l'insertion en parallèle simultanée de multiples chaînes), et par conséquent l'étendue de la synchronisation des machines le long de la paroi. La structure fine du patch est elle aussi importante car elle détermine d'autres hypothèses sur la coordination des machines. Une structure globulaire, aléatoire par simple accrétion de MreB, suggèrerait une organisation limitée des MEP, et probablement peu de corrélation entre taille des amas et nombre de chaînes insérées. A l'inverse, une organisation en filament est d'avantage compatible avec la parallélisation de plusieurs enzymes de synthèses... à conditions que ledit filament ne soit pas parallèle à l'axe d'insertion des chaînes (les enzymes de synthèse se trouvant alors en file indienne), ce qui pourtant correspondrait aux données dont nous disposons pour le moment. Et dans ce cas, on devrait se poser la question de l'utilité de l'élongation de telles structures.

Ces questions nécessitent de passer la barrière de la limite de diffraction de la lumière, laquelle empêche en microscopie photonique "classique" de différencier des objets plus petits que la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Nous disposons depuis peu de deux technologies permettant de s'affranchir de cette limite: le SIM (Structured Illumination Microscopy) et le PALM (Photo-Activation Localization Microscopy). Le premier a l'avantage de permettre l'utilisation de toutes les fusions fluorescentes déjà en notre possession puisque le gain en résolution ne dépend pas du fluorophore utilisé mais de la façon dont les images sont acquises. L'inconvénient est que le gain en résolution est limité à un facteur 2 au mieux, ce qui pour le moment ne semble pas être suffisant. Le PALM à l'avantage d'améliorer, en théorie, d'un ordre de grandeur la résolution mais avec un coût : il requiert de nouveaux fluorophores photoactivables (PA) ou photoconvertibles (PC). Dans ce but nous avons réalisé une étude préliminaire dans laquelle nous avons construit de nombreuses fusions traductionnelles entre MreB et différents fluorophores PC dans le but d'optimiser le niveau d'expression des fusions et d'obtenir *in fine* une protéine recombinante la plus fonctionnelle possible. Cette phase d'optimisation nous a conduit à produire différents outils et à améliorer nos connaissances sur l'effet des signaux de traduction, d'optimisation des codons et des linkers sur le niveau d'expression des fusions transcriptionnelles et fera l'objet d'un article "technique" actuellement en préparation. Cette phase préparatoire étant terminé, nous réalisons la mise au point des protocoles de super-résolution (préparation des cellules, optimisation du milieu de montage et de la verrerie pour une qualité optimale).

Une autre question que nous souhaitons aborder concerne le rôle et les propriétés de la grande majorité de la population qui n'est pas associée aux MEP (Fig.8.C). En effet, nous venons de montrer que seul un tiers des patchs présentait une mobilité directionnelle tandis que le reste était statique ou diffusait librement (II. C. 3). Mais nous avons également illustré récemment que ces patchs ne constituaient eux-mêmes qu'une fraction de la population totale de MreB, puisque une partie des protéines semble exister sous forme soluble (II. B.). Nous tirerons profit de notre fusion PC pour déterminer les propriétés dynamiques de cette fraction par suivi de particule unique (SPT Palm). Nous espérons également ainsi pouvoir

évaluer statistiquement le poids de cette fraction soluble par rapport à la population totale.

Publications issues de ce travail :

Dominguez-Escobar J, **Chastanet A***, Crevenna AH*, Fromion V, Wedlich-Soldner R, Carballido-López R. "Processive movement of MreB-associated cell-wall biosynthetic complexes in bacteria". **Science** **2011**, 333; 225 - 228

Chastanet A and Carballido-López R. "The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn." **Front Biosci (Schol Ed.)** **2012**, Jun 1;4:1582-606.

Yao Z, Cornilleau C, **Chastanet A***, Mirouze N*, Fromion V and Carballido-López R. "Contrasting mechanisms of growth in two model rod-shaped bacteria." soumis à **Nature Communication**.

Yao Z, Cornilleau C, De San Eustaquio-Campillo, Carballido-López R and **Chastanet A**. "The MreB helices revisited: a multifactor artefact". En préparation.

Cornilleau C, Yao Z, Carballido-López R and **Chastanet A**. "A toolset of photoactivable fluorescent fusion expression vectors for super-resolution studies in *Bacillus subtilis*". En préparation.

(surlignée = fournie en annexe)

(*les auteurs ont contribué de façon égale aux travaux)

D- Révéler la fonction de MreB au niveau moléculaire

Après une décennie et demie de recherche sur les MreBs, la question la plus essentielle concernant la(es) fonction(s) de ces protéines reste(nt) cependant totalement ouverte. Celle-ci est le fil conducteur de plusieurs de mes projets actuels permettant de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans les processus biologiques chez *B. subtilis*. Plusieurs approches génétiques et biochimiques sont mises en œuvre afin d'acquérir une meilleure compréhension de leur fonction biologique à travers l'étude de mutants et de leurs activités biochimiques et propriétés dynamiques par des approches *in vitro*.

1- Recherche de mutants supresseurs de mutants de *mreB* et *mbl*.

Dans ce projet, notre approche consiste à mettre à profit le caractère léthal conditionnel de certains mutants du cytosquelette (*mreB* et *mbl*) pour en révéler les fonctions et modes d'action. En utilisant des conditions de croissance appropriées, on peut observer l'apparition de mutants supresseurs spontanés -révertants- ayant recouverts leur viabilité, c'est-à-dire permettant une croissance « normale » de mutants inactivés pour *mreB* ou *mbl* (d'ordinaire létaux à faible concentration de magnésium). Un premier lot de mutants supresseurs a été sélectionné et leur(s) mutation(s) identifiée(s) par séquençage à haut débit. Ceci a permis de mettre en évidence deux pistes particulièrement prometteuses. L'une concerne un mutant ponctuel de MreB qui permet à *B. subtilis* de survivre en l'absence de son paralogue Mbl. Nos résultats suggèrent une suractivité de ce mutant. En effet, lors de la surexpression de cette protéine dans un contexte par ailleurs sauvage, nous avons pu observer des phénotypes de déformation de la paroi typique de la surexpression de MreB et suggérant une suractivité de la protéine (Fig.14). L'analyse des paramètres dynamique *in vivo* par microscopie TIRF de cette version mutante de MreB n'indique pourtant pas de différence notable par rapport à la forme sauvage. La caractérisation des propriétés biochimiques de la protéine sera nécessaire pour comprendre l'effet de cette mutation sur l'activité de MreB (voir paragraphe III-4).

L'étude des mutants supresseurs a révélé d'autre part, deux mutations indépendantes dans le système à deux composants (TCS) WalkR. Les TCS sont des systèmes senseurs qui adaptent la réponse génétique à un stimulus *via* un régulateur transcriptionnel et sont impliqués dans divers processus comme la motilité ou la sporulation. WalkR est impliqué dans le contrôle de la synthèse du PG, et est le seul TCS essentiel chez *B. subtilis*. Nos résultats indiquent que les mutations sélectionnées tendraient à diminuer l'activation du TCS WalkR pendant la phase active de croissance. Nous avons également observé que lorsque *mreB* ou *mbl* sont inactivés cela conduit, à l'inverse, à une sur-activation du système WalkR. La diminution comme l'augmentation des niveaux de WalkR étant notoirement délétère pour la cellule, nous proposons que l'absence des MreBs perturbe fortement ce système et que les mutations supresseurs visent à ramener l'activité du TCS vers des niveaux supportables (Fig.15). Cela suggère également qu'une partie des effets létaux observés dans les mutants MreBs pourrait être liée à la dérégulation de ce TCS essentiel (ces travaux sur le système à deux-composants WalkR, font actuellement l'objet d'un manuscrit en cours de préparation).

Enfin, d'autres pistes de recherches prometteuses ont été ouverte par cette approche

avec notamment l'identification de deux mutants indépendants suppresseurs de *mbI* dans le gène codant la carboxypeptidase DacA (impliquée dans la maturation du PG), qui ont fait l'objet d'analyses préliminaires en collaboration avec le Dr Sergio Filipe (ITQB, Lisboa, Portugal).

2- Mise en évidence de domaines fonctionnels de la protéine MreB par mutagenèse aléatoire et criblages génétique et chimique (encadrement de thèse d'A. De San Eustaquio-Campillo).

Un second crible génétique a été mis en place plus récemment (dans le cadre d'une thèse que je supervise, financée par le ministère de la recherche, et réalisé par Alba de San Eustaquio-Campillo) dans le but de mettre en évidence les domaines fonctionnels de la protéine MreB. En bref, nous générons des mutants aléatoires de *mreB* par PCR non fidèle et intégration directe au locus dans le génome de *B. subtilis*. La souche hôte est pourvue d'une fusion de transcription entre *lacZ* et le promoteur de *mreBH*, lequel est induit en absence de MreB. Celle-ci agit comme rapporteur de la fonctionnalité des mutants de MreB ainsi générés. Dans un second temps, après identification des mutations, celles-ci sont réintroduites en fusions avec la GFP afin de réaliser une caractérisation de leurs paramètres dynamiques (vitesse, densité, effet sur la croissance...). Les récents développements de notre approche biochimique (voir paragraphe IV-4) permettent d'envisager également une caractérisation biochimique de ces mutants. Dix-huit mutants sont actuellement en cours d'analyse.

D'autre part, un crible, chimique cette fois, est également en cours de réalisation. Le but ici est de révéler des molécules inhibitrices de MreB, lesquelles présenteraient à la fois un intérêt fondamental comme outil, permettant par exemple de réaliser des chasses (pulse/chase) pour bloquer temporairement les machines, et un intérêt appliqué avec la perspective de mettre en évidence de nouvelle(s) famille(s) de drogue inactivant un processus bactérien essentiel. Une telle drogue, le A22, est déjà connue mais n'est active que chez les bactéries Gram-négatives (62). Pour ce crible nous disposons déjà du promoteur nécessaire pour réaliser le système rapporteur (*mreBH*) que, pour une praticité d'utilisation, nous venons de fusionner à un opéron codant le système Lux, un ensemble d'enzyme permettant l'émission de lumière. Ceci permet une détection plus rapide, moins coûteuse et en temps réel de l'induction du rapporteur. La banque de produit chimique est disponible à l'EMBL (Heidelberg, Allemagne) et sera criblée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr N. Typas.

3- *ycdFGH*, un opéron dont l'expression dépend du seul paralogue MreB (encadrement de thèse d'A. De San Eustaquio-Campillo)

L'analyse transcriptomique des mutants de *mreB* et de *mbI* a révélé un opéron de trois gènes inconnus, *ycdFGH*, qui est non seulement le plus fortement induit en absence de MreB, mais n'est surtout pas du tout affecté par l'absence de ses paralogues Mbl et MreBH. Cette particularité, ajouté au fait qu'un mutant d'inactivation d'*ycdH* a aussi été identifié dans le criblage de suppresseurs de MreB, nous a incités à comprendre le lien entre MreB et

cet opéron. Dans le cadre de sa thèse, Alba de San Eustaquio-Campillo a entrepris la caractérisation fonctionnelle de cet opéron ainsi que celle de sa régulation MreB-dépendante. Elle a déjà pu montrer (Fig. 16) que i- le dernier gène de l'opéron est un régulateur de transcription putatif impliqué dans sa propre régulation et formant une boucle de rétrocontrôle négative; ii- la répression de l'opéron *ydcFGH* n'est pas strictement dépendante de l'expression du gène *mreB* mais plutôt de l'intégrité de l'opéron *mreBCD* suggérant une régulation ARN-dépendante, iii- la surexpression de *ydcH* entraîne une augmentation du nombre de spores dans la population. L'étude de cet opéron se poursuit actuellement avec la poursuite de l'analyse fonctionnelle de chacun des gènes du régulon, la détermination du régulon YdcH et la recherche de l'élément génétique liant l'expression des opérons *mreB* et *ydcFGH*.

4- Analyse des propriétés biochimiques de MreB

L'observation de *foci* brillants *in vivo* indique que MreB forme des amas mais dont la taille et la structure restent encore inconnues. Du fait de sa parenté avec l'actine eucaryote, il est attendu que les MreB puissent polymériser sous la forme de filaments, peut-être de feuillets de filaments, ce que semble confirmer la surexpression de la protéine *in vivo* entraînant la formation de structures allongées (voir partie II.C.2). Cependant les patchs formés en conditions natives étant non résolus (car plus petits que la limite de diffraction de la lumière) leur structure reste encore inconnue de même que l'importance des propriétés de polymérisation et/ou de dégradation des nucléotides dans la fonction biologique de MreB. Ainsi, un mutant prédit -par analogie structurale avec l'actine- pour être déficient dans l'hydrolyse de l'ATP s'est révélé viable et dépourvu d'effet biologique détectable dans notre souche. La compréhension fine du mode d'action de MreB requiert donc l'identification de ces paramètres biochimiques ainsi que la mise au point de tests d'activité *in vitro* pour la caractérisation des mutants MreB issus de nos cribles.

Pourtant, pendant près de 10 ans, seul un des deux paralogues de MreB d'une espèce thermophiles (*Thermotoga maritima*) est resté le seul MreB purifié et cristallisé, révélant à l'époque des caractéristiques communes avec l'actine eucaryote (42). Malgré de nombreuses tentatives chez les modèles bactériens *E. coli*, *B. subtilis* et *C. crescentus*, les protéines semblaient présenter une instabilité empêchant leur purification sous forme soluble. Récemment, cependant, plusieurs études ont enfin été réalisées sur des MreB mais exclusivement Gram-négatives, présentant des disparités avec les études originelles chez *T. maritima*, ce qui génère des doutes sur les possibilités d'extrapoler les résultats d'une espèce à l'autre (63, 64). D'autant plus que le domaine N-terminal, critique pour la solubilisation de la protéine, est très différent entre bactéries Gram-négatives et Gram-positives. La purification de MreB soluble de *B. subtilis* est donc indispensable.

Nous avons réalisé plusieurs tentatives de purification de MreB sous différentes formes recombinantes (en fusion avec des étiquettes intéines, 6-histidines, gfp) et dans de multiples conditions. Les protéines purifiées se sont révélées systématiquement inactives dans des tests de polymérisation ou de dégradation de nucléotides, probablement à cause d'un repliement incorrect ou d'une instabilité de sa structure. Cependant nous pensons avoir récemment effectuée une percée (travaux post-doctoraux de Xavier Henry) puisque nous avons pour la première fois obtenu une fraction soluble stable capable de former des

filaments sous certaines conditions. Ceci va nous permettre tout d'abord de réaliser la caractérisation des propriétés de polymérisation de MreB en fonction des conditions (sels, nucléotides) et sa capacité de dégradation potentielle des nucléotides. Dans un deuxième temps nous allons pouvoir évaluer les propriétés biochimiques du mutant *mreB* potentiellement "suractif" et suppresseurs de *mbi* (voir II.D.1) ainsi que les différents mutants de MreB isolées dans nos cribles (II.D.2). Nous envisageons également la génération de mutants spécifiques par mutagenèse dirigées générés sur la base de la structure tridimensionnelle prédite.

Publications issues de ce travail :

Chastanet A, Cornilleau C, Brun C, Marchadier E, Nicolas P, Rueff AS, and Carballido-Lopez R. "Lethality of *mreB* mutants is linked to deregulation of the essential cell-wall homeostasis regulator WalKR in *Bacillus subtilis*". En préparation.

E- Bilan et perspectives

Depuis plusieurs années, je m'intéresse à la question de la morphogénèse et du développement cellulaire bactérien en utilisant *B. subtilis* comme modèle d'étude. A mon arrivée en 2009 dans le laboratoire, j'ai entrepris l'étude d'une protéine clé de la morphogénèse chez les bactéries bacillaires : MreB. La stratégie mise en place depuis a consisté à développer un ensemble de projets couvrant le plus large spectre d'approches et de techniques afin de révéler ses réseaux d'interactions avec les voies cellulaires (II.B, II.D.1, II.D.3), sa localisation et ses propriétés dynamiques (II.C, II.D.2) ainsi que ses propriétés biochimiques (II.D.4, II.D.2). Le but ultime étant de comprendre sa (ses) fonction(s) biologique(s).

A ce jour, nos travaux ainsi que ceux de la communauté ont déjà fait fortement progresser notre connaissance de cette protéine, en particulier sur ses propriétés dynamiques. Nous savons ainsi que pendant la croissance active de la cellule, MreB forme différentes populations de petites structures (de tailles <250nm donc non défini), dont certaines co-localisent avec les MEPs et se déplacent de façon directionnelle et processive perpendiculairement au grand axe de la cellule. Ces mouvements sont dépendants de la synthèse de la paroi et on le suppose, reflète le mouvement des machineries d'élongation au cours de la synthèse du PG. Le rôle des autres fractions de MreB reste cependant mystérieux tout comme leur capacité à former des structures ou la façon dont ils influencent la synthèse de la paroi. Les nombreux projets en cours, dont plusieurs sont encore dans leur phase initiale de développement, devraient nous permettre d'apporter des réponses à ces questions à court et moyen termes.

Cependant, de nombreuses questions connexes, dont certaines sont probablement liées à MreB, sont toujours en suspend, et je l'espère pourront être plus directement approfondies dans les années à venir. De manière non exhaustive, on peut compter parmi les plus importantes questions concernant la morphogénèse bactérienne :

A quoi servent les autres morphogènes quasi universels identifiés chez les bactéries (MreC, MreD, RodZ...) ?

Comment la cellule mesure et contrôle son diamètre (et, ce qui est probablement lié, les déformations de sa forme « optimale ») ?

Comment sont contrôlées les MEPs, spatialement (où synthétiser) et temporellement (comment lier l'arrêt de synthèse et l'arrêt de croissance) ?

Quelle est l'organisation tri-dimensionnelle de la paroi ?

Comment est gérée, dans la paroi, l'interface entre zones à croissance rapide (paroi latérales chez *B. subtilis*) et lente (pôles) ?

Quel est le(s) rôle(s) des acides téichoïques dans le maintien de la forme cellulaire ?

Comment les cellules font-elles des tubes ? Comment font-elles (naturellement) des tubes déformés (spirochètes) ? Comment font-elles autres choses que des tubes, par exemple des parallélépipèdes, des étoiles... ?

Toutes ses questions ne pourront évidemment pas être étudiées et encore moins résolues par notre seul groupe, mais j'espère dans le futur pouvoir participer à la compréhension de ces phénomènes passionnants. L'étude du développement cellulaire et de la morphogénèse permet d'aborder certaines des questions les plus fondamentales de la biologie, et à n'en pas douter, nous apportera encore son lot de surprises et d'excitations lesquelles sont finalement notre véritable moteur.-

Références Bibliographiques

1. Venderbure C, Chastanet A, Boudsocq F, Sommer S, & Bailone A (1999) Inhibition of homologous recombination by the plasmid MucA'B complex. *Journal of bacteriology* 181(4):1249-1255.
2. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, & Lindquist S (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 21(8):289-296.
3. Wawrzynow A, Banecki B, & Zylicz M (1996) The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Molecular microbiology* 21(5):895-899.
4. Chastanet A, Derre I, Nair S, & Msadek T (2004) *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *Journal of bacteriology* 186(4):1165-1174.
5. Frees D, *et al.* (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 54(5):1445-1462.
6. Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, & Msadek T (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *Journal of bacteriology* 183(24):7295-7307.
7. Chastanet A, Fert J, & Msadek T (2003) Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology* 47(4):1061-1073.
8. Chastanet A & Msadek T (2003) ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* 185(2):683-687.
9. Arnaud M, Chastanet A, & Debarbouille M (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology* 70(11):6887-6891.
10. Magnuson R, Solomon J, & Grossman AD (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 77(2):207-216.
11. Maamar H, Raj A, & Dubnau D (2007) Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*. *Science (New York, N.Y)* 317(5837):526-529.
12. Suel GM, Kulkarni RP, Dworkin J, Garcia-Ojalvo J, & Elowitz MB (2007) Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. *Science (New York, N.Y)* 315(5819):1716-1719.
13. Grossman AD & Losick R (1988) Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12):4369-4373.
14. Haldenwang WG, Lang N, & Losick R (1981) A sporulation-induced sigma-like regulatory protein from *B. subtilis*. *Cell* 23(2):615-624.
15. Haldenwang WG & Losick R (1980) Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(12):7000-7004.
16. Moran CP, Jr., Lang N, Banner CD, Haldenwang WG, & Losick R (1981) Promoter for a developmentally regulated gene in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25(3):783-791.
17. Gonzalez-Pastor JE, Hobbs EC, & Losick R (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science (New York, N.Y)* 301(5632):510-513.
18. Hilbert DW & Piggot PJ (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):234-262.
19. Jonas RM & Haldenwang WG (1989) Influence of *spo* mutations on sigma E synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 171(9):5226-5228.
20. Frandsen N & Stragier P (1995) Identification and characterization of the *Bacillus subtilis* spoIIP locus. *Journal of bacteriology* 177(3):716-722.
21. Broder DH & Pogliano K (2006) Forespore engulfment mediated by a ratchet-like mechanism. *Cell* 126(5):917-928.
22. Abanes-De Mello A, Sun YL, Aung S, & Pogliano K (2002) A cytoskeleton-like role for the bacterial cell wall during engulfment of the *Bacillus subtilis* forespore. *Genes Dev* 16(24):3253-3264.
23. Fujita M, Gonzalez-Pastor JE, & Losick R (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 187(4):1357-1368.
24. Fujita M & Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev* 19(18):2236-2244.
25. Phillips ZE & Strauch MA (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59(3):392-402.
26. Veening JW, Hamoen LW, & Kuipers OP (2005) Phosphatases modulate the bistable sporulation gene

- expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 56(6):1481-1494.
27. Banse AV, Chastanet A, Rahn-Lee L, Hobbs EC, & Losick R (2008) Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(40):15547-15552.
 28. Chastanet A, *et al.* (2010) Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(18):8486-8491.
 29. Chastanet A & Losick R (2011) Just-in-time control of Spo0A synthesis in *Bacillus subtilis* by multiple regulatory mechanisms. *Journal of bacteriology* 193(22):6366-6374.
 30. Young KD (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(3):660-703.
 31. Vollmer W & Seligman SJ (2010) Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in microbiology* 18(2):59-66.
 32. Mattei PJ, Neves D, & Dessen A (2010) Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Current opinion in structural biology* 20(6):749-755.
 33. Holtje JV (1996) A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 8):1911-1918.
 34. Alyahya SA, *et al.* (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(4):1239-1244.
 35. Chastanet A & Carballido-Lopez R (2012) The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 4:1582-1606.
 36. Kawai Y, Asai K, & Errington J (2009) Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 73(4):719-731.
 37. Carballido-López R, *et al.* (2006) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Developmental cell* 11(3):399-409.
 38. Tseng CL & Shaw GC (2008) Genetic evidence for the actin homolog gene *mreBH* and the bacitracin resistance gene *bcrC* as targets of the alternative sigma factor SigI of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 190(5):1561-1567.
 39. Huang WZ, Wang JJ, Chen HJ, Chen JT, & Shaw GC (2013) The heat-inducible essential response regulator WalR positively regulates transcription of sigI, mreBH and lytE in *Bacillus subtilis* under heat stress. *Research in microbiology* 164(10):998-1008.
 40. Jones LJ, Carballido-López R, & Errington J (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104(6):913-922.
 41. Schirner K & Errington J (2009) The cell wall regulator {sigma}I specifically suppresses the lethal phenotype of mbl mutants in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 191(5):1404-1413.
 42. van den Ent F, Amos LA, & Lowe J (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413(6851):39-44.
 43. Formstone A & Errington J (2005) A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 55(6):1646-1657.
 44. Leaver M & Errington J (2005) Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 57(5):1196-1209.
 45. Lee JC & Stewart GC (2003) Essential nature of the *mreC* determinant of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 185(15):4490-4498.
 46. Defeu Soufo HJ & Graumann PL (2006) Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Molecular microbiology* 62(5):1340-1356.
 47. van den Ent F, *et al.* (2006) Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Molecular microbiology* 62(6):1631-1642.
 48. Claessen D, *et al.* (2008) Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 68(4):1029-1046.
 49. Doi M, *et al.* (1988) Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology* 170(10):4619-4624.
 50. Levin PA, Margolis PS, Setlow P, Losick R, & Sun D (1992) Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *Journal of bacteriology* 174(21):6717-6728.
 51. Wachi M, Doi M, Okada Y, & Matsushashi M (1989) New mre genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology* 171(12):6511-6516.
 52. Carballido-López R & Errington J (2003) The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Developmental cell* 4(1):19-28.
 53. Defeu Soufo HJ & Graumann PL (2004) Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial

- cells. *EMBO reports* 5(8):789-794.
54. Carballido-López R (2006) The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4):888-909.
 55. Rueff AS, *et al.* (2014) An early cytoplasmic step of peptidoglycan synthesis is associated to MreB in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 91(2):348-362.
 56. Domínguez-Escobar J, *et al.* (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science (New York, N.Y)* 333(6039):225-228.
 57. Garner EC, *et al.* (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science (New York, N.Y)* 333(6039):222-225.
 58. van Teeffelen S, *et al.* (2011) The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):15822-15827.
 59. Errington J (2015) Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix. *Nature reviews. Microbiology* 13(4):241-248.
 60. Olshausen PV, *et al.* (2013) Superresolution imaging of dynamic MreB filaments in *B. subtilis*--a multiple-motor-driven transport? *Biophysical journal* 105(5):1171-1181.
 61. Reimold C, Defeu Soufo HJ, Dempwolff F, & Graumann PL (2013) Motion of variable-length MreB filaments at the bacterial cell membrane influences cell morphology. *Molecular biology of the cell* 24(15):2340-2349.
 62. Bean GJ, *et al.* (2009) A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry* 48(22):4852-4857.
 63. Nurse P & Mariani KJ (2013) Purification and characterization of Escherichia coli MreB protein. *The Journal of biological chemistry* 288(5):3469-3475.
 64. van den Ent F, Izore T, Bharat TA, Johnson CM, & Lowe J (2014) Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments. *eLife* 3:e02634.

Annexes

I- Projets associés ou collaboratifs

Projet terminé:

Rôle du cytosquelette bactérien dans le développement de la compétence naturelle chez *B. subtilis*. Collaboration intra-équipe avec N. Mirouze.

Projets en cours:

Localisation et dynamique des RNases de *B. subtilis*. Collaboration externe avec le groupe de H. Putzer (IBPC, Paris) dans le cadre de la thèse de L. Hamouche.

Localisation et dynamique des machineries de réplication du phage SPP1 durant l'infection de *B. subtilis*. Collaboration dans le cadre d'une ANR avec le groupe de P. Tavares (CNRS, Gif-sur-Yvette).

Caractérisation fonctionnelle des protéines MreC et MreD de *B. subtilis*. Co-supervision de post-doctorants dans l'équipe: R. Keary et X. Henry.

Caractérisation du locus *yydF-J* chez *B. subtilis*. Collaboration avec l'équipe de O. Berteau (INRA, Jouy-en-Josas).

Localisation des protéines cytosquelettiques de *Shigella Flexneri* au cours de l'infection. Collaboration avec S. Mostowi (Imperial College, London) dans le cadre de la thèse de S. Krokowski.

Publications issues de ces travaux :

Mirouze N, Ferret C, Yao Z, **Chastanet A**, Carballido-López R. "MreB-Dependent Inhibition of Cell Elongation during the Escape from Competence in *Bacillus subtilis*". **PLoS Genet.** 2015 Jun 19;11(6): e1005299.

II- Sélection de publications (dans des revues à comité de lecture)

- 1- Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T. J. Bacteriol. 2001 183:7295-307.
- 2- Chastanet A, Fert J and Msadek T. Mol. Microbiol. 2003 47:1061-73.
- 3- Chastanet A and Losick. R. Mol. Microbiol. 2007 64:139-52.
- 4- Chastanet A, Vitkup D, Yuan GC, Norman TM, Liu JS, Losick RM. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; May 4;107(18):8486-91
- 5- Dominguez-Escobar J, Chastanet A, Crevenna AH, Fromion V, Wedlich-Soldner R, Carballido-Lopez R. Science 2011, 333; 225 - 228
- 6- Chastanet A and Carballido-Lopez R. Front Biosci (Schol Ed.) 2012, Jun 1;4:1582-606.