

RÉSUMÉ

L'infection des bactéries par leurs virus se déroule en quatre étapes principales qui sont: (i) la reconnaissance spécifique de la cellule hôte et l'entrée du génome dans le cytoplasme, (ii) la réplication du génome viral, (iii) l'assemblage des particules virales, et (iv) leur relâchement, menant dans la plupart des cas à la lyse de la cellule. Bien que la description des étapes individuelles du cycle viral soit relativement bien établie, certains détails restent mal compris notamment au niveau du transport de l'ADN viral à partir du virion jusqu'au cytoplasme de la bactérie hôte, ou en ce qui concerne la participation de l'environnement cellulaire au processus.

La première étape de l'infection est la reconnaissance d'un récepteur à la surface de la bactérie hôte par la machinerie d'adsorption du phage. Les barrières que l'agent infectieux doit franchir par la suite sont la membrane externe de la bactérie Gram-négative, la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique. Ceci implique une dégradation localisée de la paroi et le transport de l'ADN à travers un pore dans la membrane. L'ADN linéaire se circularise probablement dans le cytoplasme avant d'être répliqué. Afin d'analyser ces différentes étapes clés pour le démarrage de l'infection virale, nous avons utilisé comme modèle d'étude le bactériophage SPP1 qui infecte la bactérie Gram-positif *Bacillus subtilis*.

Dans ce travail de thèse, les conditions d'infection et d'acquisition de données pour suivre en temps réel la dépolarisation de la membrane cellulaire de *B. subtilis* lors de l'infection par SPP1 ont été mises au point. Il est montré que le démarrage de l'infection déclenche une dépolarisation très rapide de la membrane cytoplasmique. Le potentiel de membrane n'est pas rétabli durant toute la durée du cycle d'infection. Ce changement de potentiel de membrane au début de l'infection dépend de la présence du récepteur YueB. L'amplitude de la dépolarisation dépend du nombre de particules virales infectieuses présentes et de la concentration du récepteur YueB à la surface de la bactérie hôte. L'interaction entre le phage SPP1 et le récepteur YueB conduit à la fixation irréversible

du phage et à l'éjection de son ADN. La dépolarisation de la membrane peut être provoquée soit par l'interaction du phage avec YueB, soit par l'entrée de l'ADN. Afin de déterminer quel est l'événement qui conduit à la dépolarisation, nous avons utilisé des phages SPP1 éclatés par l'EDTA; ces phages s'adsorbent normalement à *B. subtilis* mais ne contiennent pas d'ADN. Les résultats obtenus ont montré que la dépolarisation requiert l'interaction du virus intact avec le récepteur YueB. Des concentrations submillimolaires de Ca^{2+} sont nécessaires et suffisantes pour établir une liaison réversible entre SPP1 et l'enveloppe de la bactérie hôte, et donc pour déclencher la dépolarisation.

La cinétique d'entrée de l'ADN du bactériophage SPP1 dans la bactérie *Bacillus subtilis* a été suivie en temps réel par microscopie de fluorescence. Une méthode de microscopie a été mise au point dans le but de visualiser des particules virales marquées avec des «quantum dots»; cette technique a permis de démontrer que ces particules se fixent préférentiellement aux pôles des bacilli. L'immuno-marquage de la protéine YueB, le récepteur de SPP1, a montré que celle-ci est répartie de manière punctiforme à la surface de *B. subtilis* et se concentre plus particulièrement aux extrémités de la bactérie. Cette localisation particulière du récepteur du phage à la surface de la cellule hôte corrèle avec les observations de l'entrée de l'ADN viral dans le cytoplasme (<2 min) et sa réplication, dans des foci situés dans la plupart des cas à proximité des pôles de *B. subtilis*. L'étude spatio-temporelle de l'interaction de SPP1 avec son hôte Gram-positif montre que le virus cible des régions spécifiques de la bactérie pour son entrée et pour sa réplication. Le transfert d'ADN dans le cytoplasme dépend de concentrations de Ca^{2+} de l'ordre du millimolaire.

Discussion et résultats

Les bactériophages utilisent une variété de stratégies pour transporter leur génome à travers l'enveloppe bactérienne dans le cytoplasme des cellules où leur information génétique est exprimée et répliquée. Le premier contact avec la surface bactérienne conduit généralement à une liaison réversible. Dans une deuxième étape, les virions se

fixent de façon irréversible aux récepteurs spécifiques de l'enveloppe cellulaire commis à l'infection de l'hôte. Les liaisons réversibles et irréversibles peuvent s'effectuer via les mêmes récepteurs, ou impliquer différents composants de surface (section de la thèse I.5.1.1). Les particules de phage possèdent souvent une activité de dégradation de la paroi cellulaire afin de percer la couche de peptidoglycane (PG) et d'accéder à la membrane cytoplasmique (MC) (section de la thèse I.5.2). Le passage du génome à travers la MC exige la formation de pores permettant à l'ADN du virion d'accéder au cytoplasme. L'entrée de l'ADN peut être un processus très rapide; par exemple, il peut prendre moins de 30 secondes pour la phage T4 (Letellier et al., 1999). Ce processus peut aussi être sensiblement plus lent comme dans le cas du phage T7, dont l'internalisation complète du génome prend environ un tiers de la durée du cycle d'infection (García et Molineux, 1996). Plusieurs mécanismes de transfert de l'ADN dans le cytoplasme sont susceptibles d'exister, ce qui expliquerait les différences de vitesse d'entrée de l'ADN. La question est de savoir comment le génome du phage traverse l'enveloppe bactérienne, alors que la molécule d'ADN est grande, hydrophile, et polyanionique. Les informations concernant la pénétration du génome du phage dans les bactéries Gram-positives sont très rares comparées aux systèmes Gram-négatifs. Compte tenu des connaissances de biologie moléculaire accumulées sur la queue du phage SPP1 et sur son hôte, notre recherche porte sur les mécanismes moléculaires de l'entrée de SPP1 dans la cellule et sur sa multiplication dans la bactérie Gram-positif modèle *B. subtilis*. L'interaction irréversible de SPP1 avec la protéine réceptrice YueB cause des changements physiologiques rapides de la MC de *B. subtilis*. Les résultats présentés dans cette thèse établissent les exigences spécifiques de l'infection par le phage SPP1, ainsi que ses différentes étapes dans l'espace et dans le temps. La séquence des événements moléculaires conduisant au passage d'un génome de SPP1 à travers l'enveloppe cellulaire de *B. subtilis* a été étudiée avec une variété d'approches expérimentales (Fig. 1).

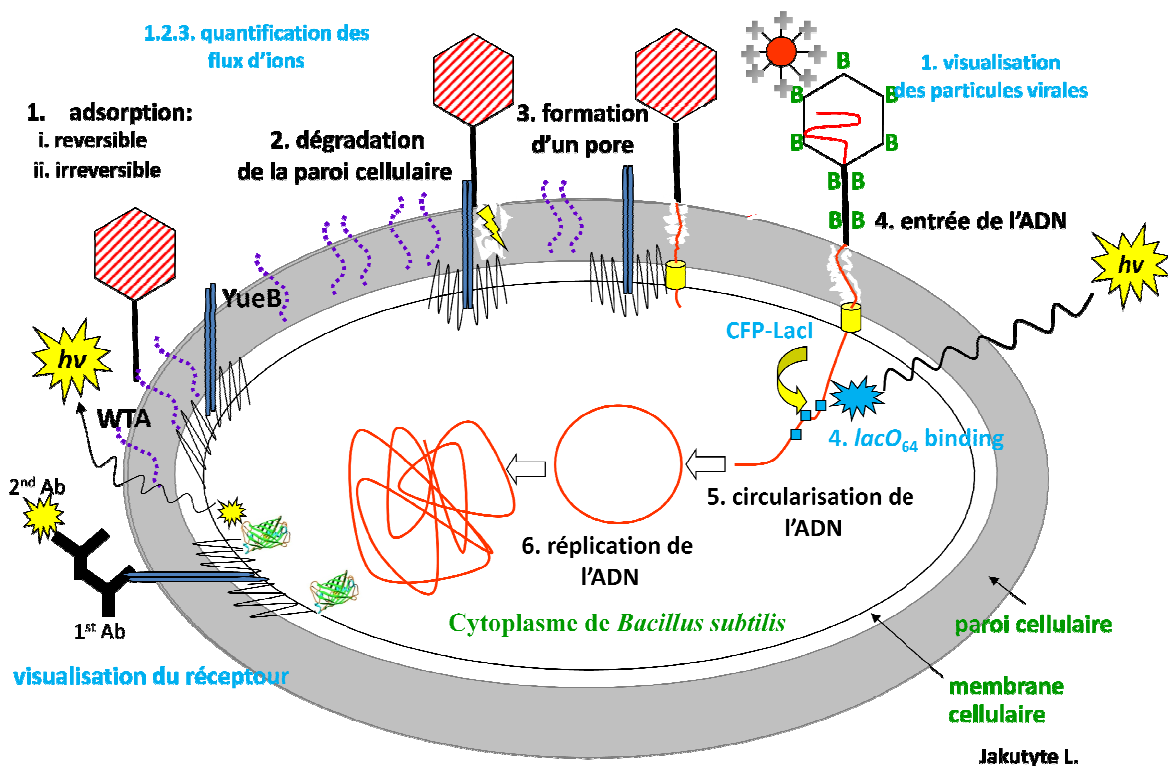


Figure 1. – Infection de la bactérie Gram-positive *B. subtilis* par le bactériophage SPP1. Les différentes étapes de l'entrée du virus sont présentées en noir et les approches expérimentales employées pour étudier chacune d'entre elles sont notées en bleu avec la même numérotation. Infection de *B. subtilis* par le bactériophage SPP1. Étapes d'entrée du bactériophage (en noir) et dosages expérimentaux utilisés dans cette étude (en bleu). (1) Adsorption réversible de SPP1 sur les acides teichoïques glycosylés (WTAs) de la paroi cellulaire et adsorption irréversible à la protéine YueB, (2) dégradation de la couche de peptidoglycane (PG), (3) formation des pores dans la MC, (1-3) ont été étudiées en utilisant des mesures potentiométriques du flux des ions à travers la MC (section III.1). (4) Entrée de l'ADN dans le cytoplasme, (5) circularisation et (6) réplication. (4-6) ont été étudiées par des méthodes de microscopie de fluorescence (section III.3.3 de la thèse). La visualisation des protéines réceptrices YueB par fusion à la protéine fluorescente verte (GFP) et l'immunofluorescence sont décrites dans la section III.3.2 de la thèse. La visualisation des particules de phage se fait grâce à des particules fluorescentes appelées points quantiques (Qdot) (section III.3.1 de la thèse). Le schéma n'est pas à l'échelle.

L'interaction de SPP1 avec YueB déclenche une dépolarisation très rapide de la MC de *B. subtilis*.

Pour entrer dans les bactéries, le génome viral doit traverser l'enveloppe cellulaire. Cette étape initiale de l'infection est généralement associée à la dépolarisation de la MC et/ou à la libération des ions K^+ intracellulaires (Letellier et al., 1999; Poranen et al., 2002). La cinétique et le modèle de fuite d'ions sont différents chez les phages, fournissant une empreinte digitale de l'infection par chaque type de virus. Il n'est pas encore déterminé si la dépolarisation de la MC et/ou la fuite de K^+ jouent un rôle physiologique dans l'infection ou s'ils sont des effets secondaires accompagnant l'entrée des phages. L'infection de *E. coli* par les phages caudés T4 et T5 conduit à la fois à la dépolarisation de la MC et à un efflux de K^+ (Boulanger et Letellier, 1992; Grinius et Daugelavicius, 1988; Labedan et Letellier, 1981; Letellier et Labedan, 1984). En revanche, les bactériophages PRD1 qui utilisent un dispositif à membrane interne pour le transport d'ADN dans le cytoplasme hôte conduisent à un efflux de K^+ mais pas à une dépolarisation de la membrane (Daugelavicius et al., 1997; Grahn et al., 2002).

Le bactériophage SPP1 conduit à une dépolarisation rapide (<1 min) de la MC de l'hôte (Fig. 2B), mais seulement à une fuite lente et faible de K^+ intracellulaire (Fig. 2A).

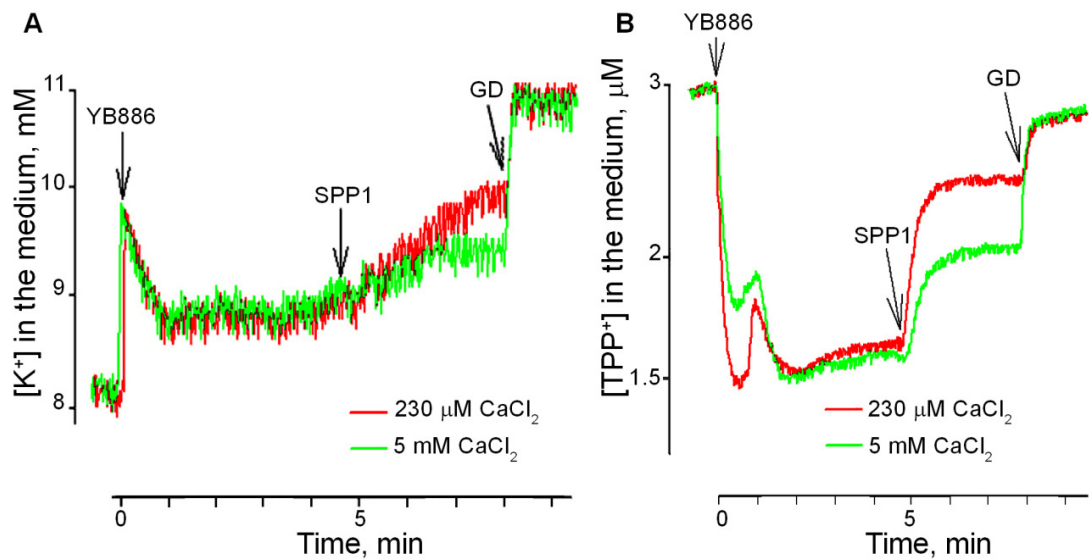


Fig. 2. Les flux d'ions K^+ (A) et TPP^+ (B) à travers la MC de *B. subtilis* infectées par SPP1 (5 pfu/cfu) quand aucun Ca^{2+} n'est ajouté (rouge) et en présence de 5 mM $CaCl_2$ exogène (vert). Les concentrations ioniques extracellulaires ont été mesurées avec des électrodes ioniques spécifiques. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

La dépolarisation induite par SPP1 est nettement plus rapide que celle induite par les phages à queue $\phi 29$ et SP01 ou l'entrée du phage contenant membrane Bam35 dans *B. thuringiensis* (Fig. 3A,B; Gaidelyte et al., 2006).

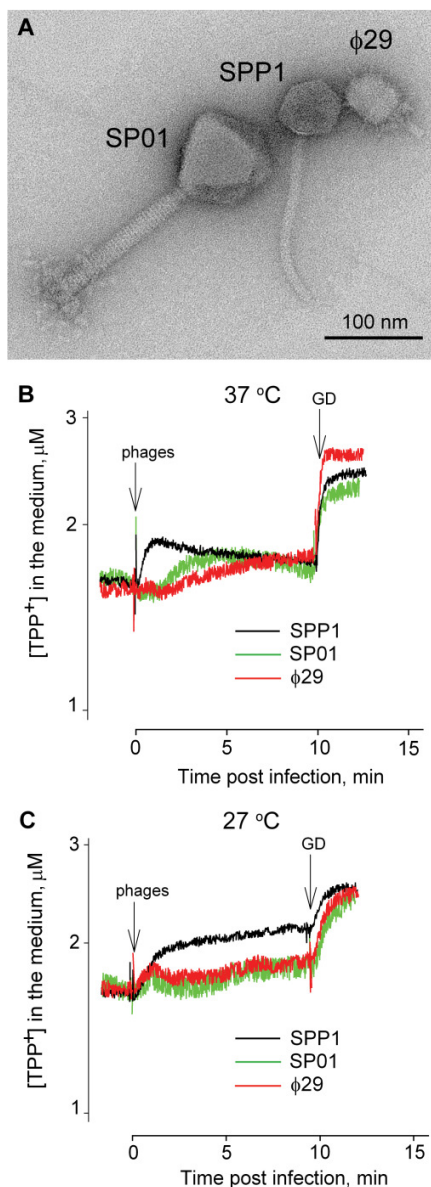


Fig. 3. Dépolarisation de la MC causée par SPP1, SP01 et ϕ 29 après infection de *B. subtilis* YB886. (A) SPP1, SP01 et ϕ 29 phages observés par EM après coloration négative. (B, C) Variation de la concentration extracellulaire du TPP⁺ dans les cultures de *B. subtilis* YB886 infectées par SPP1 (noir), SP01 (vert) et ϕ 29 (rouge) à 37° C (B) et 27° C (C). Des infections ont été réalisées à une i.m. de 6 pfu/cfu et la mesure de concentration du TPP⁺ dans le milieu a été réalisée comme décrit dans la Fig.III.1. Les flèches indiquent l'ajout de phages et gramicidine D (GD) (concentration finale de 5 μ g ml⁻¹). Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

Dans le dernier cas, la dépolarisation de la MC et la fuite de K⁺ intracellulaire surviennent simultanément à partir de 2 min post-infection (p.i.). La dépolarisation de la MC induite par SPP1 est moins dépendante de la température que pour les trois autres phages discutés (Fig. 3C; Gaidelyte et al., 2006). La sensibilité à la température peut être liée à de l'énergie d'activation nécessaire pour déclencher l'éjection de l'ADN de SPP1 (Raspaud et al., 2007), ou à de la dépendance à l'égard d'un processus enzymatique et/ou d'un effet sur la fluidité de la membrane. Les observations de la dépolarisation retardée et lente causée par ϕ 29 et SP01 (Fig. 3C) ou Bam35 (Gaidelyte et al., 2006) à 27° C suggèrent qu'il existe au moins une étape dépendante de la température, lors des étapes initiales de l'infection, qui est moins critique dans le cas de l'infection par SPP1. Une explication possible est la digestion de la paroi cellulaire après la fixation irréversible des particules de phage à des récepteurs non-protéiques: ϕ 29 et SP01 se fixent aux WTA (Yasbin et al., 1976; Young, 1967), Bam35 se lie à l'acide N-acétyl-muramique (Gaidelyte et al., 2006), SPP1 s'attache réversiblement aux WTA glycosylés (Baptista et al., 2008), mais cette étape ne mène pas à la dépolarisation de la MC (Fig. 4A). L'adsorption irréversible des particules de phage à YueB est nécessaire pour le déclenchement de la dépolarisation; YueB est une protéine membranaire dont l'ectodomaine traverse la paroi de la cellule (Fig. I.8 de la thèse; São José-et al, 2004, 2006). La liaison de SPP1 concerne directement la MC. D'autre part, la couche inférieure de PG peut être rigide dans cette région de la paroi cellulaire.

Le niveau de la dépolarisation de la membrane de *B. subtilis* augmente avec la multiplicité d'infection utilisée (Fig. 4B), montrant que chaque événement d'adsorption irréversible de phage génère un signal d'appel pour un débit d'ions à travers la MC. L'amplitude maximale de dépolarisation pour la souche sauvage YB886 de *B. subtilis* a été atteinte à une i.m. de 8 virions SPP1 pour une bactérie. La dépolarisation de la MC observée n'a été que partielle, ce qui reflète un nombre limité de récepteurs YueB actifs pour la liaison de SPP1 à la surface bactérienne (Baptista et al., 2008; Jakutyte et al, 2011.; São José-et al., 2004). Cette conclusion est étayée par l'infection d'une souche

surproduisant YueB qui mène à l'augmentation des amplitudes de l'efflux de TPP^+ qui peuvent atteindre des valeurs révélant une dépolarisation totale de la MC (Fig. 4C).

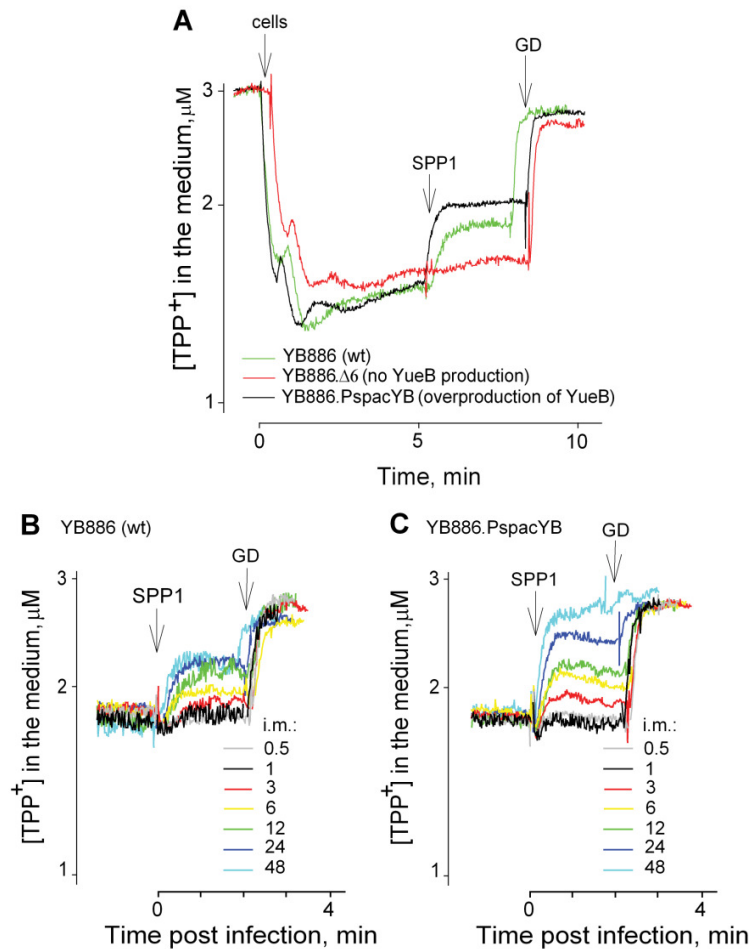


Fig. 4. Effet de l'infection par SPP1 sur le flux d'ions TPP^+ à travers la MC de différentes souches de *B. subtilis*. (A) infection (i.m. de 5 pfu/cfu) de la souche sauvage YB886 (vert), YB886.Δ6 (pas de production YueB) (rouge), et YB886.PspacYB (surproduction de YueB) (noir). Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes. Effet de l'i.m. (pfu/cfu, comme indiqué en B et C) sur le flux d'ions TPP^+ induit par SPP1, à travers la MC de *B. subtilis* YB886 (B) et YB886.PspacYB (C). Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences indépendantes.

Le déclenchement de la dépolarisation de la MC nécessite l'interaction de particules intactes de SPP1 avec *B. subtilis* (Fig. 5B) montrant qu'une modification structurelle de la particule SPP1, probablement le début de l'éjection de l'ADN, est le

signal nécessaire à l'ouverture des canaux ioniques membranaires qui conduisent à la dépolarisation de la MC. Cela diffère du phage T4 dont les virions et les particules éclatées (fantômes) par un choc osmotique causent un efflux d'ions lors de l'interaction avec les bactéries hôtes (Boulangier et Letellier, 1988; Duckworth et Winkler, 1972; Winkler et Duckworth, 1971).

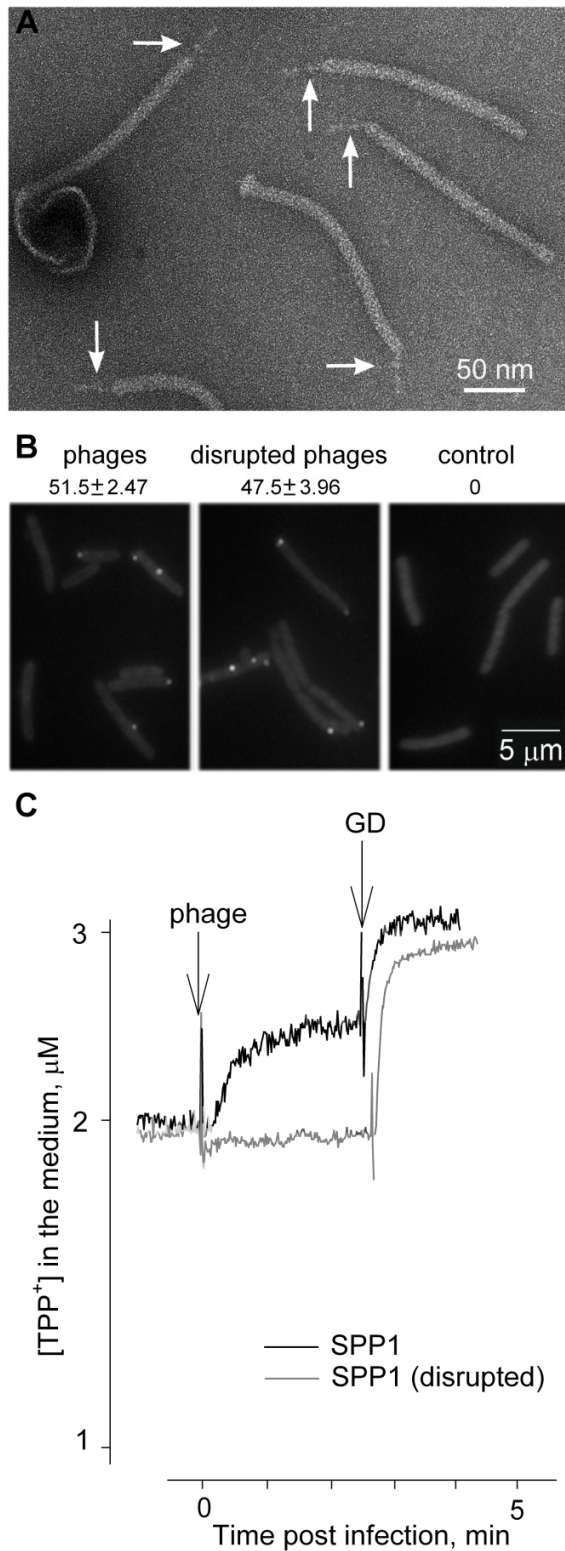


Fig. 5. Virions de SPP1 viables et éclatés se liant à des cellules *B. subtilis* YB886 et les effets sur les flux d'ion TPP⁺ à travers la MC. (A) phages SPP1 éclatés avec de l'EDTA observés par microscopie électronique (ME) après coloration négative. Notez que l'appareil d'adsorption à l'hôte, caractérisé par la présence de la pointe de la queue, reste intact (flèches). (B) Phages (à gauche) et phages éclatés (au centre) marqués par des quantum dots, se liant à *B. subtilis* YB886. Aucune liaison non spécifique de quantum dots aux bactéries n'a été observée (à droite). (C) Mesure de la concentration de TPP⁺ dans le milieu de cellules infectées avec SPP1 intact (i.m. de 5 pfu/cfu) ou infectées avec un nombre équivalent de particules éclatées par l'EDTA. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

Effet des ions Ca^{2+} dans l'infection par SPP1

Les ions Ca^{2+} jouent un rôle essentiel à des stades précoces de l'infection par les phages du groupe SPP1 (Landry et Zsigray, 1980; Santos et al., 1984; Steensma et Blok, 1979). Ici, nous montrons que les cations divalents sont nécessaires pour l'adsorption réversible du phage sur les WTAs glycosylés (Fig. 6D). Dans la paroi de *B. subtilis*, les WTAs et l'acide téichuronique présentent un ratio de Ca^{2+} à la cellule 100 à 120 fois plus élevé que dans le milieu extracellulaire (Neuhaus et Baddiley, 2003; Petit-Glatron et al., 1993). L'effet des cations divalents sur la structure des WTA (Neuhaus et Baddiley, 2003) et/ou sur la charge de la surface locale de la paroi cellulaire pourrait expliquer leur rôle pour la liaison réversible de SPP1 à l'enveloppe de *B. subtilis*. Les données actuelles ne permettent pas d'établir si le Ca^{2+} joue également un rôle à l'étape ultérieure de l'infection correspondant à l'interaction irréversible de SPP1 avec YueB.

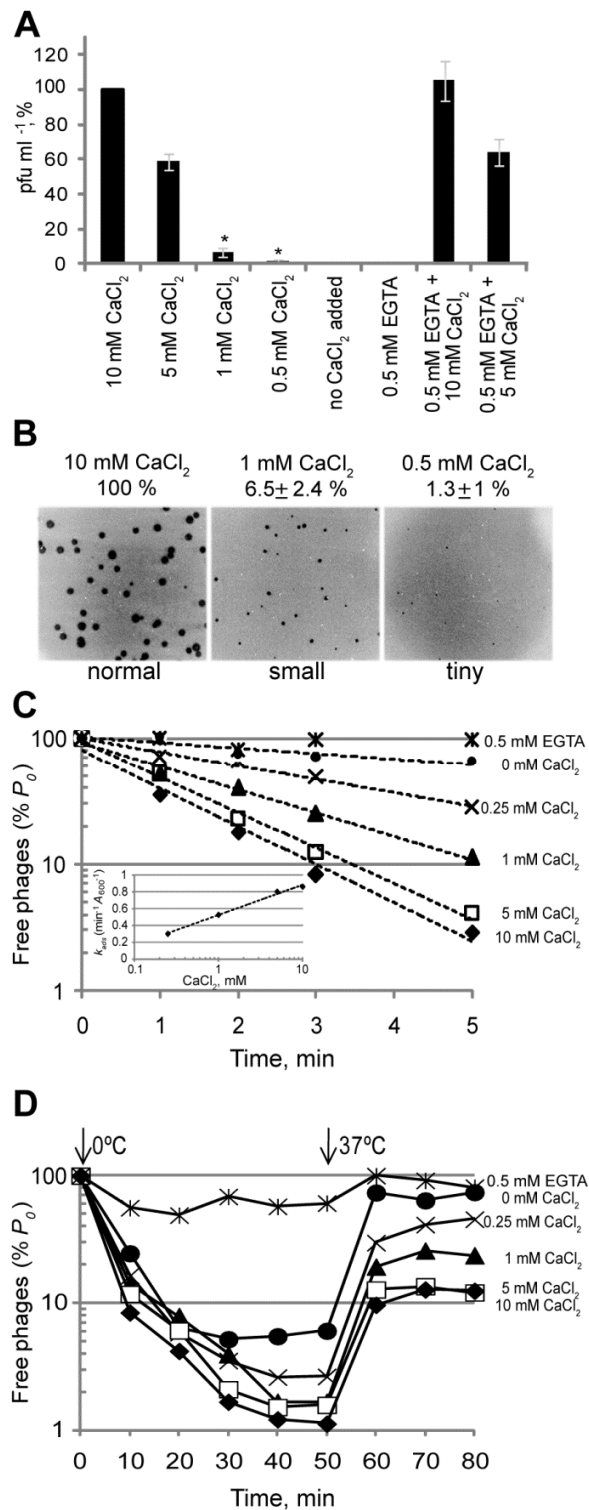


Fig. 6. Effet du Ca²⁺ sur l'infection par SPP1. (A) Infection de *B. subtilis* YB886 en milieu semi-solide (EOP) contenant les suppléments indiqués. Les titres sont exprimés en pourcentage du titre obtenu en présence de 10 mM de CaCl₂ ($1,62 \pm 3,29 \times 10^{12}$ pfu/ml) et sont des moyennes d'au moins trois expériences indépendantes. L'astérisque indique un phénotype « petite plage de lyse » qui dépend de la concentration de CaCl₂ comme illustré en (B). (C) Adsorption irréversible de SPP1 à *B. subtilis* YB886. La constante d'adsorption irréversible (k_{ads}), déterminée comme décrit (Baptista et al., 2008), a été tracée en fonction du log de la concentration de CaCl₂ (en insertion). (D) Adsorption réversible de SPP1 à *B. subtilis* YB886.Δ6 (pas de production de YueB) en présence de différentes concentrations de CaCl₂. Pré-incubation dans de la glace fondue pendant 10 min puis ajout de SPP1 (i.m. De 0,1). Des aliquots ont été pris à différents moments pour titrer les virions viables dans le surnageant de culture comme décrit par Baptista et al., 2008. La culture a été transférée à 37° C à 50 min post-infection pour favoriser la libération des phages adsorbés. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'apport initial de phages (P₀).

L'adsorption de SPP1 à *B. subtilis* exige des quantités submillimolaires de Ca^{2+} qui sont également suffisantes pour que les particules de SPP1 déclenchent la dépolarisation de la MC (Fig. 7B).

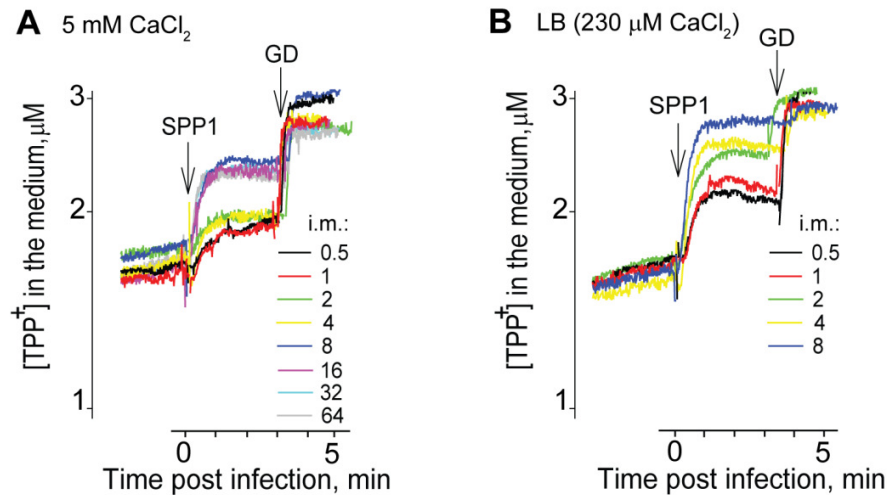


Fig. 7. Effet la concentration de Ca^{2+} sur la dépolarisation de la MC induite par SPP1. Des infections ont été réalisées dans du LB avec 5 mM CaCl_2 (A) ou sans supplément (contenant 230 μM de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, mesuré avec une électrode de Ca^{2+}) (B) à l'i.m. indiquée. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

L'élévation de la concentration de Ca^{2+} extracellulaire à des niveaux de l'ordre du millimolaire est essentielle pour l'entrée de l'ADN de SPP1 dans le cytoplasme (Fig. 8) et donc pour l'infection normale. L'amplitude de la dépolarisation de la MC diminue à ces concentrations de Ca^{2+} , révélant un effet inhibiteur sur les flux d'ions (Fig. 2 et Fig. 7) qui pourraient contribuer à maintenir l'homéostasie des *B. subtilis* infectées.

Cette première partie du travail a établi les exigences pour les premières étapes de l'entrée de SPP1. Nous avons poursuivi en cherchant à comprendre la manière dont le phage exploite l'architecture de l'enveloppe cellulaire pour l'adsorption et l'arrivée de l'ADN viral dans le cytoplasme de l'hôte.

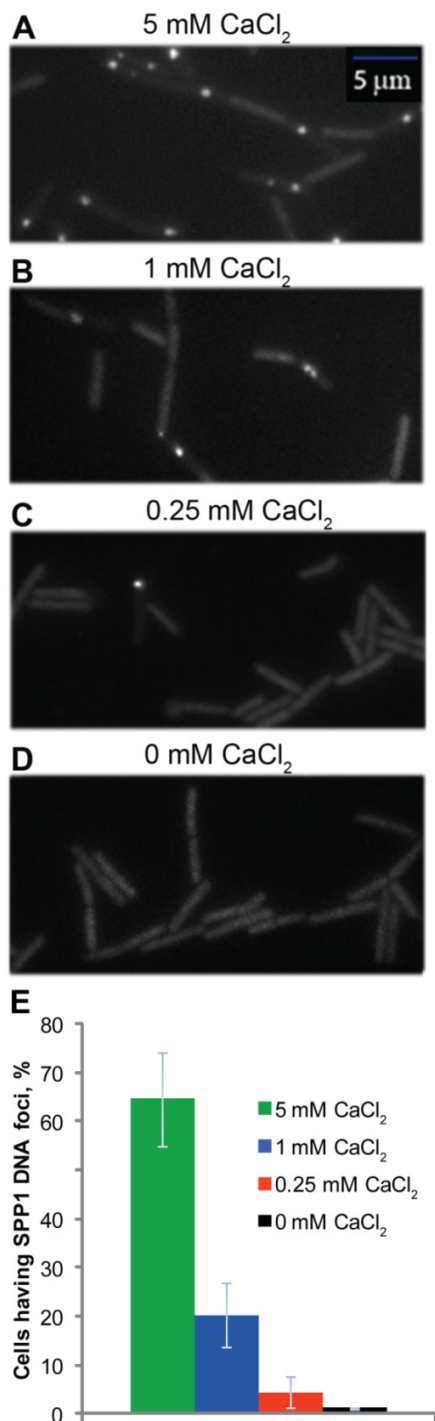


Fig. 8. Visualisation de l'ADN de SPP1 dans les cellules *B. subtilis* infectées. (**A-D**) Cultures de *B. subtilis* produisant LacI-CFP additionnées de 5mM (**A**), 1mM (**B**), 0,25 mM de CaCl₂ (**C**) et sans CaCl₂ (**D**), infectées par le phage SPP1~~delX110lacO₆₄~~ (i.m. De 5), et observées 20-40 min p.i. La concentration endogène de Ca²⁺ dans le milieu LB utilisé est de ~10 μM. (**E**) Pourcentage de cellules présentant des foyers d'ADN de SPP1 après 20-40 min d'infection en présence des suppléments indiqués. Les résultats sont une moyenne de quatre expériences d'infection indépendantes dans lesquelles un nombre total de 412 (**A**), 525 (**B**), 634 (**C**) et 405 (**D**), cellules ont été comptées.

Programme spatio-temporel de l'entrée de SPP1 dans *B. subtilis*

L'entrée dans la cellule hôte est une étape essentielle pour l'initiation de l'infection virale. Cet événement se produit préférentiellement au niveau ou à proximité du pôle des cellules de *B. subtilis* lors de l'infection par SPP1 (Fig. 9).

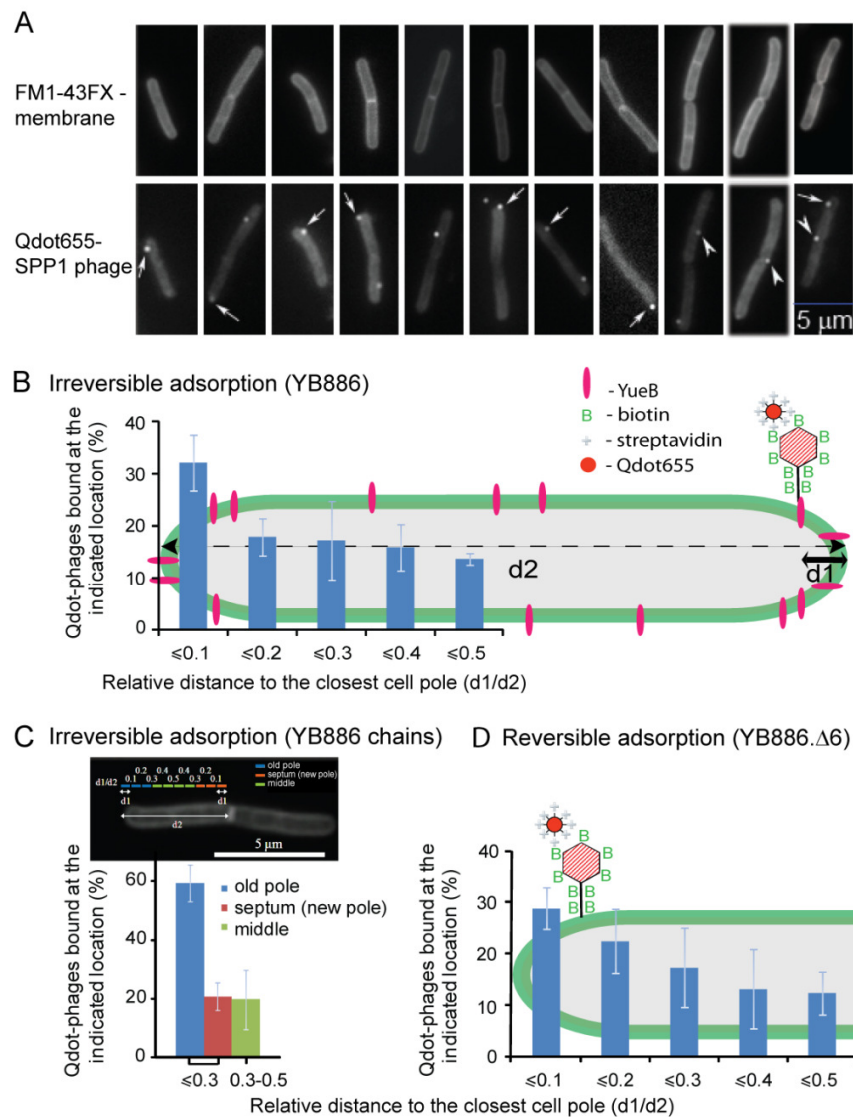


Fig. 9. Localisation des particules de phage SPP1 à la surface des cellules *B. subtilis*. **A.** Galerie de *B. subtilis* YB886 (type sauvage) avec coloration de la membrane pour définir le contour des cellules (rangée du haut) et contenant les phages SPP1 $delX110lacO_{64}$ marqués avec des Qdot655 (rangée du bas). Les flèches indiquent les Qdot-phages au niveau des pôles des cellules et au niveau des régions septales. **B-D.** Pourcentage de particules de SPP1 marquées avec des Qdot à

la distance indiquée relative ($D1/D2$) au pôle le plus proche des cellules de type sauvage YB886 (**B**); à l'ancien pôle ou au septum dans les chaînes de deux ou plusieurs bactéries YB886 (un sous-ensemble de données provenant de **B**) (**C**) et au pôle le plus proche de cellules de *B. subtilis* YB886.Δ6 (souche ne produisant pas YueB) (**D**). Les infections ont été réalisées à une i.m. de 6 phages par bactérie comme décrit dans la section II.5.1 de la thèse. Les résultats sont une moyenne de trois expériences d'infection indépendantes dans lesquelles un nombre total de 400 (**B**), 96 (**C**) et 125 (**D**) cellules avec un seul phage-Qdot ont été mesurées. Notez que le faible nombre de comptage pour YB886.Δ6 est due à l'absence d'adsorption irréversible ce qui explique pourquoi seulement 8 % des cellules ont un phage-Qdot.

Cette topologie est en corrélation avec l'entrée de l'ADN viral et l'initiation de la réplication qui se produit dans des foyers définis à l'intérieur de la bactérie (Fig. III.17; III.18 de la thèse).

L'adsorption réversible de SPP1, qui cible les WTA glycosylés poly (glycerolphosphate), est indépendante du récepteur protéique YueB (Baptista et al., 2008), mais se produit également préférentiellement près des pôles cellulaires (Fig. 9D). Cela suggère une distribution particulière des WTA à la surface cellulaire, ou au moins d'un en particulier (glycosylé) qui est la forme de ces polymères reconnue par SPP1. Les protéines impliquées dans plusieurs étapes de la synthèse des WTA de *B. subtilis* ont été localisées aux sites de division et, dans une moindre mesure, le long des faces latérales des cellules dans un modèle d'hélice, mais ont été particulièrement absentes des régions polaires (Formstone et al., 2008). Le transporteur putatif TagGH des WTA étant pratiquement absent des pôles cellulaires, il a été suggéré que l'exportation et donc l'incorporation des WTA dans la paroi survient pendant la division (la formation du septum) et est absent après la séparation cellulaire et la formation des pôles cellulaires. Cela est conforme à la rotation plus lente des WTA au niveau des pôles des cellules par rapport au cylindre cellulaire (Archibald et Coapes, 1976; Clarke-Sturman et al., 1989; Graham et Beveridge, 1994; Kirchner et al., 1988; Mobley et al., 1984). Les différentes propriétés des pôles des cellules et leur caractère électro-négatif parfaitement adapté pour une liaison cationique (Sonnenfeld et al., 1985) pourraient favoriser l'interaction avec SPP1. Alternativement (ou simultanément) si les WTA restent aux anciens pôles pendant plusieurs temps de génération, cela pourrait favoriser la modification (glucosylation) des

WTA, favorisant la reconnaissance de ces sites par SPP1. La liaison réversible des particules de phage au niveau des pôles cellulaires peut alors faciliter la recherche du récepteur, YueB, qui est également localisé essentiellement au niveau des pôles cellulaires (Fig. III.15; III.16 de la thèse). Cela peut revêtir une importance significative, car en l'absence de WTA glucosylés le temps requis pour SPP1 à reconnaître et à se lier à YueB augmente drastiquement (Baptista et al., 2008), probablement en raison de la faible abondance de cette protéine à la surface cellulaire (Fig. III.15 de la thèse). Ce défaut cinétique peut être totalement compensé par une surproduction de YueB (Baptista et al., 2008). L'ensemble des données suggère que la liaison réversible de SPP1 aux WTA glucosylés à l'ancien pôle assure une première fixation et un positionnement favorable de SPP1 à la surface *B. subtilis*, permettant une interaction rapide avec le récepteur de faible abondance YueB.

La localisation des YueB endogènes (Fig. III.15A de la thèse) et d'une protéine fusion fonctionnelle YueB-GFP exprimée sous le contrôle du promoteur natif *yueB* comme seule copie de YueB dans la cellule (Fig. III.15B de la thèse) a montré que le récepteur se concentre principalement aux anciens pôles des bactéries de type sauvage, même si de la fluorescence a également été détectée dans le cylindre des cellules (Fig. III.15B de la thèse). La surproduction de YueB a confirmé sa localisation polaire et a révélé une répartition inégale suivant un schéma en hélice le long de la cellule (Fig. III.15C; III.16 de la thèse). Cette organisation a été trouvée à la fois pour la région cytoplasmique de YueB fusionnée à la GFP et pour la région des récepteurs exposée à la surface cellulaire qui est accessible au marquage par des anticorps (Fig. III.16 de la thèse). La densité supérieure des récepteurs corrèle avec une augmentation marquée de la liaison des phages le long des flancs (Fig. en bas III.13 de la thèse). Nous émettons l'hypothèse que la localisation le long du cylindre cellulaire de la protéine membranaire YueB, dont l'ectodomaine s'étend sur l'ensemble de la paroi cellulaire de *B. subtilis*, est le résultat du mécanisme de croissance de la paroi cellulaire. En effet, l'insertion de nouveaux peptidoglycanes le long des flancs de *B. subtilis* suit un modèle hélicoïdal (Daniel et Errington, 2003; Tiyantont et al., 2006) et une étude récente utilisant la

microscopie à force atomique a montré que le saccule maintient une architecture de type superhélice (Hayhurst et al., 2008). Nous suggérons que l'ectodomaine de grande taille de YueB se situe dans les polymères de la paroi cellulaire et que l'accumulation de YueB en position polaire est facilitée par le faible taux de rotation aux pôles de la bactérie.

YueB pourrait être une partie ou associée à une machine dont les composants T7SS putatifs sont co-codés par l'opéron *yuk* (São-José et al., 2004). La présence de protéines liées à YueB est l'une des caractéristiques qui distingue le T7SS de Firmicutes (type sous-famille VIIb (Abdallah et al., 2007)). La localisation subcellulaire des YueB dans les cellules de *B. subtilis* (fig. III.15, III.16 de la thèse) et celle d'une composante T7SS dans les mycobactéries (Carlsson et al., 2009) suggèrent que cet appareil de sécrétion est préférentiellement situé aux pôles cellulaires, comme d'autres machineries complexes tels que le système de l'absorption d'ADN lors de la transformation (Hahn et al., 2005), les composantes du système de sécrétion de Tat, et des complexes protéiques liés au chimiotactisme (Buist et al., 2006; Meile et al., 2006). La présence effective d'un T7SS dans *B. subtilis* ainsi que le rôle physiologique de YueB restent à élucider. Puisque les autres composants de l'opéron *yuk* ne sont pas essentiels pour l'infection par le bactériophage SPP1 (São José-et al., 2004), nous concluons que SPP1 utilise la région de YueB exposée à la surface des cellules bactériennes pour la fixation, mais que le mécanisme de sécrétion putatif T7SS n'est pas essentiel pour l'entrée de l'ADN du phage dans le cytoplasme bactérien.

Nous avons introduit un ensemble de répétitions *lacO* dans le génome de SPP1 afin de visualiser sa position dans les cellules *B. subtilis* infectées produisant LacI-CFP. Fait intéressant, l'ADN du phage est localisé dans des foyers à proximité des pôles des cellules au début de l'infection (figure III.18 de la thèse), ce qui corrèle avec l'adsorption préférentiellement polaire de SPP1 (Fig. 9). La majorité des foyers d'ADN phagique n'est pas située à la pointe des pôles, mais dans la région de jonction, ce qui suggère que SPP1 pourrait tirer parti des fonctionnalités particulières de cette région de la paroi cellulaire pour faciliter la pénétration à travers la membrane bactérienne pour acheminer son génome vers le cytoplasme bactérien. Un seul foyer, bien individualisé et

concentrant la fluorescence, a été trouvé dans les bactéries infectée à faible i.m. (Fig. III.18B de la thèse). L'augmentation de la fluorescence de chaque foyer de l'ADN de SPP1 au fil du temps suggère que la réplication du génome se produit à une localisation intracellulaire définie par la position de son entrée (Fig. III.17 de la thèse). Cela pourrait impliquer une association initiale de l'ADN du phage à la membrane pour sa réplication comme suggéré précédemment (Burger, 1980). Il est intéressant de noter que le plasmide pHP13 peut aussi se répliquer en cluster dans des foyers situés principalement près des pôles de *B. subtilis* (Wang et al., 2004).

Il a été montré récemment que dans *B. subtilis*, l'efficacité d'infection des phages SPP1 et la réplication du génome de $\phi 29$ sont affectés par des mutations dans les protéines du cytosquelette MreB (Muñoz-Espin et al., 2010). Le rôle précis des MreB pour la réplication de SPP1 n'a pas été établi, et nous avons montré que la réplication de son génome se produit à un seul foyer. En revanche, l'ADN de $\phi 29$ et les composants de la machinerie de réplication de $\phi 29$ sont localisés dans les zones périphériques comme des structures en hélice, topologie qui dépend MreB, menant à la conclusion que cette composante du cytosquelette bactérien organise la réplication de l'ADN du phage $\phi 29$ à la membrane (Muñoz-Espin et al., 2009, 2010). Pour initier la réplication de son ADN, le phage $\phi 29$ utilise une protéine amorce aussi appelée protéine terminale (TP) car elle est covalamment liée à l'extrémité 5' de sa molécule d'ADN double brin linéaire (Salas, 2006) alors que l'ADN du phage SPP1 se réplique d'abord via le mode θ et plus tard via un mode de cercle roulant (Alonso et al., 2006). Ainsi, l'organisation de la réplication de l'ADN viral par les MreB du cytosquelette bactérien dans plusieurs sites périphériques des cellules infectées pourrait être spécifique des phages utilisant une protéine terminale pour répliquer leur ADN. En revanche, le réplisome des phages comme SPP1 et λ reste confiné à une usine de réplication unique (Edgar et al., 2008; Jakutyte et al., 2011). Edgar et al. (Edgar et al., 2008) a montré que différents phages de bactéries Gram-négatives s'adsorbent sélectivement à des pôles de cellule et que coliphage λ cible un certain nombre de composants de la cellule à cette localisation subcellulaire. Le présent

travail montre que le pôle et, éventuellement, la jonction pôle-corps sont également une cible préférentielle pour l'entrée de l'ADN viral à travers l'enveloppe des bactéries Gram-positives. L'assemblage d'un foyer de réplication à proximité de la région polaire d'entrée de l'ADN peut spatialement contraindre le génome du virus pour un fonctionnement optimal de son usine de réplication.

Nous avons montré que l'infection du virus SPP1, la fixation et son entrée dans la bactérie, se produit préférentiellement au niveau ou à proximité de l'ancien pôle des cellules de *B. subtilis* (Fig. 9). Le phage SPP1 est susceptible d'exploiter les caractéristiques particulières des WTA dans cette région pour s'adsorber de façon préférentielle à la bactérie, et d'utiliser par la suite ces régions localement enrichies en protéines YueB pour se fixer irréversiblement à l'hôte. Cette topologie est en corrélation avec la position de l'entrée de l'ADN viral et l'initiation de la réplication qui se produit dans les foyers définis à l'intérieur de la bactérie (Fig. III.17; III.18 de la thèse). Ces résultats soutiennent l'évidence croissante que les phages profitent de l'architecture de la cellule hôte pour assurer une coordination efficace dans l'espace des événements séquentiels survenant lors de l'infection.

Mots-clés: bactériophage SPP1, entrée du virus; ions Ca^{2+} ; potentiel de membrane; bactérie Gram-positif; YueB.

Références:

- Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandebroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., Bitter, W., 2007. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 883-891.
- Alonso, J.C., Tavares, P., Lurz, R., Trautner, T.A., 2006. Bacteriophage SPP1, in: Calendar, R. (Ed.), *The Bacteriophages*, second ed. Oxford University Press, New York, pp. 331-349.
- Archibald, A.R., Coapes, H.E., 1976. Bacteriophage SP50 as a marker for cell wall growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 125, 1195-1206.
- Baptista, C., Santos, M.A., São-José, C., 2008. Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *J. Bacteriol.* 190, 4989-4996.
- Boulanger, P., Letellier, L., 1988. Characterization of ion channels involved in the penetration of phage T4 DNA into *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 263, 9767-9775.
- Boulanger, P., Letellier, L., 1992. Ion channels are likely to be involved in the two steps of phage T5 DNA penetration into *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 267, 3168-3172.
- Buist, G., Ridder, A.N., Kok, J., Kulpers, O.P., 2006. Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria. *Microbiology* 152, 2867-2874.
- Burger, K.J., 1980. Membrane binding of bacteriophage SPP1 DNA. *Mol. Gen. Genet.* 179, 373-376.
- Carlsson, F., Joshi, S.A., Rangell, L., Brown, E.J., 2009. Polar localization of virulence-related Esx-1 secretion in mycobacteria. *PLoS Pathog.* 5, e1000285.
- Clarke-Sturman, A.J., Archibald, A.R., Hancock, I.C., Harwood, C.R., Merad, T., Hobot, J.A., 1989. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: partial conservation of polar wall material and the effect of growth conditions on the pattern of incorporation of new material at the polar caps. *J. Gen. Microbiol.* 135, 657-665.
- Daniel, R.A., Errington, J., 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell.* 113, 767-776.
- Daugelavicius, R., Bamford, J.K., Bamford, D.H., 1997. Changes in host cell energetics in response to bacteriophage PRD1 DNA entry. *J. Bacteriol.* 179, 5203-5210.
- Duckworth, D.H., Winkler, H.H., 1972. Metabolism of T4 bacteriophage ghost-infected cells. II. Do ghosts cause a generalized permeability change? *J. Virol.* 9, 917-922.

Edgar, R., Rokney, A., Feeney, M., Semsey, S., Kessel, M., Goldberg, M.B., Adhya, S., Oppenheim, A.B., 2008. Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol. Microbiol.* 68, 1107-1116.

Formstone, A., Carballido-López, R., Noirot, P., Errington, J., Scheffers, D.-J., 2008. Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 1812-1821.

Gaidelyte, A., Cvirkaite-Krupovic, V., Daugelavicius, R., Bamford, J.K., Bamford, D.H., 2006. The entry mechanism of membrane-containing phage Bam35 infecting *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 188, 5925-5934.

García, L.R., Molineux, I.J., 1996. Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 6921-6929.

Graham, L.L., Beveridge, T.J., 1994. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *J. Bacteriol.* 176, 1413-1421.

Grahn, A.M., Daugelavicius, R., Bamford, D.H., 2002. Sequential model of phage PRD1 DNA delivery: active involvement of the viral membrane. *Mol. Microbiol.* 46, 1199-1209.

Grinius, L., Daugelavicius, R., 1988. Depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane by bacteriophages T4 and lambda: evidence for induction of ion-permeable channels. *Bioelectrochem Bioenerg.* 19, 235-245.

Hahn, J., Maier, B., Haijema, B.J., Sheetz, M., Dubnau, D., 2005. Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* 122, 59-71.

Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K., Foster, S.J., 2008. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14603-14608.

Jakutyte, L., Baptista, C., São-José, C., Daugelavicius, R., Carballido-López, R., Tavares, P., 2011. Bacteriophage infection in rod-shaped gram-positive bacteria: evidence for a preferential polar route for phage SPP1 entry in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193, 4893-4903.

Kirchner, G., Kemper, M.A., Koch, A.L., Doyle, R.J., 1988. Zonal turnover of cell poles of *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139, 645-654.

Labadan, B., Letellier, L., 1981. Membrane potential changes during the first steps of coliphage infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 215-219.

Landry, E.F., Zsigray, R.M., 1980. Effects of calcium on the lytic cycle of *Bacillus subtilis* phage 41c. *J. Gen. Virol.* 51, 125-135.

Letellier, L., Labedan, B., 1984. Involvement of envelope-bound calcium in the transient depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane induced by bacteriophage T4 and T5 adsorption. *J. Bacteriol.* 157, 789-794.

Letellier, L., Plançon, L., Bonhivers, M., Boulanger, P., 1999. Phage DNA transport across membranes. *Res. Microbiol.* 150, 499-505.

Meile, J.-C., Wu, L.J., Ehrlich, S.D., Errington, J., Noirot, P., 2006. Systematic localization of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics* 6, 2135-2146.

Mobley, H.L.T., Koch, A.L., Doyle, R.J., Streips, U.N., 1984. Insertion and fate of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 158, 169-179.

Muñoz-Espín, D., Daniel, R., Kawai, Y., Carballido-López, R., Castilla-Llorente, V., Errington, J., Meijer, W.J.J., Salas, M., 2009. The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13347-13352.

Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Ballesteros-Plaza, D., Carballido-López, R., Salas, M., 2010. Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16548-16553.

Neuhaus, F.C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686-723.

Petit-Glatron, M.F., Grajcar, L., Munz, A., Chambert, R., 1993. The contribution of the cell wall to a transmembrane calcium gradient could play a key role in *Bacillus subtilis* protein secretion. *Mol. Microbiol.* 9, 1097-1106.

Poranen, M.M., Daugelavicius, R., Bamford, D.H., 2002. Common principles in viral entry. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 521-538.

Raspaud, E., Forth, T., São-José, C., Tavares, P., de Frutos, M., 2007. A kinetic analysis of DNA ejection from tailed phages revealing the prerequisite activation energy. *Biophys. J.* 93, 3999-4005.

Salas, M., 2006. Phage ϕ 29 and its relatives, in: Calendar, R. (Ed.), *The Bacteriophages*. Oxford University Press, New York, pp. 315-330.

Santos, M.A., de Lencastre, H., Archer, L.J., 1984. Homology between phages SPP1, 41c, 22a, ρ 15 and SF6 of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Virol.* 65, 2067-2072.

São-José, C., Baptista, C., Santos, M.A., 2004. *Bacillus subtilis* operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1. *J. Bacteriol.* 186, 8337-8346.

São-José, C., Lhuillier, S., Lurz, R., Melki, R., Lepault, J., Santos, M.A., Tavares, P., 2006. The ectodomain of the viral receptor YueB forms a fiber that triggers ejection of bacteriophage SPP1 DNA. *J. Biol. Chem.* 281, 11464-11470.

Sonnenfeld, E.M., Beveridge, T.J., Doyle, R.J., 1985. Discontinuity of charge on cell wall poles of *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.* 31, 875-877.

Steensma, H.Y., Blok, J., 1979. Effect of calcium ions on the infection of *Bacillus subtilis* by bacteriophage SF6. *J. Gen. Virol.* 42, 305-314.

Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z., Walker, S., 2006. Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11033-11038.

Wang, J.D., Rokop, M.E., Barker, M.M., Hanson, N.R., Grossman, A.D., 2004. Multicopy plasmids affect replisome positioning in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 7084-7090.

Winkler, H.H., Duckworth, D.H., 1971. Metabolism of T4 bacteriophage ghost-infected cells: effect of bacteriophage and ghosts on the uptake of carbohydrates in *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 107, 259-267.

Yasbin, R.E., Maino, V.C., Young, F.E., 1976. Bacteriophage resistance in *Bacillus subtilis* 168, W23, and interstrain transformants. *J. Bacteriol.* 125, 1120-1126.

Young, F.E., 1967. Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 2377-2384.