



Compartimentation du cycle viral du bactériophage SPP1 dans le cytoplasme de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis*.

Audrey Labarde

► To cite this version:

Audrey Labarde. Compartimentation du cycle viral du bactériophage SPP1 dans le cytoplasme de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis*.. Virologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS156 . tel-03276299

HAL Id: tel-03276299

<https://theses.hal.science/tel-03276299v1>

Submitted on 2 Jul 2021

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.

Compartimentation du cycle viral du bactériophage SPP1 dans le cytoplasme de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis*.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat : Biochimie et biologie structurale



Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le jeudi 20 juin 2019, par

Audrey LABARDE

Composition du Jury :

Mme Olga SOUTOURINA

Professeure - Université Paris-Sud

Présidente

M. Eric CASCALES

Directeur de Recherche, CNRS - Université Aix-Marseille

Rapporteur

Mme Claire GESLIN

Maître de Conférences, IFREMER - Université Bretagne-Occidentale

Rapporteuse

Mme Nathalie CAMPO

Chargée de recherche, CNRS - Université Toulouse

Examinatrice

Mme Marianne DE PAEPE

Chargée de recherche, INRA - Université Paris-Sud

Examinatrice

M. Paulo TAVARES

Directeur de recherche, CNRS - Université Paris-Sud

Directeur de thèse

" Le rôle de l'infiniment petit dans la nature est infiniment grand. "

Louis Pasteur (1822-1895)

Sommaire

I. Introduction	1
I.1. Les virus dans la biosphère	3
I.2. Les usines virales	5
I.2.1. Les usines virales chez les eucaryotes	5
I.2.2. Les usines virales de réplication du génome chez les bactéries	9
I.2.2.1. Les phages dont le génome est linéaire	10
I.2.2.2. Les phages qui ont deux modes de réplication séquentiels	12
I.2.2.3. Le phage 201Φ2-1	14
I.3. Les virus de bactéries : les bactériophages	16
I.3.1. La classification des bactériophages	17
I.3.2. Les phages caudés	18
I.3.3. Le cycle de multiplication des bactériophages caudés	20
I.3.4. Les bactéries et les prophages	22
I.4. Le bactériophage SPP1, un modèle pour les phages caudés	23
I.4.1. Caractéristiques du bactériophage SPP1	23
I.4.2. Les étapes du cycle viral de SPP1 dans la bactérie <i>B. subtilis</i>	23
I.4.3. La réplication du génome viral de SPP1	27
I.4.3.1. La réplication précoce en mode theta (θ)	29
I.4.3.2. La réplication tardive générant des concatémères	31
I.4.4. L'assemblage de la particule virale de SPP1	34
I.5. La réplication du chromosome bactérien et sa structuration	37
I.5.1. La réplication du chromosome bactérien	37
I.5.2. Les différentes étapes de la réplication de l'ADN de la bactérie <i>B. subtilis</i>	38
I.5.2.1. Initiation	38
I.5.2.2. Elongation	40
I.5.2.3. Terminaison	41
I.5.3. Condensation et structuration de l'ADN répliqué	41
I.6. Les objectifs de la thèse	45
II. Matériel et Méthodes	47
II.1. Le matériel	49
II.1.1. Les milieux	49
II.1.2. Les souches bactériennes	50

II.1.3. Les bactériophages	52
II.1.4. Les plasmides	53
II.1.5. Les amorces	54
II.1.5.1. Amorces utilisées pour le clonage	54
II.1.5.2. Amorces utilisées pour la PCR quantitative	55
II.2. Les méthodes	55
II.2.1. Biologie moléculaire	55
II.2.1.1. Stratégie de clonage	55
II.2.1.1.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	55
II.2.1.1.2. Purification des produits de PCR	56
II.2.1.1.3. Clonage	56
II.2.1.1.4. Transformation d' <i>E. coli</i> et criblage des transformants	56
II.2.1.2. Constructions des souches	56
II.2.1.2.1. Fusion <i>lacI-mcherry</i> , rapportrice de l'ADN viral, insérée dans le locus <i>thrC</i>	57
II.2.1.2.2. Fusions de gènes de SPP1 au gène <i>mcitrine</i> et insertion dans le locus <i>sacA</i>	57
II.2.1.2.3. Fusions de gènes de l'hôte au gène <i>mcfp</i> et insertion dans le locus <i>amyE</i>	57
II.2.1.2.4. Fusion du gène 12 de SPP1 au gène <i>mcfp</i> et insertion dans le locus <i>amyE</i>	58
II.2.1.2.5. Fusions de gènes de l'hôte au gène <i>gfp</i> et insertion dans le locus <i>amyE</i>	58
II.2.1.2.6. Système minimal de réplication <i>in vivo</i>	58
II.2.2. Microbiologie et génétique	59
II.2.2.1. Préparation des bactéries (pré-)compétentes	59
II.2.2.1.1. <i>E. coli</i>	59
II.2.2.1.2. <i>B. subtilis</i>	59
II.2.2.2. Transformations bactériennes	59
II.2.2.2.1. <i>E. coli</i>	59
II.2.2.2.2. <i>B. subtilis</i>	60
II.2.2.3. Transduction dans <i>B. subtilis</i>	60
II.2.2.4. Titration des phages	61
II.2.3. Biochimie	62
II.2.3.1. Purification de l'ADN chromosomique de <i>B. subtilis</i>	62
II.2.3.2. Préparation d'extraits de <i>B. subtilis</i> infectée par SPP1	62

II.2.3.3. Production et purification des intermédiaires d'assemblage de SPP1	62
II.2.3.4. Production et purification de particules virales de SPP1	63
II.2.3.5. Western blot	63
II.2.4. Analyses quantitatives de l'ADN	64
II.2.4.1. Préparation d'extraits d'ADN total et d'ADN protégé de l'action de la DNase de <i>B. subtilis</i> infectée par SPP1	64
II.2.4.2. Purification des extraits d'ADN et quantification par PCR quantitative (qPCR)	65
II.2.4.3. Quantification par Qubit	66
II.2.5. Microscopie de fluorescence	67
II.2.5.1. Observation sur pad d'agarose	67
II.2.5.2. Observation en système microfluidique	68
II.2.5.3. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) des usines de réplication	69
II.2.5.4. Observation de l'infection de bactéries filamenteuses	70
II.2.6. Analyse quantitative des images de microscopie de fluorescence	71
II.2.6.1. Détection et identification des cellules	71
II.2.6.2. Localisation et morphologie des usines de réplication de l'ADN du phage	71
II.2.6.3. Localisation et morphologie des zones d'accumulation de procapsides et de capsides	72
II.2.7. Microscopie électronique	72
II.2.7.1. Préparation des cellules infectées	72
II.2.7.2. Coupe et marquages des cellules infectées	73
II.2.7.3. Conditions d'observation des grilles de cellules immuno-marquées	74
II.2.8. Calcul du coût énergétique de l'infection virale pour la cellule	74
III. Résultats	77
III.1. Réplication de l'ADN viral dans la bactérie infectée par SPP1	79
III.1.1. Quantification de la réplication et de l'encapsidation du génome viral pendant l'infection	79
III.1.2. Coût de l'infection de SPP1 <i>delX110lacO₆₄</i> pour la cellule	85
III.1.3. Localisation de l'ADN viral libre dans la cellule infectée	87
III.1.4. Protéines cellulaires impliquées dans la réplication virale	90
III.1.5. Protéines virales impliquées dans la réplication de l'ADN du phage	93
III.1.5.1. Initiation de la réplication	93
III.1.5.2. Switch du mode de réplication theta au mode sigma	96

III.1.6. Dynamique de l'ADN viral dans la cellule infectée	98
III.2. Assemblage de la particule virale dans la cellule infectée	101
III.2.1. Etude de l'état nucléocapside de la particule virale	102
III.2.2. Etude de l'état procapside pendant l'assemblage viral	111
III.2.3. Organisation ultra-structurale de la bactérie infectée	119
III.3. La déstructuration du chromosome bactérien pendant l'infection virale	122
IV. Discussion	129
IV.1. Fracture énergétique de l'infection phagique	131
IV.2. Les usines de réplication du génome de SPP1	131
IV.3. Structuration du nucléoïde bactérien	134
IV.4. Programme spatial d'assemblage de la particule virale de SPP1	134
IV.5. Comparaison de l'architecture des usines virales	136
IV.5.1. Les virus qui utilisent les membranes présentes chez leur hôte	136
IV.5.2. Les virus qui isolent physiquement la réplication de l'assemblage de la particule virale	137
IV.5.3. Les virus dont le génome est linéaire et qui dépendent des protéines du cytosquelette de l'hôte	137
IV.5.4. Les virus qui forment des structures aux propriétés d'organelles liquides	137
IV.6. Impact de la quantité d'ADN viral sur la lyse cellulaire	138
V. Conclusions et perspectives	141
V.1. La transition de réplication theta-sigma	143
V.2. La structure du chromosome bactérien lors de l'infection virale	144
Bibliographie	145

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNdb	ADN double-brin
ADNsb	ADN simple-brin
<i>amyE</i>	gène codant pour l'enzyme α -amylase de <i>B. subtilis</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ARNsg	ARN guide simple-brin
ATP	Adénosine TriPhosphate
BET	Bromure d'Ethidium
(m)CFP	"(monomeric) Cyan Fluorescent Protein" ou protéine fluorescence bleue (monomérique)
cfu	"colony forming unit"
CRISPR	"Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"
Ct	"Cycle Threshold" ou cycle de seuil
Da	Dalton
DO	Densité Optique
FM1-43FX	"(N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide))"
FM4-64FX	"(N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide))"
FRAP	"Fluorescence Recovery After Photobleaching" ou redistribution de la fluorescence après photoblanchiment
GFP	"Green Fluorescent Protein" ou protéine fluorescente verte
gp	"gene product"
HBsu	"Histone-like DNA-binding protein of <i>B. subtilis</i> "
HPUra	"6-(<i>p</i> -hydroxyphenylazo)uracil"
IPTG	"IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside"
<i>lacA</i>	gène codant pour la β -galactosidase de <i>B. subtilis</i>
LacI	répresseur de l'opéron lactose
<i>lacO</i>	séquence opératrice <i>lacO</i> de l'opéron lactose
LB	"Lysogeny Broth" ou "Luria Broth"
pb	paire de bases
pfu	"plaque forming unit"
PCR	"Polymerase Chain Reaction" ou amplification en chaîne par polymérase
<i>sacA</i>	gène codant pour la saccharose-6-phosphate hydrolase de <i>B. subtilis</i>
SMC	"Structural Maintenance of Chromosomes"
SPP1	"Subtilis Phage Pavia 1"
<i>sus</i>	" <i>supressor sensitive mutant</i> "
<i>tetO</i>	séquence opératrice <i>tetO</i> de l'opéron tétracycline
TetR	répresseur de l'opéron tétracycline
<i>thrC</i>	gène codant pour la thréonine synthase de <i>B. subtilis</i>
TIRF	"Total Internal Reflection Fluorescence microscopy"
TMA	1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene <i>p</i> -toluenesulfonate)
<i>wt</i>	" <i>wild type</i> " ou sauvage

Introduction

I. Introduction

I.1. Les virus dans la biosphère

Les virus sont des agents infectieux qui dépendent d'une cellule hôte pour se multiplier. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires qui détournent les machineries cellulaires à leur avantage pour se répliquer et former des particules virales (virions). Par définition, le terme « virus » regroupe les entités biologiques caractérisées par une phase extracellulaire dans laquelle le génome viral est protégé par une coque protéique. Le virion est métaboliquement inerte. En l'état actuel des connaissances, les virus ne codent pas de ribosomes ni de protéines permettant la synthèse d'énergie (ATP).

Les virus infectent des cellules des 3 domaines du vivant : les bactéries, les archées et les cellules eucaryotes. Tous les organismes cellulaires sont donc susceptibles d'être infectés et ce, par un ou plusieurs virus. A l'inverse, la plupart des virus ont un spectre restreint et n'infectent qu'un seul type de cellule. Les virus sont retrouvés dans l'ensemble des écosystèmes terrestres et aquatiques, de l'environnement le plus favorable au plus hostile (fonds marins, sources chaudes ou glaciers). Ils sont l'entité biologique la plus abondante sur terre. On les retrouve dans des concentrations allant jusqu'à 10^9 particules par millilitre dans l'eau de mer (Bergh *et al*, 1989 ; Suttle 2007), 10^5 particules par millilitre dans le sang humain et 10^7 particules par millilitre dans l'urine (Rascovan *et al*, 2016).

Le génome des virus est plus diversifié que celui des cellules (**Figure 1**). Il peut être composé d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique (ADN ou ARN), sous forme monocaténaire (simple-brin) ou bicaténaire (double-brin), de polarité positive ou négative (pour les génomes à ARN) (**Figure 1**). Le matériel génétique viral est protégé par une coque protéique (capside), éventuellement entourée d'une enveloppe lipidique provenant de membranes de la cellule hôte. Le cycle de multiplication du virus alterne entre une phase de "décapsidation" avec la sortie du génome viral de la capsid et une phase "d'encapsidation" avec la protection du matériel génétique dans la capsid. La décapsidation mène à l'expression du génome viral à l'intérieur de la cellule tandis que l'encapsidation permet la persistance extracellulaire de la capsid ainsi que l'infection de nouvelles cellules hôtes.

La capacité des virus à tuer les cellules exerce une pression majeure sur les populations de leurs hôtes qui meurent ou doivent développer des mécanismes de résistance. Cette pression joue un rôle primordial dans le renouvellement et la régulation des populations dans les différents écosystèmes. Les virus procaryotes, par exemple, sont retrouvés dans le sol, dans l'eau et dans les organismes multicellulaires, notamment dans le tube digestif, où ils participent à la dynamique et à la diversité des populations bactériennes intestinales et la bonne santé du microbiote (Norman *et al*, 2009 ; Rascovan *et al*, 2016). D'un autre côté, les virus sont des agents de transfert horizontal de gènes cellulaires mais

aussi un réservoir majeur de gènes aux fonctions inconnues. Le transfert de cette information génétique apporte un support à l'adaptation et l'évolution des organismes. On retrouve fréquemment des séquences virales dans le génome des cellules. C'est le cas du génome d'*Homo sapiens*, composé d'environ 8 % de séquences transmises par les virus (Jern et Coffin 2008). Ces séquences peuvent apporter des avantages aux cellules. C'est notamment le cas de la protéine Syncytine-1 dans l'organe placentaire. Cette protéine, d'origine rétrovirale et stable dans le génome, est impliquée dans la fusion de cellules d'un tissu appelée syncytiotrophoblaste jouant le rôle de filtre. Ce tissu est essentiel à l'échange de nutriments et de gaz entre le sang de la mère et celui du fœtus. Son absence se traduit par la mort *in utero* des embryons (Dupressoir *et al*, 2009). Le transfert horizontal de gènes par les virus joue aussi un rôle très important dans l'adaptation et l'évolution rapide des procaryotes par l'enrichissement de leur patrimoine génétique. Cela favorise leur survie dans des conditions environnementales sélectives (voir aussi section I.3.4) et joue un rôle dans la dynamique des écosystèmes microbiens (Suttle 2007 ; Krupovic *et al*, 2011). Ainsi, les virus n'ont pas qu'un rôle de "tueurs de cellules", ils contribuent aussi de manière significative au maintien de la diversité des communautés cellulaires.

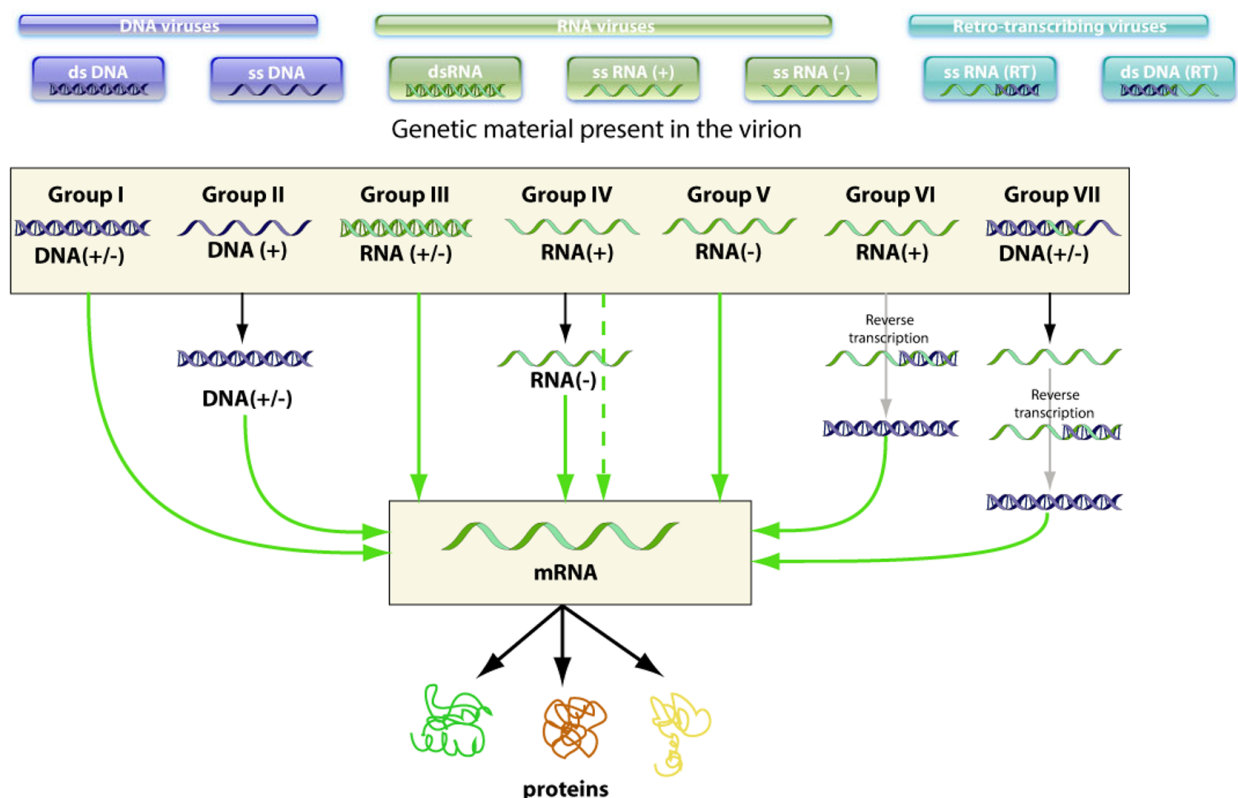


Figure 1 : Classification de Baltimore (extrait de ViralZone et adapté de Baltimore 1971). Les virus sont classés selon leur génome, le type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et le mode de réplication de leur acide nucléique. Légende : ADN en bleu et ARN en vert.

Malgré ce rôle primordial des virus sur la dynamique des populations, l'expression du génome viral au niveau de la cellule individuelle est néfaste car elle affecte l'homéostasie de la cellule hôte pour soutenir la survie du virus. Lorsque le cycle lytique est engagé, le virus détourne à son avantage de nombreuses machines cellulaires pour permettre sa multiplication efficace. Ceci conduit à une transformation majeure de la cellule hôte. La cytologie et la dynamique cellulaire de l'infection virale ont été bien étudiées dans le cas de plusieurs virus eucaryotes mais elles sont beaucoup moins connues dans le cas des procaryotes. L'étude de la biologie cellulaire de l'infection de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis* par le virus bactérien (bactériophage or phage) lytique SPP1 est l'objectif de cette thèse.

I.2. Les usines virales

I.2.1. Les usines virales chez les eucaryotes

La réplication du génome et l'assemblage de nombreux virus eucaryotes se déroulent dans des compartiments intracellulaires spécialisés nommés usines virales, permettant d'augmenter l'efficacité des étapes essentielles à leur multiplication. En effet, les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires dépendants des fonctions de la cellule pour se multiplier. Les usines virales, formées uniquement pendant l'infection, concentrent les protéines et les acides nucléiques viraux mais également les facteurs cellulaires nécessaires aux différentes étapes du cycle viral.

Les usines virales sont à différencier d'autres structures formées à des temps tardifs de l'infection. De nombreux virus induisent la formation d'inclusions cytoplasmiques, généralement par l'agrégation de protéines structurales ou/et de nucléocapsides (Novoa *et al*, 2005). Ces agrégats s'accumulent dans des corps d'inclusion. Au contraire, l'usine virale est une structure fonctionnelle qui se forme rapidement après l'infection induisant des changements dans la composition et l'organisation des compartiments cellulaires. Des analyses ultrastructurales montrent que certaines usines occupent de grandes régions dans les cellules infectées tandis que d'autres sont confinées dans des zones plus petites (Novoa *et al*, 2005).

La localisation et la nature des usines virales sont diverses (**Figure 2**). Elles dépendent du génome viral (ADN ou ARN) et du mode de réplication du virus. Pour un certain nombre de virus, la formation de ces usines consiste en un foyer périnucléaire ou cytoplasmique. Les protéines de l'hôte et les organelles sont exclues de ce foyer tandis que certaines organelles cellulaires spécifiques sont recrutées conduisant à l'apparition d'une nouvelle structure unique. La formation de ces usines virales implique un nombre complexe d'interactions et d'événements de signalisation entre certains facteurs cellulaires et viraux. Les mitochondries, la membrane cytoplasmique et des composants du cytosquelette participent fréquemment à leur formation.

Les virus utilisent des stratégies différentes pour créer ces macrostructures. Certains utilisent des structures déjà présentes dans la cellule, d'autres vont créer de nouvelles structures qui seront dédiées à la réplication du génome ou à l'assemblage des virions.

Les premières usines virales caractérisées sont celles de gros virus à ADN double-brin (ADNdb) nommées NCDLV pour "NucleoCytoplasmic Large DNA Viruses". Ils incluent notamment les Poxvirus, les Iridovirus et les Asfarvirus (**Figure 2**). Ces virus prennent avantage des mécanismes de défense cellulaires de l'hôte comme les agrésomes. Ils détournent leur voie d'assemblage pour établir des usines virales et promouvoir leur réplication. Ces usines s'assemblent à proximité ou dans le centre organisateur de microtubule (MTOC) et elles dépendent de la dynamique du réseau des microtubules (Mallardo *et al*, 2001). Elles redistribuent également les filaments de vimentine pour former une structure en forme de cage (**Figure 2A**) et recrutent les mitochondries (**Figure 2B**), les chaperonnes et les ribosomes (Risco *et al*, 2002). Le Poxvirus a la caractéristique particulière de se répliquer exclusivement dans le cytoplasme contrairement aux virus Iridovirus et Asfarvirus (formant aussi des usines du type agrésomes) dont la réplication est initiée dans le noyau avant de se poursuivre au sein d'usines virales cytoplasmiques (**Figure 2C**).

Les usines virales de certains virus à ADNdb sont exclusivement cytoplasmiques ou exclusivement nucléaires. Comme pour le Poxvirus, les Mimivirus (virus géants à ADN qui infectent les amibes) ont un cycle viral exclusivement cytoplasmique. Dès l'entrée du virus dans la cellule et la sortie du génome dans le cytoplasme, la réplication commence dans une structure menant à la formation d'une usine virale. La synthèse d'ARN est initiée dans cette usine virale puis les ARN viraux sont retrouvés dans une région adjacente à cette structure (Mutsafi *et al*, 2010).

A l'inverse, les Herpèsvirus qui infectent les cellules animales ont un cycle viral strictement nucléaire jusqu'à l'assemblage de la nucléocapside virale (**Figure 2D**). Leur réplication requiert la construction de plusieurs usines virales dans le noyau avec en particulier une pour la réplication et une autre pour l'assemblage des nucléocapsides.

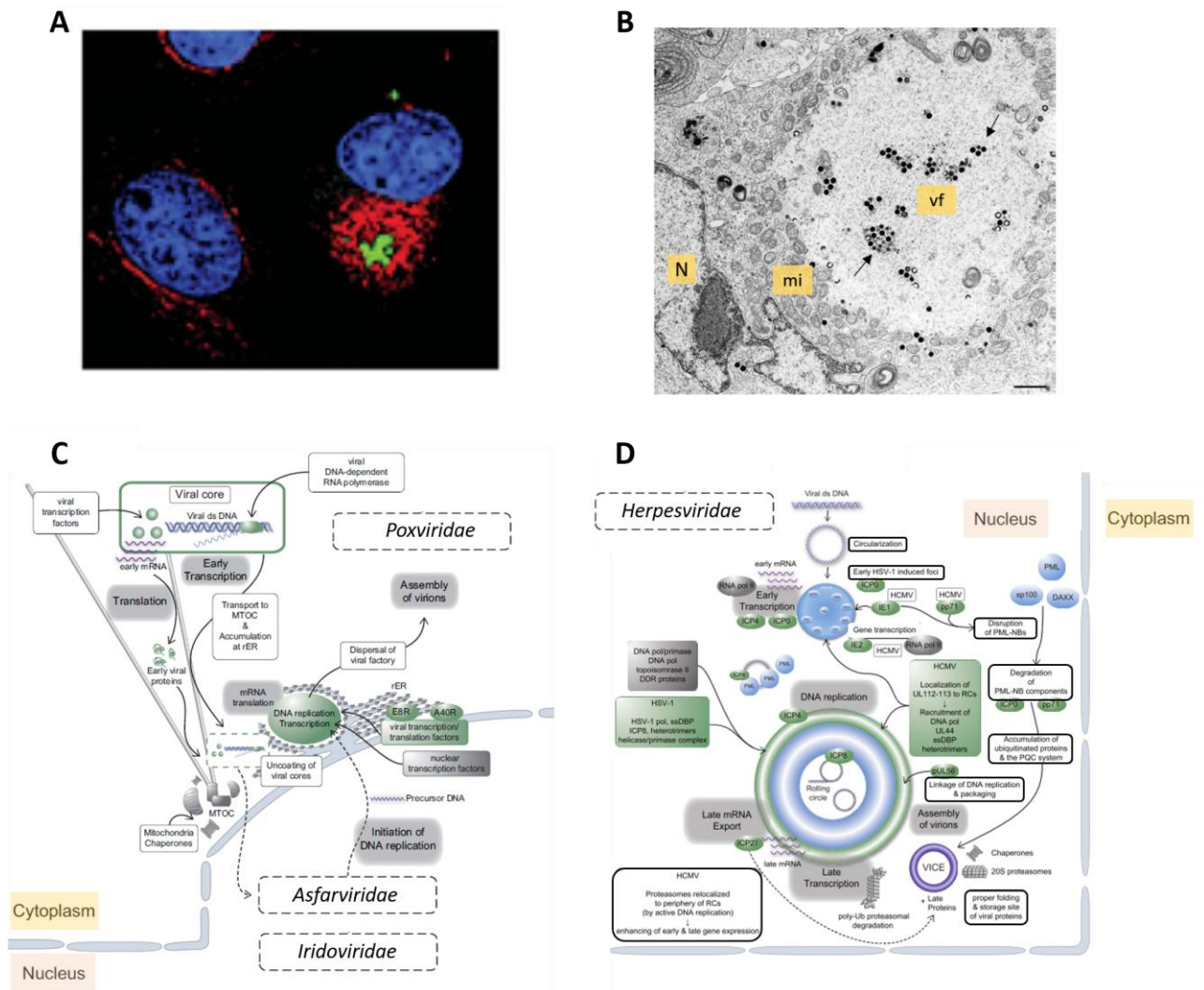


Figure 2 : Usines des virus à ADNdb (Asfarvirus, Iridovirus, Poxvirus et Herpèsvirus). (A) Microscopie confocale montrant les usines de "l'African Swine Fever Virus" (ASFV) entourées d'une cage de vimentine (en rouge) qui renferme des protéines virales (en vert). Le noyau est marqué avec le DAPI (en bleu). **(B)** Microscopie électronique à transmission montrant l'ultrastructure des usines pour un virus de la famille des Iridovirus. De nombreuses mitochondries (mi) s'accumulent autour de l'usine (vf) où les particules virales commencent à être visibles (flèches noires). N : noyau. L'échelle représente 1 µm. **(C)** Schéma des compartiments de réplication des virus Asfarvirus, Iridovirus et Poxvirus indiquant la localisation des usines virales dans le noyau et dans le cytoplasme. **(D)** Schéma des compartiments de réplication des virus Herpèsvirus indiquant leur localisation dans le noyau. **(A)** et **(B)** Novoa *et al*, 2005 ; **(C)** et **(D)** Schmid *et al*, 2014.

Dans le cas des virus à ARN, on distingue les virus dont le génome est un ARN de polarité positive (+), c'est-à-dire de même polarité que les ARN messagers, et ceux dont l'ARN est de polarité négative (-), de polarité complémentaire aux ARN messagers. Ces virus à ARN, possédant des stratégies de réplication différentes (**Figure 1**, groupes III à VI dans la classification de Baltimore), forment des usines virales dont la localisation et la nature sont diverses. Dans la cas des virus à ARN (+), les usines virales sont généralement associées à des réarrangements de membranes de différents types d'organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, Golgi, endosomes) menant à la formation de vésicules avec

une membrane simple ou une membrane double (Risco *et al*, 2014). Ces vésicules semblent restées connectées au cytoplasme par des canaux permettant l'échange de nucléotides et d'ARNs.

Pour les virus à ARN (-), les usines virales sont des inclusions le plus souvent cytoplasmiques sans membrane. Le cas le plus connu est celui du virus de la rage dont les inclusions, appelées corps de Negri, ont été décrites en 1903 par Aldechi Negri (Negri 1903) puis étudiées plus finement dans les années 2000 (Lahaye *et al*, 2009 ; Paul & Bartenschlager, 2015). Ces inclusions cytoplasmiques sont des usines virales qui abritent la synthèse des ARNs viraux et concentrent les protéines virales du complexe polymérase pour faciliter la réplication et la transcription du génome du virus. Elles sont assez peu dynamiques mais subissent des événements de fusion pouvant expliquer l'augmentation de leur taille au cours de l'infection (Nikolic *et al*, 2017). Des événements d'éjection de ribonucléoprotéines des corps de Negri sont aussi observés. Les ribonucléoprotéines sont transportées par le réseau de microtubules. Ces usines virales primaires vont soit atteindre la membrane plasmique et bourgeonner conduisant à la formation et au relargage de particules virales infectieuses, soit former des nouvelles usines virales dites secondaires de taille intermédiaire (**Figure 3**). Ces usines virales présentent des propriétés d'organelles liquides et sont formées dans le cytoplasme par séparation de phase liquide : elles sont sphériques, sans membrane, sont sensibles au choc osmotique et se déforment devant une barrière physique. La nature liquide des usines virales peut être généralisée à d'autres virus à ARN (-) (Alenquer *et al*, 2019, Heinrich *et al*, 2018).

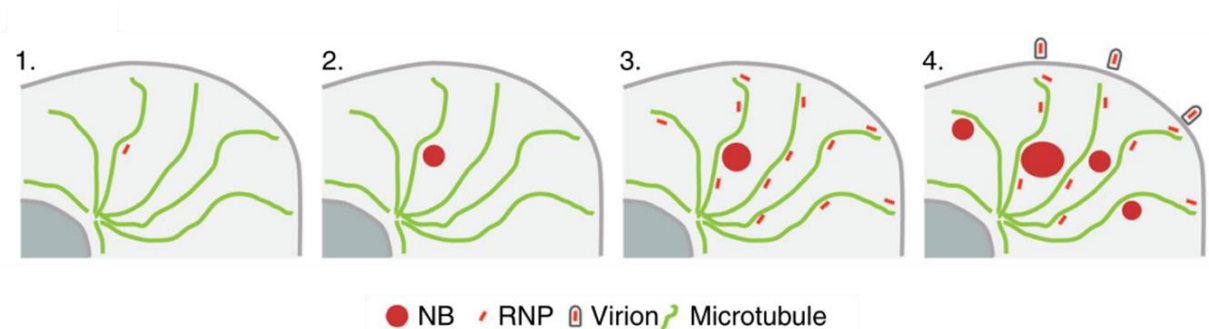


Figure 3 : Modèle pour la dynamique des corps de Negri dans des cellules infectées par le virus de la rage (Nikolic *et al*, 2017). **(1)** et **(2)** Le corps de Negri initial se forme autour de la première nucléocapside entrée. **(3)** Les ribonucléoprotéines nouvellement assemblées sont éjectées du corps de Negri par un processus indépendant du réseau de microtubules. Par contre, leur transport se fait *via* le réseau des microtubules. **(4)** Ces ribonucléoprotéines peuvent soit atteindre la membrane au niveau de site de bourgeonnement et donner naissance à de nouvelles particules virales soit former de nouvelles usines virales dites secondaires conduisant à des corps de Negri de taille intermédiaire. Légende : NB : Corps de Negri, RNP : RiboNucléoProtéine constituée de la nucléocapside, de l'ARN polymérase L et de son co-facteur la phosphoprotéine P.

I.2.2. Les usines virales de réplication du génome chez les bactéries

Dans le cas des procaryotes, l'absence de compartiments membranaires intracellulaires (**Figure 4**) pose la question de l'existence de compartimentation pour les étapes de réplication de l'ADN et d'assemblage des particules virales lors de l'infection par les virus bactériens ou d'archées.

Dans les cellules procaryotes, il a été montré que les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN bactérien ou de plasmides se localisaient dans des régions particulières dans le cytoplasme de la bactérie, supportant l'existence de compartiments destinés à la réplication (Lemon & Grossman, 1998 ; Gordon *et al*, 1997 ; Wang *et al*, 2004 ; Yao *et al*, 2007). Dès 1963, François Jacob suggérait que les membranes des bactéries jouaient un rôle essentiel dans la réplication des génomes des procaryotes (Jacob & Brenner, 1963).

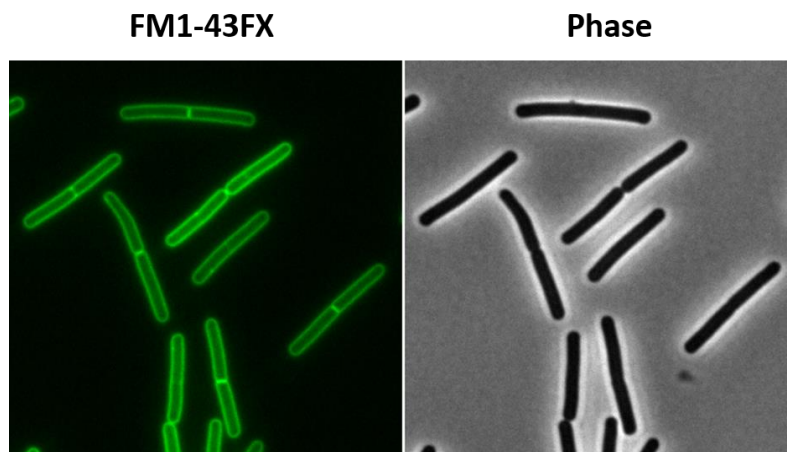


Figure 4 : Observation au microscope de cellules de la bactérie Gram-positive *B. subtilis*. Le contour membranaire est visualisé avec le marqueur membranaire FM1-43FX.

Chez les bactériophages, on peut distinguer plusieurs modes de réplication de l'ADN viral qui peuvent influencer le positionnement et l'organisation de la machinerie de réplication dans la bactérie:

- Les phages dont le génome est linéaire. Ils utilisent une protéine spécialisée TP (Terminal Protein) qui se lie covalamment à des séquences répétées présentes de chaque côté de l'ADN et recrute les protéines impliquées dans la réplication (exemples : phage Φ 29 de *B. subtilis* et phage PRD1 d'*E. coli*).
- Les phages dont l'ADN se circularise dès leur entrée dans le cytoplasme de la bactérie et qui ont deux modes de réplication successifs du génome (exemples : phage SPP1 de *B. subtilis* et cycle lytique du phage λ de *E. coli*).
- Les phages tempérés. Ils s'intègrent le plus fréquemment dans le chromosome de la bactérie sous forme de prophages (voir aussi la section I.3.3). Ils vont ainsi se répliquer avec le chromosome de la bactérie devenue lysogène (exemples : cycle lysogénique des phages SP β et Φ 105 de *B. subtilis* et des phages λ et P22 d'*E. coli*). En conditions de stress, le prophage peut être excisé et entrer en cycle lytique. Il change alors de mode de réplication qui n'est plus coordonné avec le cycle cellulaire

bactérien et ils utilisent dans la plupart des cas les deux modes de réplication successifs retrouvés dans les phages lytiques.

I.2.2.1. Les phages dont le génome est linéaire

Les phages avec un génome linéaire ont les extrémités de leur ADN protégées par une protéine terminale appelée TP. Elle est liée de façon covalente aux extrémités 5' de la molécule d'ADNdb linéaire qui se caractérise par la présence de séquences répétées inversées (Salas, 1991). Ces régions sont les origines de réplication de l'ADNdb, la TP jouant notamment le rôle d'amorce pour l'initiation de la réplication (« protein-primed DNA réplication ») (Salas, 1991 ; Meijer *et al*, 2001). Cette stratégie est aussi utilisée par certains virus eucaryotes comme les Adenovirus (de Jong *et al*, 2013) et les virus d'archées (Bamford *et al*, 2005 ; Peng *et al*, 2007). Des plasmides et des chromosomes linéaires avec des protéines TP à leurs extrémités sont aussi retrouvés dans des bactéries de plusieurs espèces de *Streptomyces* (Yang *et al*, 2002). Tous ces réplicons utilisent fort probablement un mécanisme de « protein-primed DNA réplication » commun pour l'initiation de leur réplication.

Le phage lytique $\Phi 29$ qui infecte *B. subtilis* est un système modèle pour ce mode de réplication. La protéine TP de $\Phi 29$ (p3) est codée par le gène 3. Lors de l'entrée dans la bactérie hôte, l'ADN phagique se lie au nucléoïde bactérien *via* les protéines TP associées à ses deux extrémités (Muñoz-Espín *et al*, 2010). Puis, la protéine « histone-like » p6 de $\Phi 29$ se lierait aux extrémités du complexe ADN-TP de $\Phi 29$ pour ouvrir les brins d'ADN, facilitant l'initiation de la réplication (Blanco *et al*, 1986). Ceci favorise l'interaction des hétérodimères de l'ADN polymérase (p2) aussi associée à la TP virale (Blanco *et al*, 1987) avec la TP associée aux deux extrémités de l'ADN viral pour le démarrage de la réplication de l'ADN (González-Huici *et al*, 2000 ; Holguera *et al*, 2012). Les produits de la réplication sont des molécules linéaires avec des TP aux extrémités qui vont servir de matrice pour de nouveaux cycles de réplication du génome de $\Phi 29$ (Meijer *et al*, 2001). La protéine p6, qui est très abondante dans les bactéries infectées, colocalise avec l'ADN viral et un rôle dans sa compaction a été proposé (Holguera *et al*, 2012).

Suite à une interaction initiale avec le nucléoïde bactérien, l'ADN de $\Phi 29$ et ses protéines de réplication acquièrent une localisation périphérique dans le cytoplasme. Cette localisation dépend des protéines du cytosquelette, et en particulier de MreB, requises pour une réplication virale efficace (Muñoz-Espín *et al*, 2009). Contrairement à *E. coli* qui n'a qu'un seul gène *mreB*, les bactéries Gram-positives ont plusieurs homologues de cette protéine. *B. subtilis* code pour 3 isoformes de MreB (Abhayawardhane & Stewart, 1995) : MreB, MreBH (homologues de MreB) et Mbl (MreB-like). Des cellules défectives pour l'une des protéines MreB infectées par les phages $\Phi 29$ (*B. subtilis*) ou PRD1 (*E. coli*) montrent que la réplication virale est très affectée (**Figure 5A**). La protéine membranaire p17.1 (Serna-Rico *et al*,

2002) interagit directement avec MreB et ce complexe colocalise avec l'ADN polymérase virale p2 et l'ADN de $\Phi 29$ (**Figure 5B**). Cette organisation cellulaire observée aux temps intermédiaires d'infection est perdue dans un mutant de délétion *mreB* indiquant que le cytosquelette bactérien joue un rôle dans la structuration spatiale de la réplication de $\Phi 29$ (Muñoz-Espín *et al*, 2009). L'ancrage à la membrane de la machinerie de réplication peut aussi être lié à la fonction de la protéine p1 dont l'absence réduit significativement la quantité d'ADN répliqué dans la cellule à 37°C (Bravo & Salas, 1997). Cette protéine peut former de longs filaments et elle interagit *in vivo* avec la membrane de la bactérie (Serrano-Heras *et al*, 2003). A des temps tardifs de l'infection, il a été proposé que l'ADN de $\Phi 29$ se (re-)localise avec le nucléoïde bactérien (Holguera *et al*, 2012). Il est probable que cette organisation spatiale de la réplication du génome viral, dépendante du cytosquelette bactérien, soit utilisée par d'autres phages au génome linéaire avec une TP comme PRD1 (**Figure 5A**) (Muñoz-Espín *et al*, 2009).

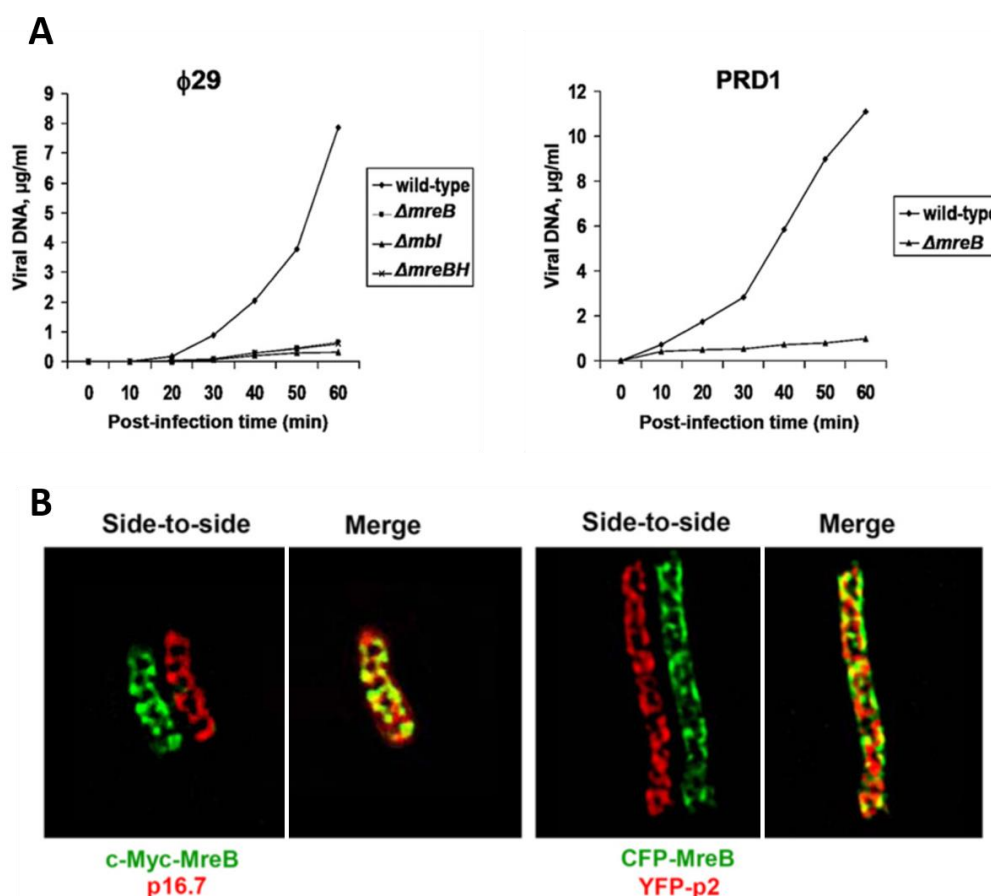


Figure 5 : (A) Dépendance de la réplication virale des phages $\Phi 29$ et PRD1 vis-à-vis du cytosquelette bactérien (Muñoz-Espín *et al*, 2009). La concentration intracellulaire de l'ADN viral des phages $\Phi 29$ et PRD1 a été quantifiée par PCR quantitative à différents temps post-infection dans la souche sauvage et dans les mutants *mreB* (*B. subtilis* pour le phage $\Phi 29$ et *E. coli* pour le phage PRD1). (B) Colocalisation de MreB avec les protéines p16.7 et p2 dans des cellules infectées par le phage $\Phi 29$. Les cellules ont été infectées par le phage $\Phi 29$ à une multiplicité d'infection de 5 et observées par immuno-fluorescence à 20 minutes post-infection (gauche) ou 40 minutes post-infection (droite).

I.2.2.2. Les phages qui ont deux modes de réplication séquentiels

Dans la majorité des cas, les bactériophages synthétisent leur ADN par deux modes séquentiels de réplication. Après l'éjection du génome dans la cellule (infection) ou leur excision du chromosome bactérien (induction de phages tempérés, voir section I.3.3), l'ADN viral linéaire se recircularise soit par recombinaison homologue au niveau de ses extrémités redondantes soit par hybridation d'extrémités cohésives (séquences *cos*). Un premier mode de réplication (theta) de la molécule d'ADN circulaire conduit à l'accumulation de copies du génome sous forme de cercles. Puis, un switch de réplication vers le mode sigma conduit à la réplication par cercle roulant. Elle mène à la synthèse de concatémères du génome qui sont le substrat pour l'encapsidation dans les particules virales. Des concatémères peuvent être aussi générés par réplication couplée à la recombinaison comme dans le cas du bactériophage T4 (Kreuzer, 2000). Les mécanismes de réplication theta et sigma sont détaillés dans la section I.4.3 pour le bactériophage SPP1.

La première usine virale caractérisée avec une telle stratégie de réplication de son génome viral est celle du phage tempéré λ qui infecte la bactérie Gram-négative *E. coli*. Juste après l'infection, le génome du phage va préférentiellement se localiser proche des pôles de la cellule et y rester pendant sa réplication. Ceci corrèle avec la position de fixation du virus à l'extérieur de la bactérie suggérant que le point d'éjection de l'ADN du phage va déterminer sa localisation dans la cellule (**Figure 6**) (Edgar *et al*, 2008). La taille du foyer augmente au fur et à mesure du temps. Par contre, dans le cas où le génome du phage est intégré dans le génome de la bactérie au locus *att λ* , deux petits foyers apparaissent au milieu de la cellule correspondant à la localisation du nucléoïde bactérien (Edgar *et al*, 2008).

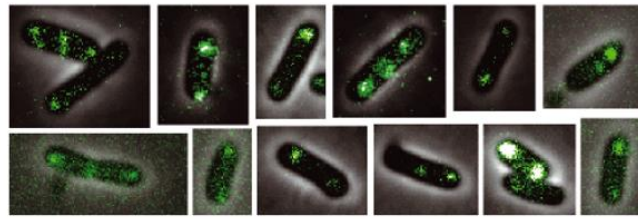
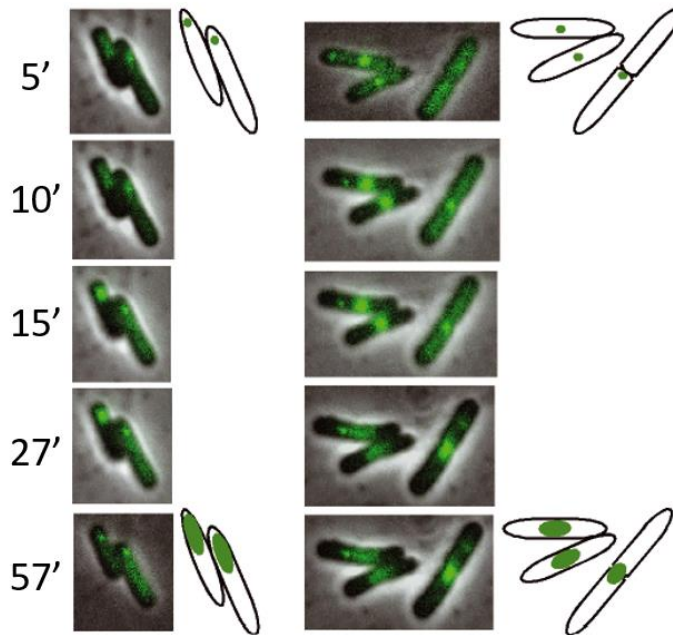
A**B**

Figure 6 : Localisation de l'ADN du phage λ pendant le cycle lytique (Edgar *et al*, 2008). Pour suivre l'ADN du phage λ dans la cellule, il a été utilisé un système rapporteur *LacI/lacO* dans lequel 64 répétitions de la séquence *lacO* ont été insérées dans le génome du phage et la fusion *lacI-gfp* a été insérée dans le chromosome de la bactérie. **(A)** Galerie de cellules infectées par le phage λ . **(B)** Images (time-lapse) prises à 5, 10, 15, 27 et 57 minutes post-infection. Localisation de la fluorescence de LacI-GFP après l'éjection de l'ADN du phage λ aux pôles (gauche) ou au centre (droite) de la cellule.

Une localisation de l'ADN phagique rappelant celle du phage λ a été retrouvée pour le phage lytique SPP1 (Jakutyte *et al*, 2011). La particule virale de SPP1 se fixe préférentiellement proche des pôles de la cellule lors de son interaction avec l'enveloppe de *B. subtilis*. Ceci est attribué à l'enrichissement du récepteur membranaire YueB aux pôles de la bactérie. Après éjection de l'ADN du phage dans le cytoplasme, un foyer d'ADN phagique apparaît dans la cellule et il augmente en taille au cours de l'infection (**Figures 7A et 7B**) (Jakutyte *et al*, 2011). A des temps tardifs, ce foyer va se localiser le plus fréquemment au 2/3 de la cellule (**Figures 7C et 7D**) (Jakutyte *et al*, 2011).

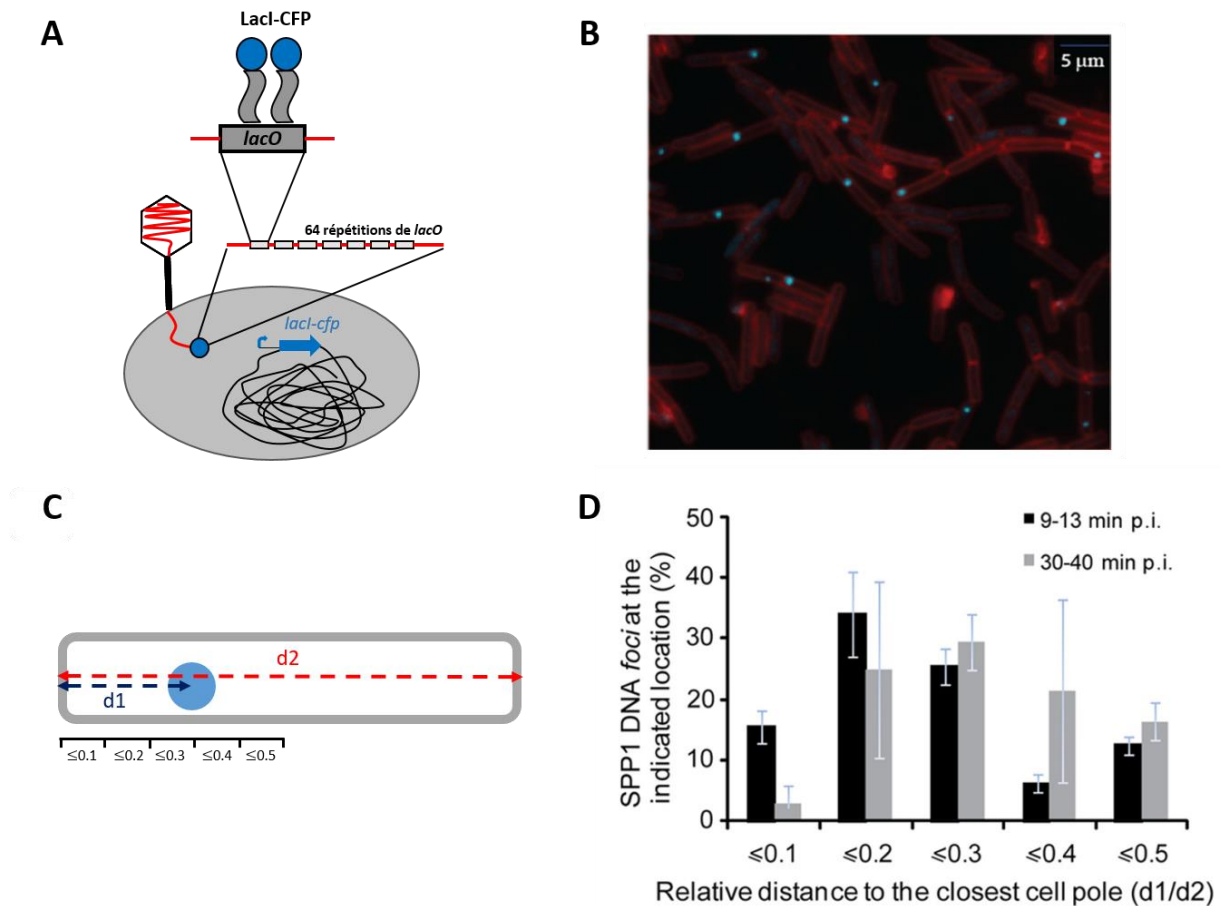


Figure 7 : Localisation de l'ADN du phage SPP1 dans des cellules infectées (Jakutyte *et al*, 2011). **(A)** Système rapporteur dans lequel 64 répétitions de la séquence *lacO*₆₄ ont été insérées dans le génome de SPP1 et la fusion *lacI-cfp* dans le locus *thrC* de la bactérie. **(B)** Cellules produisant la protéine LacI-CFP (cyan) infectées par le phage SPP1~~delX110~~*lacO*₆₄ à une multiplicité d'infection de 3 et observées à des temps tardifs (entre 30 et 40 minutes post-infection). Le contour membranaire est visualisé avec le marqueur membranaire FM4-64FX (rouge). **(C)** Mesure de la distance relative du foyer d'ADN de SPP1 au pôle cellulaire le plus proche. **(D)** Pourcentage de foyers d'ADN à la distance relative indiquée ($d1/d2$) (voir schéma en C) du pôle cellulaire le plus proche dans la bactérie infectée à des temps précoces (9-13 minutes post-infection) et tardifs (30-40 minutes post-infection) observés par microscopie de fluorescence ($n=3$).

1.2.2.3. Le phage 201Φ2-1

Le jumbo myophage lytique 201Φ2-1, qui infecte la bactérie Gram-négative *Pseudomonas chlororaphis*, a un des plus grands génomes phagiques connus (316 kpb) (Yuan & Gao, 2017, Thomas *et al*, 2009). Il code pour la protéine tubuline-like (PhuZ : **Phage Tubulin** /FtsZ). PhuZ s'assemble pour former des filaments dynamiques pendant l'infection qui vont centrer l'ADN du phage dans la cellule (**Figures 8A et 8B**) (Kraemer *et al*, 2012). En revanche, dans un mutant GFP-PhuZD190A dont la mutation dominante négative rend statique les filaments PhuZ, l'ADN de 201Φ2-1 se localise préférentiellement au quart de la cellule (**Figures 8C et 8D**). La partie C-terminale de la protéine PhuZ est conservée parmi un certain nombre de tubulines de phages y compris celles de *Clostridium*

suggérant que ce mécanisme n'est pas uniquement restreint au phage de *Pseudomonas* (Kraemer *et al*, 2012).

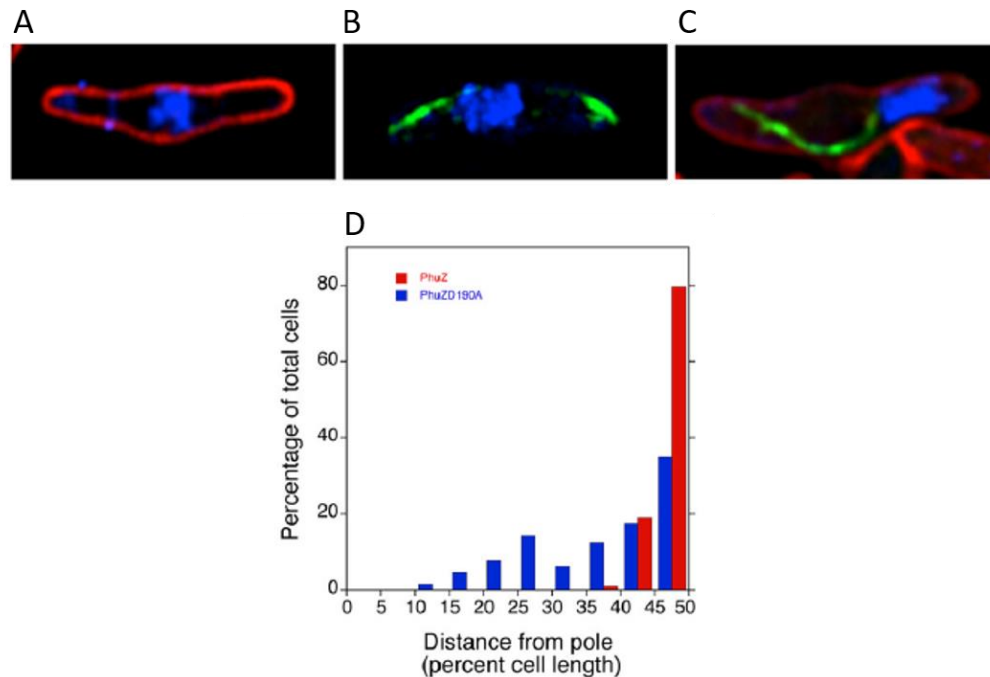


Figure 8 : PhuZ positionne l'ADN viral au centre de la cellule hôte infectée par le phage 201Φ2-1 (Kraemer *et al*, 2012). **(A)** Cellule infectée marquée avec le marqueur membranaire FM4-64 (rouge) et du DAPI (bleu) à 90 minutes post-infection montrant une grande quantité d'ADN dans le centre de la cellule. **(B)** Cellule infectée montrant des filaments GFP-FhuZ de part et d'autre de l'ADN viral marqué au DAPI. **(C)** Cellule infectée produisant la protéine mutante GFP-PhuZD190A à 90 minutes post-infection. Dans ce cas, le nucléoïde du phage se localise dans le pôle de la cellule. **(D)** Histogramme montrant le pourcentage de cellules en fonction de la distance au pôle du nucléoïde viral dans la souche produisant GFP-FhuZ (rouge) ou produisant GFP-PhuZD190A (bleu).

Des études de protéomique de cellules infectées par le phage 201Φ2-1 ont mis en évidence qu'une protéine phagique, gp105, était très fortement produite dès le début de l'infection. Elle se localise dans les cellules infectées autour du nucléoïde viral en l'emprisonnant dans une cage. Les protéines virales et cellulaires nécessaires à la synthèse de nouvelles molécules d'ADN sont retrouvées dans cette structure apparentée à un noyau, délimitée par une coque protéique. Les partenaires cellulaires impliqués dans la voie d'assemblage du virion sont quant à eux exclus de cette cage, se localisant à l'extérieur (**Figure 9**) (Chaikeeratisak *et al*, 2017). La cryotomographie électronique permet de révéler le compartiment de réplication du génome. Des particules virales pour certaines vides (probablement des procapsides en attente d'encapsidation du génome) et pour d'autres pleines (ayant encapsidé de l'ADN) sont retrouvées au contact de sa coque protéique. Des virions matures prêts à infecter de nouvelles cellules sont aussi visibles dans le cytoplasme bactérien (**Figure 9B**). C'est le premier modèle bactérien dans lequel les étapes de réplication de l'ADN du phage et d'assemblage de la particule virale

sont complètement séparées faisant intervenir une structure protéique qui délimite spatialement ces deux étapes. Le compartiment de réplication peut ici être comparé au noyau d'une cellule eucaryote.

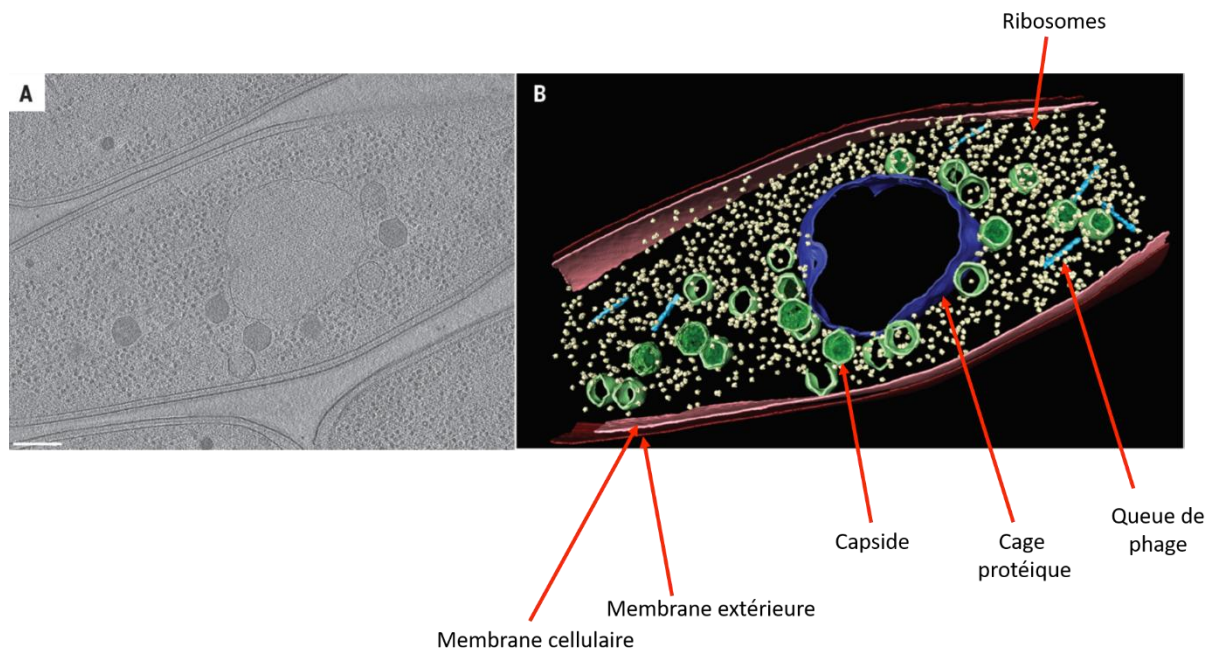


Figure 9 : Cryotomographie électronique des compartiments générés pendant l'infection de *P. chlororaphis* par le phage 201Φ2-1 (Chaikerasitak *et al*, 2017). **(A)** Tomogramme d'une cryo-section de cellules infectées à 60 minutes post-infection. Le compartiment de réplication du génome viral est au centre de la structure. Les capsides virales sont identifiables par leur contour icosaédrique et celles contenant de l'ADN par leur contenu gris foncé. L'échelle représente 200 nm. **(B)** Segmentation du tomogramme de **(A)** montrant la cage protéique (en bleu foncé), les capsides (en vert), la membrane cytoplasmique (en rose), la membrane externe (en rouge), les queues de phage (en bleu clair) et les ribosomes (en jaune). Certaines capsides en contact avec le compartiment de réplication du génome peuvent être en cours d'encapsulation du génome viral.

Ces études pionnières sur la restructuration de l'espace cytoplasmique lors de l'infection des bactéries mettent en avant le potentiel des bactériophages pour étudier la biologie cellulaire bactérienne et comment la manipuler.

I.3. Les virus de bactéries : les bactériophages

Mis en évidence à partir d'un filtrat d'eau du Gange ayant une activité bactéricide contre la bactérie *Vibrio cholerae* en 1896 par Ernest Hanbury Hankin (Hankin 1896) puis décrits comme "virus ultra-microscopiques" en 1915 par Frederick Twort (Twort, 1914), l'existence des virus bactériens a clairement été démontrée en 1917 par Félix d'Hérelle (d'Hérelle 1917). Il les nomma "bactériophages" (mangeurs de bactéries) en établissant leur potentiel en tant qu'agents antibactériens et fit ainsi émerger le concept de virus bactériens. Les bactériophages (ou phages) constituent l'entité biologique la plus répandue et la plus diversifiée génétiquement sur Terre. Présents dans l'ensemble de la biosphère, leur nombre est estimé à 10^{31} sur la planète ce qui correspond à un nombre 2 fois plus élevé

que celui des bactéries estimées à $4-6.10^{30}$ (Whitman, Coleman et Wiebe 1998). Ils jouent un rôle environnemental essentiel, notamment en régulant la prolifération des populations bactériennes mais également en contribuant à l'évolution génétique de nombreux micro-organismes comme vecteurs du transfert horizontal de gènes. Leur étude a contribué à la compréhension de la biologie moléculaire et à son essor. Aujourd'hui encore, ils sont utilisés comme outils en tant que vecteurs de transfert de gènes horizontaux, de sources de diagnostic ou de nouveaux agents thérapeutiques (phagothérapie).

I.3.1. La classification des bactériophages

Constituant le plus grand groupe viral existant dans la nature, les bactériophages présentent des morphologies diverses. Ils peuvent être caudés, cubiques (ou polyédraux), pléomorphiques ou filamenteux (Ackermann, 2003). La classification des phages a débuté en 1967 (Bradley, 1967). Elle définissait au départ seulement 6 morphotypes (de A à F) basés sur la nature de l'acide nucléique et sur la morphologie du virion (étoiles noires dans la **Figure 10**). Aujourd'hui, la classification des bactériophages selon l'ICTV ("International Committee on Taxonomy of Viruses") inclue un ordre, les *Caudovirales* (phages caudés), et 7 autres familles (Tectiviridae, Corticoviridae, Cystoviridae, Microviridae, Leviviridae, Plasmaviridae et Inoviridae) qui sont toutes de petites tailles et pour l'une d'entre elles, n'a qu'un seul membre (Plasmaviridae) (**Figure 10**) (Pietila *et al*, 2014). Ils infectent les membres de 179 genres bactériens, principalement les membres des Firmicutes et des protéobactéries.

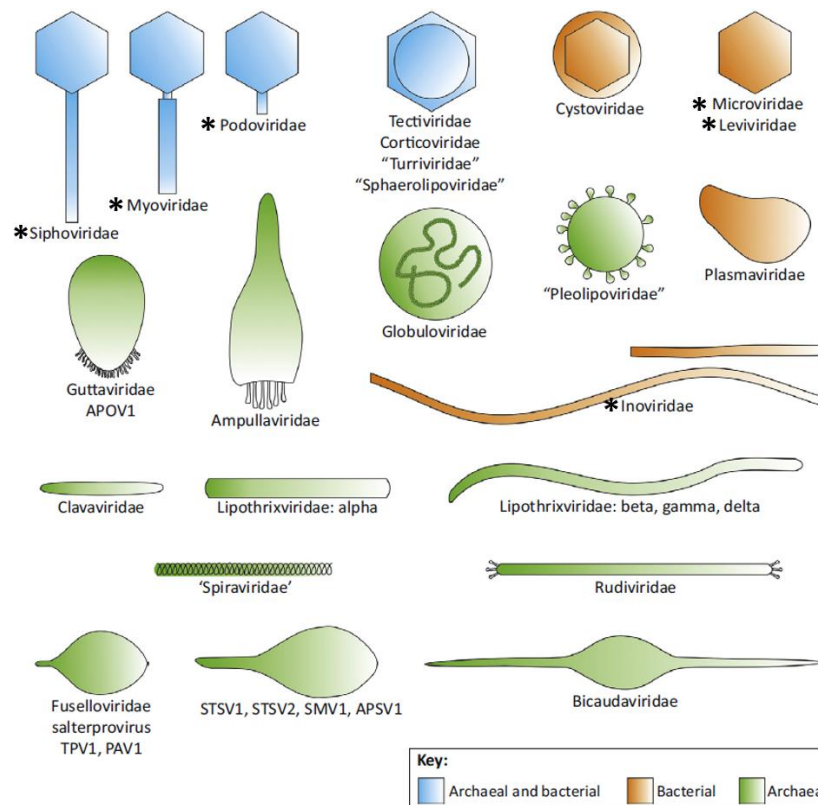


Figure 10 : Morphotypes des virions des virus de procaryotes (Pietila *et al*, 2014). Les virus de bactéries stricts sont représentés en orange, les virus d'archées stricts sont représentés en vert et les familles de virus pouvant infecter soit des bactéries soit des archées sont représentées en bleu. Les étoiles noires correspondent aux 6 premiers morphotypes définis dans les années 1960.

Les bactériophages sont majoritairement des virus non-enveloppés. Plus de 95 % ont un génome composé d'ADN (11 % sont ADN simple-brin et 89 % sont ADN double-brin) et ils sont regroupés dans 8 familles différentes. Les bactériophages à ARN ne représentent que 4 % des phages décrits et ne sont retrouvés que dans 3 familles (61 % sont ARN simple-brin et 39 % sont ARN double-brin) (Krishnamurthy *et al*, 2016). Ces chiffres tendent à augmenter avec la disponibilité croissante de données métagénomiques. Cependant, ces analyses excluent les bactériophages à ARN car la technique est basée sur du séquençage direct de l'ADN de plusieurs génomes contenus dans un milieu. Enfin, la composition en bases G-C de ces bactériophages reflète généralement celle de la bactérie hôte avec cependant un contenu en bases A-T 4 à 10 % supérieur (Rocha & Danchin, 2002 ; Alimpanis *et al*, 2018).

I.3.2. Les phages caudés

Les quelques 6 300 virus de procaryotes décrits depuis 1959 (**Figure 11**) comprennent $\approx$ 6 200 virus de bactéries et $\approx$ 100 virus d'archées. La catégorie la plus représentée est l'ordre des *Caudovirales* (*cauda* : queue en latin) avec environ 6 050 membres dénombrés à ce jour (équivalent à 96,3 % des virus bactériens décrits) (**Figure 11**).

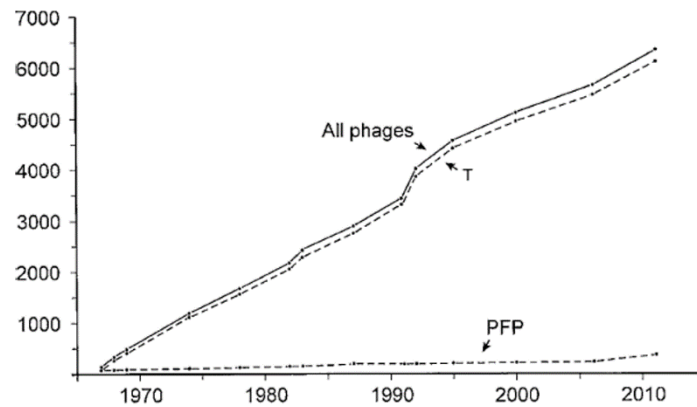


Figure 11 : Nombre cumulatif de virus de procaryotes décrits de 1967 à 2011 (Ackermann & Prangishvili, 2012). La lettre T (Tailed) correspond aux virus caudés et les lettres PFP (Polyhedral, Filamentous, Pleomorphic) correspondent aux virus cubiques, filamenteux et pléomorphiques.

L'ordre des *Caudovirales* est subdivisé en 3 familles (**Figures 10 et 12**) classées en fonction de la morphologie de leur queue:

- les *Podoviridae* (pous, *podo* : pied en grec, se réfère à la queue courte) (14 % des phages décrits) : queue courte, ADNdb (exemples : T7, Φ 29, P22, LUZ24).
- les *Siphoviridae* (*sipho* : tube en grec, se réfère à la longue queue) (62 %) : longue queue non contractile, ADNdb (exemples : λ , T1, T5, SPP1, HK97).
- les *Myoviridae* (*myo* : muscle en grec, se réfère à la queue contractile) (24 %) : longue queue contractile, ADNdb (exemples : T4, P1, Mu, SPO1).

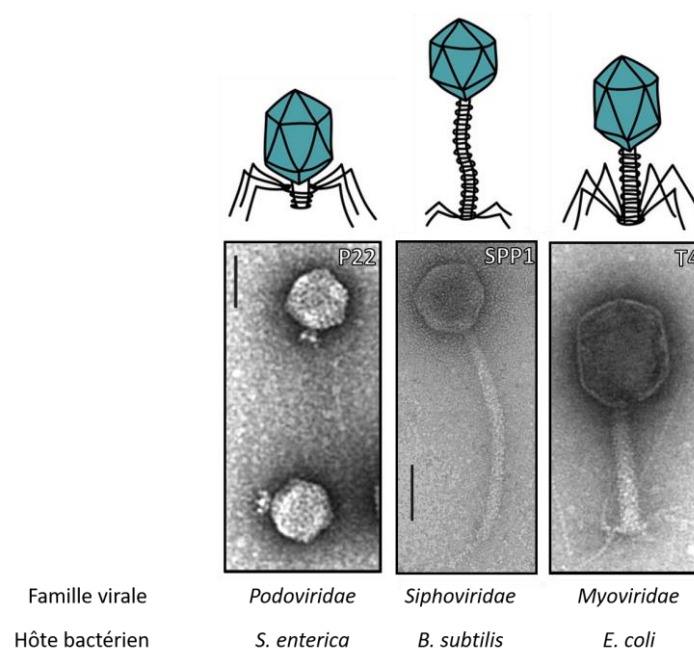


Figure 12 : Ordre des *Caudovirales* (schémas et clichés reproduits de Richter *et al*, 2018 ; Krupovic *et al*, 2011 ; Lawrence *et al*, 2002 ; Alonso *et al*, 2006). Les phages P22, SPP1 et T4 ont été visualisés par microscopie électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyl. L'échelle représente 50 nm.

En 2017 et 2018, deux nouvelles familles ont été ajoutées à l'ordre des *Caudovirales*, les *Ackermannviridae* et les *Herelleviridae* (rapport ICTV actualisé en février 2019).

I.3.3. Le cycle de multiplication des bactériophages caudés

Les phages diffèrent aussi par la nature de leur cycle de multiplication viral. Il existe classiquement deux voies pour leur propagation (**Figure 13A**) :

- Le cycle lytique (phage virulent ou lytique) : le virus entre dans la cellule et détourne activement la machinerie cellulaire pour produire des virions. Le cycle aboutit à la lyse de la cellule ce qui permet la dissémination des particules virales infectieuses dans le milieu extracellulaire. Les nouvelles particules formées pourront ainsi initier un nouveau cycle infectieux.
- Le cycle lysogénique (phage tempéré) : la lysogénie se caractérise par l'intégration du génome du bactériophage dans le chromosome de la bactérie conduisant à l'état de prophage (**Figure 13A**). Dans des cas plus rares, il peut être maintenu dans la cellule sous forme épisomale dont le cas le plus connu est le phage P1 d'*E. coli* qui se réplique et se partitionne pendant la division cellulaire indépendamment du chromosome bactérien (Ikeda *et al*, 1968). Le prophage est normalement décrit comme silencieux, l'expression des gènes nécessaires à sa multiplication étant réprimé. Sa présence dans le chromosome bactérien va peu impacter la bactérie dans sa croissance, sa multiplication et sa division. Il peut cependant affecter certains processus cellulaires, conséquence de l'augmentation de la taille du génome bactérien ou de son site d'intégration, et apporter à la bactérie de nouvelles propriétés (voir section I.3.4). Il n'est donc pas complètement neutre pour son hôte. La réplication du chromosome bactérien conduit à sa transmission perpétuelle aux générations suivantes. La sortie du stade lysogénique a lieu lors d'un stress environnemental. La dé-répression des gènes lytiques et l'excision du prophage du génome bactérien conduisent à l'entrée en cycle lytique (voir ci-dessus) qui aboutit à la production de particules virales et à la lyse cellulaire (**Figure 13A**).

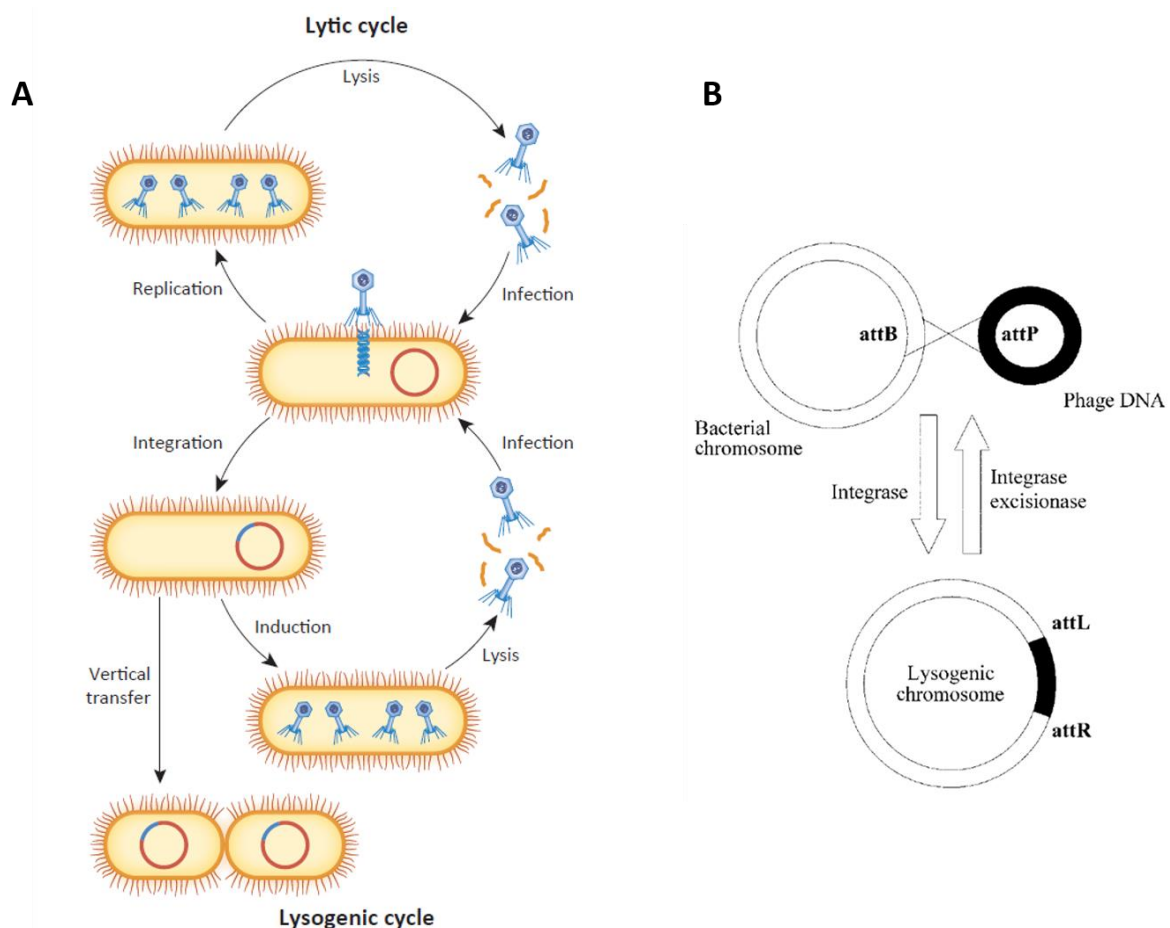


Figure 13 : (A) Cycle lytique et lysogénique de la multiplication des bactériophages. Le cycle lytique (haut) se caractérise par la transcription, la réplication et la traduction du génome éjecté de la particule virale dans le cytoplasme de la bactérie. Dans le cycle lysogénique (bas), le génome du phage n'est pas immédiatement répliqué, il est inséré dans le chromosome de la bactérie en tant que prophage jusqu'à ce qu'il y ait un stimulus qui induira l'excision du prophage (Keen & Dantas, 2018). Un cycle lytique s'ensuit. **(B)** Intégration par recombinaison à un site spécifique. L'intégration a lieu entre le site *attP* du phage et le site *attB* de l'hôte. L'intégration est réalisée par une intégrase (protéine codée par le phage). L'excision nécessite généralement l'action de deux protéines, une intégrase et une excisionase (Campbell, 2006).

La prise de décision entre le cycle lytique et le cycle lysogénique est un mécanisme encore peu connu. Le cas le plus documenté concerne le phage λ . Son entrée en lysogénie serait principalement dépendante de la localisation de l'ADN du phage pendant le cycle viral (Tal *et al*, 2014). En effet, les auteurs suggèrent que l'ADN viral serait ancré à la membrane, ce qui expliquerait que l'ADN du phage se localise dans les pôles de la bactérie. Ce serait la réplication du génome de la bactérie et sa ségrégation qui favoriserait la rencontre des deux sites de recombinaison (le site *attB* est proche de *oriC* dans le chromosome de la bactérie).

Toujours dans le cas du phage λ , si la prise de décision provoque l'entrée en cycle lysogénique, le phage met en place un système de régulation permettant d'assurer son maintien sous forme de prophage. Pour cela, le prophage code pour une protéine appelée CI (aussi connue sous le nom de répresseur λ).

recombinaison illégitime dans le génome bactérien et mener au brassage des gènes ou à leur délétion. Enfin, dans de rares cas, les phages peuvent être dépendants de prophages présents dans les cellules en cours d'infection. Ils sont appelés "phages satellites". C'est le cas du phage P4 qui ne peut engager un cycle lytique que si le prophage P2 est présent dans la cellule infectée (Six & Klug, 1973 ; Christie & Calendar, 2016).

L'interaction des bactériophages avec la cellule hôte est un processus complexe. Dans la partie suivante, je détaille les étapes-clés de multiplication du bactériophage lytique SPP1, le modèle sur lequel je travaille au laboratoire.

I.4. Le bactériophage SPP1, un modèle pour les phages caudés

I.4.1. Caractéristiques du bactériophage SPP1

Le phage SPP1 appartient à la famille des *Siphoviridae*. Il infecte spécifiquement la bactérie Gram-positive *B. subtilis*. SPP1 (*Subtilis* Phage Pavia 1) a été isolé dans le jardin botanique de Pavie au Nord de l'Italie et décrit pour la première fois par Riva (Riva *et al*, 1968). Ce virus est strictement lytique (il n'y a pas d'insertion de son génome viral dans le chromosome de l'hôte). La particule virale de SPP1 possède une capside icosaédrique (61 nm de diamètre, White *et al*, 2012) attachée à une longue queue non contractile composée d'un tube hélicoïdal (190 nm de long, Plisson *et al*, 2007) et d'une fibre responsable de l'attachement à son hôte (**Figures 12 - centre et 15**). Son chromosome linéaire, constitué d'une molécule d'ADNdb, a une taille de 45,1 kilo paires de bases (kpb) (São-José *et al*, 2007). Le génome de SPP1 a une taille de 44 016 paires de base (pb) (Godinho *et al*, 2018). Le chromosome, confiné dans la capside virale, présente des séquences terminales redondantes sur 4 % et une permutation circulaire partielle de l'ordre des gènes, résultant d'un mécanisme d'encapsidation de l'ADN par tête pleine (Morelli *et al*, 1979 ; Tavares *et al*, 1992).

I.4.2. Les étapes du cycle viral de SPP1 dans la bactérie *B. subtilis*

Le cycle lytique de SPP1 a une durée de 30 à 60 minutes dans des conditions de température (37°C) et de nutriments (milieu riche) adéquats. Il aboutit à la production de plus de 200 particules virales après 30 minutes d'infection (Alonso *et al*, 2006).

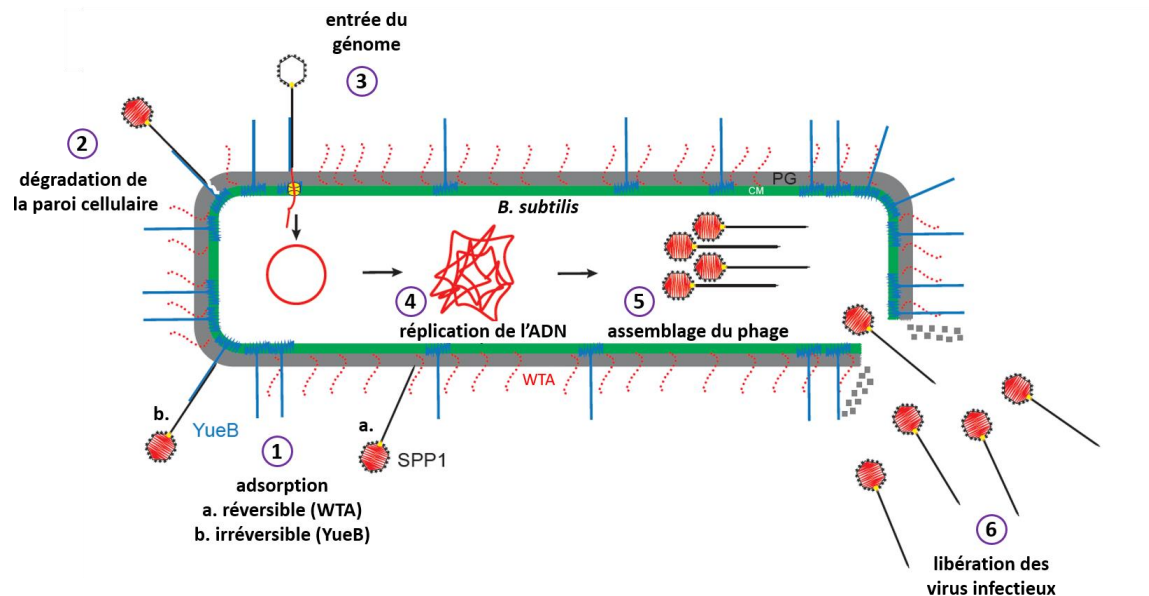


Figure 15 : Cycle viral du bactériophage SPP1 infectant son hôte, la bactérie Gram-positive *B. subtilis*. (1) Adsorption réversible *via* les acides téichoïques glycosylés (a) puis irréversible *via* le récepteur membranaire YueB (b). (2) Dégradation locale de la paroi cellulaire. (3) Ejection de l'ADN du phage dans le cytoplasme de la bactérie. (4) Réplication de l'ADN sous forme circulaire puis sous forme de concatémères. (5) Assemblage de la particule virale et encapsidation de l'ADN dans la capside. (6) Lyse de la bactérie et libération des virions. Légende : WTA : acide téichoïque glycosylé, PG : peptidoglycane, CM : membrane cytoplasmique. Pour des raisons de simplification, le chromosome de la bactérie n'est pas représenté dans ce schéma mais il n'est pas dégradé pendant le cycle viral du bactériophage.

Ce cycle débute par une étape d'adsorption réversible *via* les acides téichoïques glycosylés (WTA) exposés en grand nombre tout le long de la paroi bactérienne (Baptista *et al*, 2008). Ce premier contact permet au bactériophage de "scanner" la surface de la bactérie (étape 1.a dans la **Figure 15**) et de se déplacer pour aller, dans un deuxième temps, à la rencontre du récepteur membranaire YueB (étape 1.b dans la **Figure 15**) présent en faible quantité mais enrichi proche des pôles de la cellule (São-José *et al*, 2004). Pour SPP1, cette interaction spécifique et irréversible avec YueB (São-José *et al*, 2004 ; São-José *et al*, 2006) conduit à l'éjection de l'ADN viral vers le cytoplasme de la bactérie. Dans d'autres phages, les interactions, réversibles et irréversibles, peuvent se faire soit avec un seul récepteur soit avec des composants différents présents à la surface de la paroi cellulaire (Bertozzi Silva *et al*, 2016).

Le phage possède une activité hydrolytique de la paroi cellulaire qui lui permet de percer le peptidoglycane et d'accéder à la membrane cytoplasmique (étape 2 dans la **Figure 15**). Le passage de l'ADN viral nécessite la formation d'un canal de nature hydrophile dans l'enveloppe bactérienne qui précède le transfert de l'ADN du virion vers le cytoplasme bactérien (étape 3). La nature de ce canal est actuellement inconnue pour SPP1. La vitesse d'entrée de l'ADN dans la bactérie hôte varie en fonction du système phagique. Elle peut être soit très rapide, environ 30 secondes pour T4, ou très lente, 9-12 minutes pour T7 (Letellier *et al*, 1999). Pour SPP1, elle semble plutôt rapide puisque l'ADN viral est détecté dans le cytoplasme bactérien 3 minutes après l'infection (Burger & Trautner, 1978).

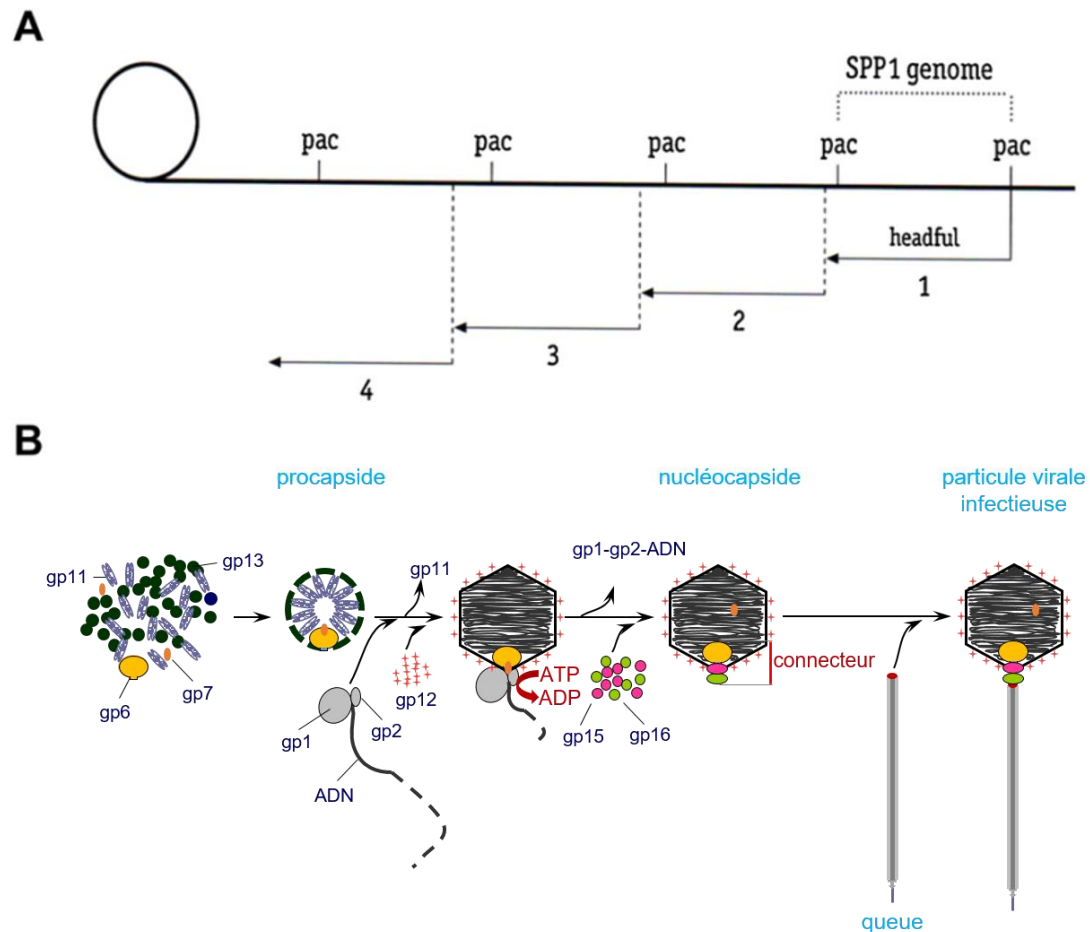


Figure 16 : Encapsidation séquentielle du génome de SPP1 et voie d'assemblage de la particule virale. (A) Schéma d'encapsidation par tête pleine initiée au site *pac* du bactériophage SPP1. La barre linéaire, en haut, représente l'ADN concatémérique généré par la réplication de type sigma du génome de SPP1 (schématisé à la gauche du schéma) qui servira de substrat pour l'encapsidation. Les lignes verticales représentent les sites *pac*. La région entre deux sites *pac* correspond à une unité de génome de SPP1 (44 016 pb). Les lignes en pointillé montrent le processus d'encapsidation de manière processive. Le premier cycle d'encapsidation démarre à une séquence *pac*. La région entre deux lignes pointillées correspond à la taille moyenne d'un génome de SPP1 encapsidé (45,1 kpb). Le nombre de cycles d'encapsidation séquentiels est indiqué. Pour des raisons de simplicité, ce nombre a ici été réduit à 4 (Oliveira *et al*, 2013). **(B)** Voie d'assemblage du bactériophage SPP1. Gp13, gp11, gp6 et gp7 sont nécessaires pour la formation de la procapside. La sortie de la protéine gp11 de la capsid mène à son expansion. Le complexe terminase gp1-gp2 se lie à la région *pac* présente sur le génome du phage. La protéine gp2 clive l'ADN, le complexe gp1-gp2-ADN interagit avec la protéine portale gp6 pour former le moteur d'encapsidation et le transfert de l'ADN vers l'intérieur de la procapside débute. L'empaquetage de l'ADN dans la capsid conduit à la création de sites de liaison pour la protéine auxiliaire gp12 à la surface de la capsid. Une fois la tête pleine, le concatémère est clivé pour terminer l'encapsidation. Il est suivi par la fixation séquentielle d'un adaptateur (gp15) et d'une protéine bouchon (gp16) formant le connecteur et fermant la capsid. La queue assemblée dans une voie d'assemblage indépendante se lie au connecteur et rend les particules infectieuses (section I.4.4) (Tavares 2018).

Après son entrée dans le cytoplasme sous forme linéaire, l'ADN se recircularise. La réplication du génome viral démarre et conduit à l'accumulation de quelques copies d'ADN circulaires de SPP1 (réplication theta). Par la suite, elle a été proposée comme changeant pour un mode de réplication en cercle roulant générant des concatémères (étape 4, section I.4.3). Ces concatémères linéaires sont le substrat pour l'encapsidation de l'ADN viral selon un mécanisme de tête pleine (**Figure 16A**) (section I.4.4) (Morelli *et al*, 1979 ; Tavares *et al*, 1992 ; Dröge *et al*, 2000). Un moteur moléculaire puissant transfère l'ADN à travers un sommet portal spécialisé vers l'intérieur de la procapside de SPP1 (**Figure 16B**) (Oliveira *et al*, 2013). Ce sommet est fermé à la fin de l'encapsidation créant l'interface pour l'attachement de la queue qui permet d'aboutir à la formation de particules virales infectieuses (**Figure 16B**). Les virions vont s'accumuler dans la bactérie infectée jusqu'à la lyse de la cellule.

La dernière étape du cycle viral est la lyse cellulaire. Le phage a mis en place un mécanisme très contrôlé puisque la lyse ne doit pas être trop précoce afin qu'un maximum de nouvelles particules virales soient formées, ni trop tardive afin de ne pas réduire les opportunités d'infection de bactéries accessibles dans l'environnement. Pour SPP1, la lyse de la cellule est assurée par l'action concertée de 3 protéines codées par le phage, une endolysine, gp25, et deux holines, gp24.1 et gp26 (Catalão *et al*, 2013).

Les holines sont des protéines hydrophobes qui vont s'oligomériser au niveau de la membrane cytoplasmique menant à l'arrêt de la croissance de la bactérie et à sa mort cellulaire (Grundling *et al*, 2002 ; Young, 2013). Elles forment des pores dans la membrane donnant ainsi l'accès pour les endolysines au peptidoglycane, le principal composant de la paroi cellulaire bactérienne (**Figure 17**). Les endolysines possèdent une activité glycosylase qui hydrolyse le peptidoglycane conduisant à la lyse osmotique de la bactérie (**Figure 17**). Il y aura ainsi libération de plusieurs dizaines de particules virales, ou plusieurs centaines selon le bactériophage considéré, qui pourront alors recommencer un nouveau cycle infectieux.

Dans le cas de SPP1, les gènes gp25 et gp26 sont sous le contrôle du promoteur précoce PE5. Ils sont donc transcrits rapidement après l'infection tandis que la protéine gp24.1 est codée par un gène tardif. Cette dernière est probablement l'horloge moléculaire qui déclenche la lyse de la bactérie à l'étape tardive de l'infection. Ainsi, l'expression différentielle de ces 3 gènes permet de définir la temporalité de la lyse de la cellule.

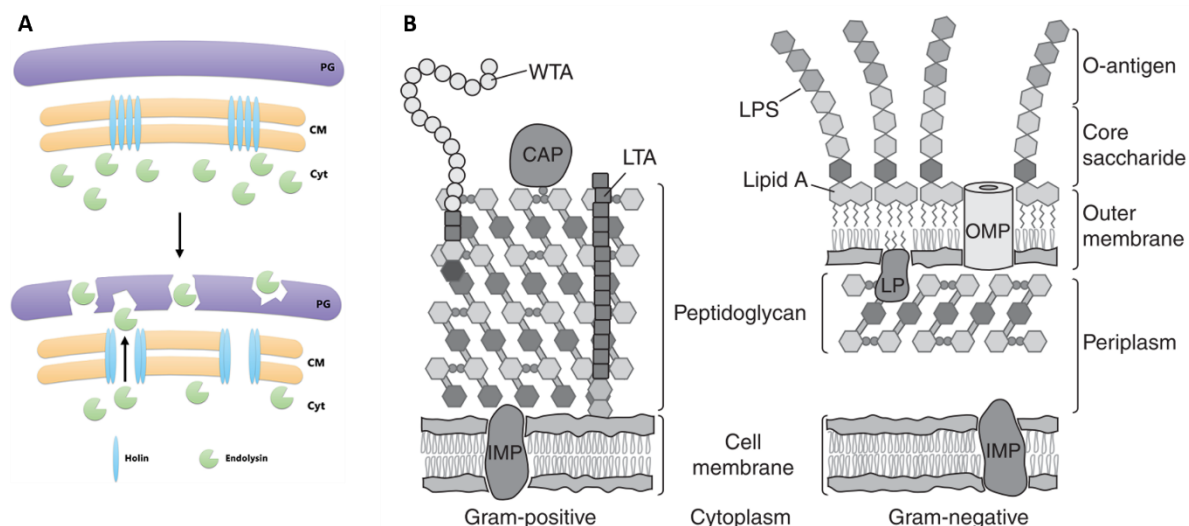


Figure 17 : Lyse de la bactérie par le système holine-endolysine phagique et organisation de l'enveloppe bactérienne. (A) Schéma représentatif du système holine-endolysine. La membrane plasmique et la paroi cellulaire sont représentées avec les holines et les endolysines. Le schéma simplifié n'est pas à l'échelle, le peptidoglycane étant beaucoup plus épais dans les bactéries Gram-positives que dans les Gram-négatives et la membrane externe ayant été omise pour ce dernier groupe. Légende : PG : peptidoglycane, CM : membrane cytoplasmique, Cyt : cytoplasme. **(B)** Représentation des enveloppes cellulaires des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Légende : CAP : protéine covalamment attachée au peptidoglycane, IMP : protéine membranaire intégrale, LP : lipoprotéine, LPS : lipopolysaccharide, LTA : acide lipotéichoïque, OMP : protéine membranaire externe, WTA : acide téichoïque glycosylé (Silhavy *et al*, 2010).

Ce travail de thèse porte sur la biologie cellulaire de la réplication de l'ADN phagique et de l'assemblage de la particule virale de SPP1. Un état des connaissances actuelles sur ces étapes essentielles du cycle viral est détaillé ci-dessous.

I.4.3. La réplication du génome viral de SPP1

La réplication de l'ADN de SPP1 est aujourd'hui un processus bien caractérisé. Elle est proposée comme ayant lieu de manière unidirectionnelle et d'être initiée qu'à une seule des deux origines de réplication présentes sur le génome de SPP1 (*oriR* et *oriL*, en magenta sur la **Figure 18**) (Ganesan *et al*, 1976 ; McIntosh *et al*, 1978 ; Lo Piano *et al*, 2011). Ces deux origines de réplication sont distantes de 13 000 paires de base et ont une organisation similaire, composée de répétitions directes et d'une région riche en bases A-T appelée DUE ("DNA Unwinding Elements"). Bien qu'il y ait un grand degré d'identité entre ces deux origines (Pedré *et al*, 1994), la protéine de liaison à l'origine, gp38, se lie à *oriL* (située dans le gène 38) avec une affinité 3 à 4 fois supérieure à celle de *oriR* (Missich *et al*, 1997).

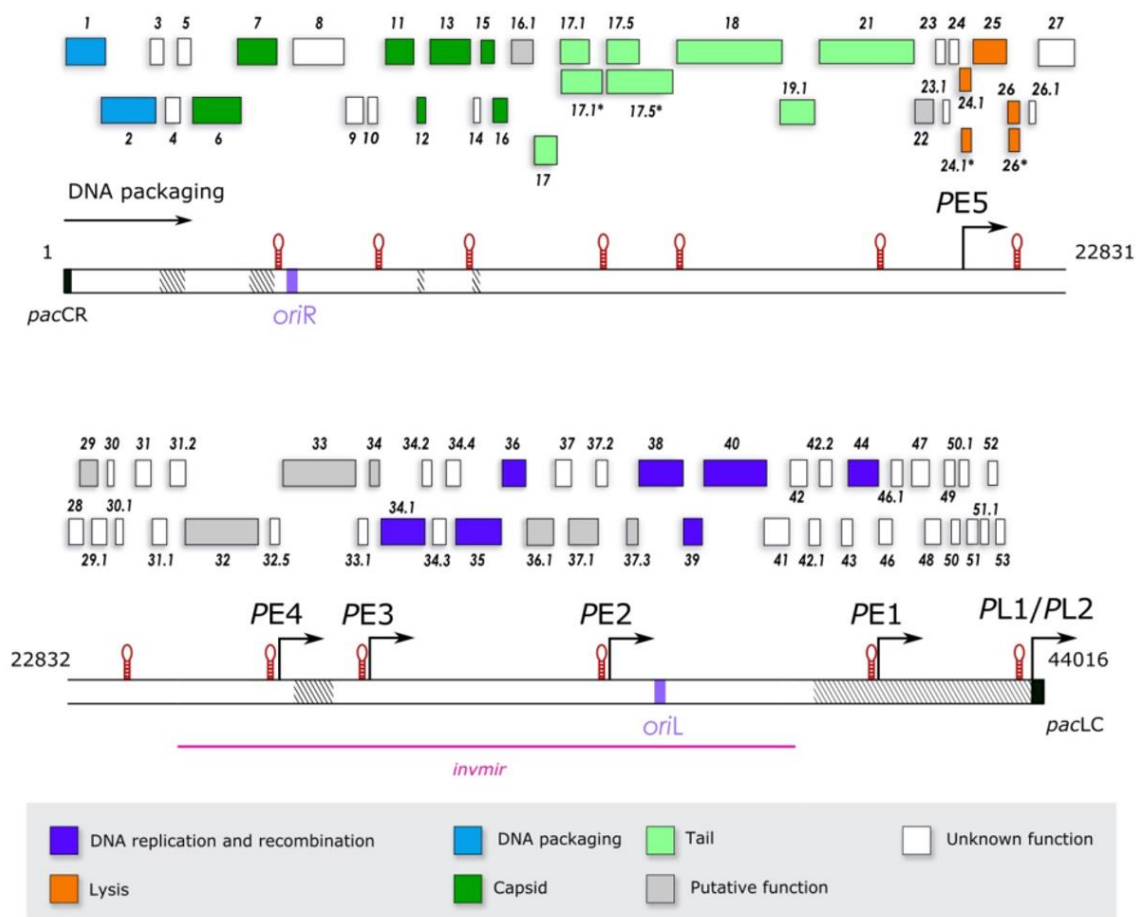


Figure 18 : Organisation du génome de SPP1 (Godinho *et al*, 2018). La barre continue représente le génome de SPP1 (44 016 paires de base) avec en position 1, le principal site de clivage *pac*. Les deux origines de réplication, *oriR* et *oriL*, sont représentées en magenta et les régions non-essentiels (identifiées par des délétions du génome) sont indiquées en rayé. La transcription se fait de gauche à droite. L'encapsidation de l'ADN dans la procapside initiée au niveau du site *pac* (position 1) se fait dans la même direction (flèche sur le haut à gauche). Les gènes de SPP1 dont la fonction est aujourd'hui connue sont colorés et identifiés dans la légende grisée du bas.

Juste après l'infection, l'ADN est rapidement recircularisé, fort probablement par recombinaison homologue au niveau de ses extrémités redondantes. Les gènes précoces, notamment ceux impliqués dans la réplication et transcrits à partir des promoteurs *PE2* et *PE3* (**Figure 18**), sont rapidement exprimés. L'analyse de mutants létaux conditionnels de SPP1 pour leur capacité à synthétiser l'ADN a mis en évidence deux groupes bien distincts de gènes (**Tableau 1**). Les mutants dans les gènes 38, 39 et 40 (unité transcriptionnelle contrôlée par *PE2*) montrent un blocage complet de la réplication de l'ADN (Ayora *et al*, 2002) tandis que les mutants dans les gènes 34.1 et 35 (*PE3*) montrent une initiation normale de la réplication mais une quantité finale d'ADN viral inférieure à celle retrouvée dans une infection sauvage (Burger & Trautner, 1978 ; Pedré *et al*, 1994).

Tableau 1 : Gènes viraux impliqués dans la réplication du génome de SPP1. La fonction de chaque protéine, l'opéron auquel leur gène appartient, leur taille en acides aminés (AA) et leur rôle essentiel ou non pour la réplication de SPP1 sont présentés. L'étoile désigne les protéines non-essentiels pour le phage mais dont l'absence affecte de manière significative le cycle du phage (Valero-Rello *et al*, 2017).

Gène	Fonction de la protéine	Opéron	Taille en AA	Essentielle pour le phage
34.1	exonucléase 5'→3'	PE3	311	non*
35	recombinase recT-like	PE3	287	oui
36	protéine de liaison à l'ADN simple-brin	PE3	159	non*
38	protéine de liaison à l'origine	PE2	256	oui
39	chargeur de l'hélicase	PE2	126	oui
40	hélicase	PE2	442	oui
44	résolvase	PE2	236	non

I.4.3.1. La réplication précoce en mode theta (θ)

La réplication en mode theta requiert 3 protéines essentielles codées par le phage : la protéine de liaison à l'ADN, gp38, le chargeur de l'hélicase, gp39, et l'hélicase, gp40. La réplication est initiée par la liaison de multiples copies de la protéine gp38 à la région *oriL*, riche en A-T, qui chevauche le gène 38, à partir d'un ADN surenroulé (**Figure 19**). Enfin, pour être répliqué, l'ADN viral répliqué doit obligatoirement être sous forme surenroulée (**Figure 19B**). Seule une région de 356 paires de base proche de l'*oriL* est nécessaire et suffisante pour que la synthèse de l'ADN ait lieu de manière efficace (Seco & Ayora, 2017).

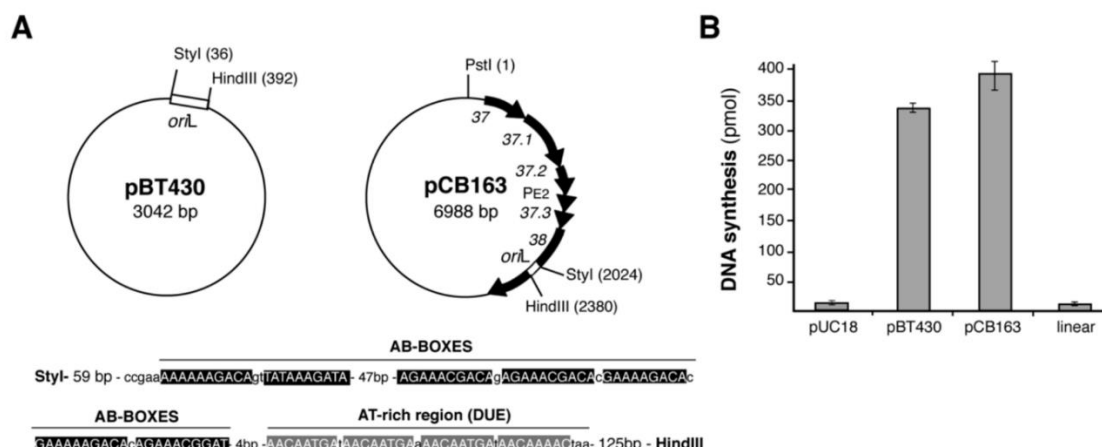


Figure 19 : Reconstitution de la réplication de l'ADN (*in vitro*) en mode theta avec les protéines purifiées de SPP1 et *B. subtilis* (Seco & Ayora, 2017). **(A)** Cartes des plasmides d'ADN utilisés. Le plasmide pBT430 contient seulement 356 pb de la région *oriL*. Le plasmide pCB163 a une région de SPP1 de 2,7 kpb (du gène 37 au gène 38). En dessous, la région *oriL* est agrandie. Elle est composée d'une série d'éléments répétés appelés "boxes AB" où gp38 va se lier spécifiquement, et de régions riches en A-T, les DUE. **(B)** Quantification de l'ADN total synthétisé obtenu après 15 minutes d'incubation en utilisant les ADNs suivants : pUC18 (contrôle négatif), pBT430 et pCB163, tous les deux avec la région *oriL*. En ligne 4, le plasmide pCB163 linéarisé avec l'enzyme de restriction PstI (n=3).

Le complexe gp38-ADN va entraîner la fonte des deux brins de l'ADN viral au niveau de la région riche en A-T (DUE) (**Figure 19A - bas**), permettre la fixation de la protéine gp36 sur l'ADNsb et maintenir l'ADN dans une conformation ouverte, accessible au complexe de réplication (**Figure 20**). La protéine gp36 n'est pas essentielle pour la réplication du bactériophage mais son absence réduit le titre du phage de 6 fois par rapport à une infection sauvage (Valero-Rello *et al*, 2017). Des études *in vitro* montrent que gp36 et la protéine SsbA de *B. subtilis* agissent ensemble et pourraient faciliter la fonte des deux brins médiée par la protéine gp38 (Seco & Ayora, 2017). Par contre, la protéine gp36 ne peut pas être utilisée par *B. subtilis* pour la réplication de son propre ADN (Seco *et al*, 2013).

Cette conformation ouverte de *oriL* va permettre le chargement du complexe gp39-gp40 préformé sur le brin précoce de l'ADN viral ("leading strand") par interaction de gp39 avec gp38. Le complexe gp39-gp40 seul ne possède ni activité ATPasique ni activité hélicase. La dissociation de gp39 entraîne l'activation de l'hélicase virale gp40. Gp40 recrute ensuite la primase bactérienne DnaG (Wang *et al*, 2007) et le facteur de chargement DnaX (Martínez-Jiménez *et al*, 2002) sur l'ADN viral qui mobilisent le réplisome bactérien pour démarrer la réplication de l'ADN phagique (**Figure 20**).

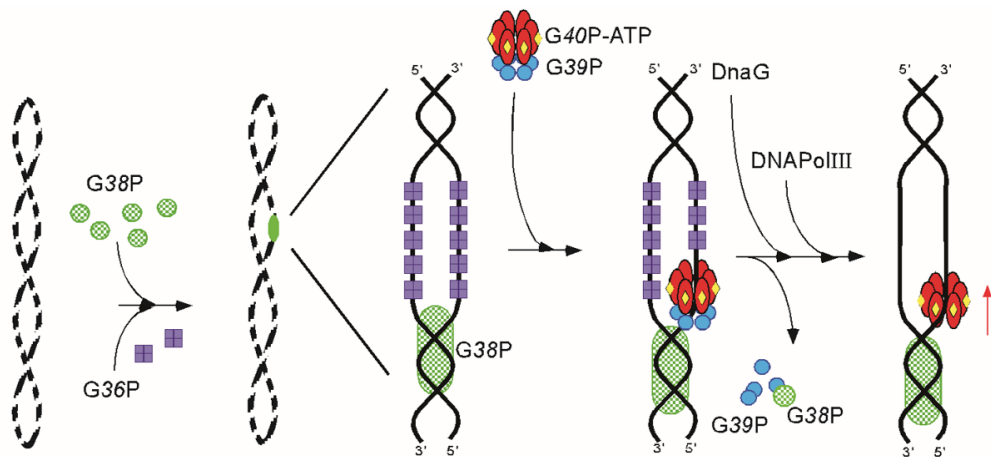


Figure 20 : Modèle de l'initiation de la réplication theta de l'ADN de SPP1 sur l'*oriL* (Ayora *et al*, 2002). La protéine gp38 reconnaît les boxes AB présentes sur le génome du phage, s'y lie et ouvre la région adjacente riche en A-T (DUE). La protéine gp36 se lie à l'ADNsb et le maintient ouvert. Le complexe gp39-gp40 est chargé sur la région ouverte par interaction directe de gp39 avec gp38. La dissociation de l'hétéro-multimère gp38-gp39 active l'hélicase virale gp40. Cette dernière protéine permet notamment le recrutement de DnaG au niveau des régions riches en A-T. La flèche indique la direction du mouvement de l'hélicase. G36P, G38P, G39P et G40P sont respectivement des désignations alternatives pour gp36, gp38, gp39 et gp40.

La réplication virale est effectuée par l'hélicase gp40 et le réplisome bactérien. Des expériences *in vitro* ont montré que 8 protéines de la machinerie cellulaire étaient essentielles à la réplication de SPP1 (Seco & Ayora, 2017) parmi les 13 protéines constituant le réplisome bactérien : PolC, DnaG, DnaE, DnaN, DnaX, HolA, HolB et la gyrase (**Tableau 2**).

Pour l'initiation unidirectionnelle de la réplication de SPP1, il est proposé que l'hélicase gp40 assemble deux complexes DnaG/DnaE pour initier le "priming" des deux brins (retardé - "lagging strand" - et précoce - "leading strand"). Ce résultat est en accord avec des observations montrant que l'hélicase de *B. subtilis* DnaC, DnaE et DnaG forment un complexe ternaire dans la cellule (Rannou *et al*, 2013). De plus, il a été montré chez *E. coli* que l'hélicase cellulaire était suffisante pour coordonner le "priming" par DnaG des deux brins d'ADN (Heller & Marians, 2006).

Ensuite, la primase DnaG synthétiserait des amorces d'ARN qui sont utilisées par la protéine DnaE pour générer des hybrides d'ARN-ADN utilisables par la polymérase PolC pour démarrer la synthèse d'ADN. Pour le brin précoce, seule PolC est utilisée pour sa synthèse. Par contre, pour le brin retardé, il existe une action simultanée de PolC et de DnaE médiée par la protéine gp36 pour la synthèse de fragments d'Okasaki.

Tableau 2 : Gènes cellulaires de la machinerie de réplication de *B. subtilis*. Les protéines DnaX, HolA et HolB forment le complexe de chargement des polymérases de l'ADN (DnaX₃HolA₁HolB₁). La fonction de chaque protéine, leur taille en acides aminés (AA) et leur rôle essentiel ou non pour SPP1 sont indiqués.

Gène	Fonction de la protéine	Taille en AA	Essentielle pour le phage	
			mode θ	mode σ
<i>polC</i>	polymérase polIII	1437	oui	
<i>dnaE</i>	polymérase (brin retardé)	1115	oui	
<i>ssbA</i>	protéine de liaison à l'ADN simple-brin	172	non	
<i>dnaN</i>	ADN polIII (sous-unité β) pince glissante	378	oui	
<i>dnaX</i>	facteur de chargement (sous-unité τ)	563	oui	
<i>holA</i>	facteur de chargement (sous-unité δ)	347	oui	
<i>holB</i>	facteur de chargement (sous-unité δ')	329	oui	
<i>dnaG</i>	primase	603	oui	
<i>gyrA-gyrB</i>	gyrase	1459	oui	non
<i>dnaA</i>	origine de réplication	446	non	
<i>dnaC</i>	hélicase	454	non	
<i>dnaI</i>	facteur de chargement de l'hélicase	311	non	

I.4.3.2. La réplication tardive générant des concatémères

Après quelques cycles de réplication en mode theta générant des cercles d'ADN, il y a un "basculement" vers un mode de réplication de type sigma (réplication de l'ADN en cercle roulant) (Morelli *et al*, 1979). Le switch de réplication est assuré par les protéines virales de recombinaison gp34.1 et gp35, la protéine de liaison à l'ADN gp36 et la résolvasse gp44. Des fonctions cellulaires peuvent remplacer les protéines non-essentiels gp34.1, gp36 et gp44 (**Tableau 1**).

Cette transition va permettre la synthèse de concatémères qui sont le substrat d'encapsidation de l'ADN dans les particules virales. A partir d'analyses biochimiques réalisées *in vitro*, un modèle a été proposé pour cette transition (Lo Piano *et al*, 2011). Dans un premier temps, le réplisome dans la fourche de réplication (ovales blancs dans l'étape 1 de la **Figure 21**) va entrer en collision avec la protéine gp38 liée à l'origine de réplication *oriR* ou *oriL* (ovales gris dans l'étape 1). La collision entraîne un recul de la fourche de réplication (étape 2) avec la formation d'une structure de type jonction de Holliday. Cette jonction mobile entre 4 brins d'ADN est un intermédiaire de la recombinaison homologue qui subit probablement une coupure double-brin par la résolvasse gp44 (flèches grises dans l'étape 3). La protéine gp44 n'étant pas essentielle, cette fonction pourrait être assurée par une résolvasse cellulaire. Les extrémités d'ADN créées vont être digérées par l'exonucléase 5'→3' de SPP1, gp34.1, pour générer une région 3' simple-brin sur laquelle se fixe la recombinaison gp35 (cercles rouges dans l'étape 4). Le complexe gp35-ADN va envahir le brin d'ADN homologue d'une molécule d'ADN surenroulée (forme circulaire) pour former une boucle ("displacement loop" ou "D-loop") dans laquelle les deux brins de la molécule circulaire vont être séparés par le brin d'ADN apporté par gp35 (étape 5 de la **Figure 21**) (Ayora *et al*, 2002).

Deux mécanismes sont proposés pour générer des concatémères. Dans le premier, la "D-loop" va être clivée par une endonucléase spécifique, possiblement gp44, suivie par une ligation qui conduit à la topologie de la molécule pour la réplication en cercle roulant (mécanisme 1 de la **Figure 21**). Dans le deuxième cas, il n'y a pas de clivage de l'intermédiaire. L'extrémité 3' associée à gp35 va servir d'amorce pour démarrer la synthèse du brin précoce de l'ADN dans la bulle créée par la "D-loop" (mécanisme 2 dans la **Figure 21**). La réplication de l'ADN qui suit conduit à la migration de la bulle le long du cercle d'ADN viral générant les concatémères du génome de SPP1. A ce jour, le mécanisme détaillé qu'utilise SPP1 pour opérer le "switch" de réplication n'est pas élucidé mais les données connues suggèrent fortement qu'il engage de la recombinaison entre régions homologues pour initier la réplication sous forme de concatémères ("Recombination-Dependent DNA Replication : RDR") (Lo Piano *et al*, 2011).

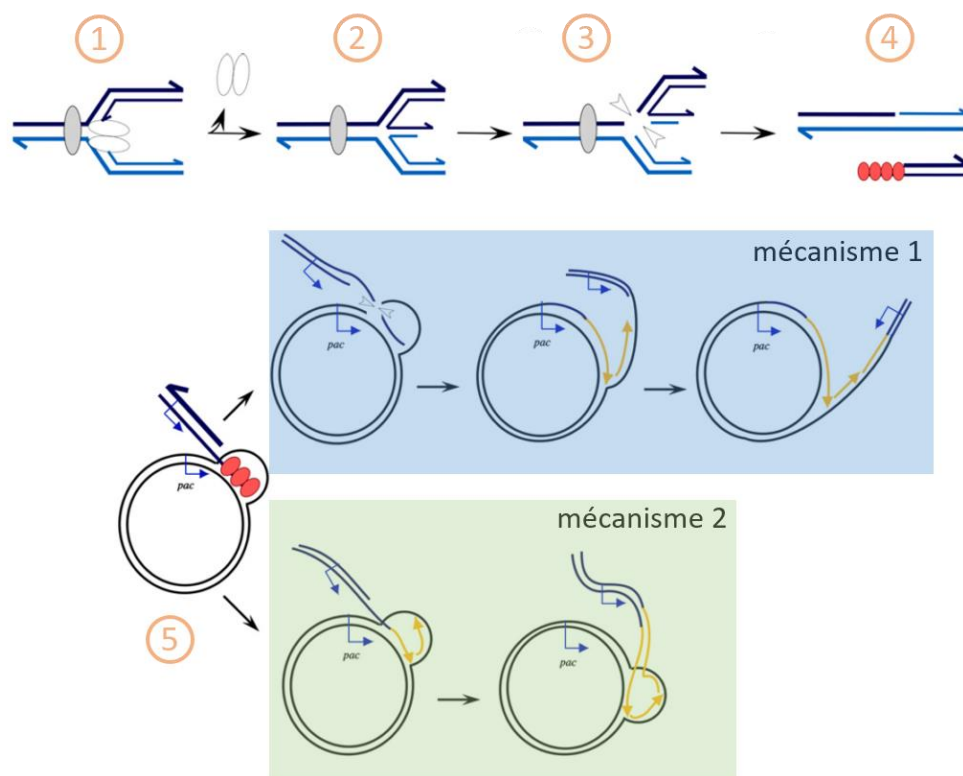


Figure 21 : Modèle de la transition du mode theta au mode sigma pour générer des concatémère d'ADN viral de SPP1 (Lo Piano *et al*, 2011). Voir texte section I.4.3.2 pour description des modèles mécanistiques. Symboles : ovals gris : la protéine gp38 liée à *oriR* ou *oriL*, ovals blancs : réplisome, flèches grises : résolvase (exemple : gp44) qui fait une coupure endonucléolytique double-brin, cercles rouges : gp35. L'ADN néo-synthétisé est présenté en jaune. La flèche en bleu indique la position de *pac* et la direction d'encapsidation de l'ADN concatémérique (voir **Figure 16A** et section I.4.4).

Gp35 est la seule protéine essentielle du phage qui agit exclusivement lors de la réplication tardive (**Tableau 1**). Elle s'associe à l'extrémité d'ADN qui initie la synthèse des concatémères de SPP1 (étapes 4 et 5 dans la **Figure 21**). Les interactions qu'elle établit avec gp36 puis avec gp40 protégeraient l'ADNsb et permettent le recrutement de l'hélicase phagique (Ayora *et al*, 2002). Il est probable que le chargement de gp40 sur l'ADN requiert gp39 et possiblement gp38, nécessaires pour la réplication d'un substrat d'ADN de type cercle roulant (Seco *et al*, 2013). La synthèse de concatémères requiert les mêmes protéines du réplisome bactérien que la réplication précoce en mode theta, à l'exception de la gyrase (**Tableau 2**). De manière identique, elles sont recrutées *via* les interactions de gp40 avec DnaG et DnaX (section I.4.3.2) (Seco *et al*, 2013).

Du fait de l'existence des modes de réplication theta et sigma dans le cycle viral de SPP1, il est important que ces étapes soient temporellement coordonnées. La détection de leurs produits de réplication dans les bactéries infectées montre que l'initiation de la réplication génère quelques cercles d'ADN viral qui serviront à amplifier le génome du phage sous forme de concatémères, substrat nécessaire à l'encapsidation dans la procapside (**Figure 22**) (Burger & Trautner, 1978 ; Burger, 1980).

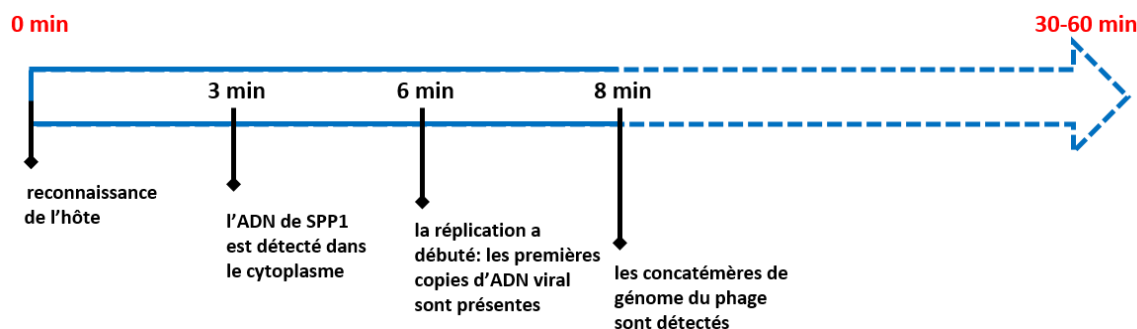


Figure 22 : Détection des différentes formes de l'ADN viral dans *B. subtilis* infectée par SPP1 au cours du temps (adapté de Burger & Trautner, 1978 ; Burger 1980).

I.4.4. L'assemblage de la particule virale de SPP1

La morphogenèse de la capside des bactériophages à tête icosaédrique avec un ADNdb (SPP1, T4, Φ 29 ou P22) est similaire à celle des Herpèsvirus (Rao & Feiss, 2015). Elle commence par la formation d'un précurseur de la capside sans ADN appelé procapside (**Figure 16B**). Le génome est ensuite transloqué vers l'intérieur de la procapside par l'action d'une ATPase virale (terminase). Il a lieu au niveau d'un sommet spécifique caractérisé par la présence de la protéine portale dodécamérique. Pendant l'encapsidation, la pression interne augmente à l'intérieur de la capside résultant de l'empaquetage de l'ADN. Les Herpèsvirus possèdent aussi une terminase et une protéine portale responsables de l'encapsidation. Ces protéines sont homologues à celles du phage. Il existe donc une forte conservation des machineries de translocation de l'ADN tant structurellement que fonctionnellement dans la lignée des phages caudés - Herpèsvirus (Nadal *et al*, 2010 ; Newcomb *et al*, 2002 ; Abrescia *et al*, 2012).

La procapside de SPP1 est un icosaèdre avec une forme sphérique d'une taille de 55 nm. Elle est constituée de centaines de copies de la protéine majeure de la capside gp13 et de la protéine d'échafaudage gp11 ainsi que 12 copies de la protéine portale gp6 et quelques copies de la protéine gp7 (**Figure 16B** et **Tableau 3**). La protéine gp13 forme la coque extérieure de la particule dans laquelle la protéine gp11 est enfermée. La protéine gp11, comme toutes les protéines d'échafaudage, est une chaperonne qui contrôle le positionnement correct de la protéine majoritaire de capside pour former une structure icosaédrique de taille homogène. Les protéines d'échafaudage peuvent être des protéines indépendantes (exemples : phages SPP1, P22 et Φ 29 et Herpèsvirus (Prasad et Schmid 2012)) ou fusionnées au terminal aminique de la protéine majoritaire de capside (exemples : phages HK97 (Oh *et al*, 2014) et T5 (Huet *et al*, 2010)).

Tableau 3 : Protéines impliquées dans la formation de la capsid de SPP1. La protéine gp11 ne fait pas partie de la structure finale (astérisque). Le nombre de copies de chaque protéine est donné pour une capsid. AA : Acides Aminés.

Protéine	Fonction de la protéine	Longueur (AA)	Nombre de copies	Essentielle pour le phage
gp6	protéine portale	503	12	oui
gp7	protéine minoritaire de la capsid	308	2 à 4	non
gp11*	protéine d'échafaudage	215	≈ 415	oui
gp12	protéine auxiliaire	64	180	non
gp13	protéine majoritaire de la capsid	324	415	oui
gp15	adaptateur	102	12	oui
gp16	protéine bouchon	109	6	oui

Pour SPP1, seule la production des protéines gp11, gp13 et gp6 est essentielle pour l'assemblage de procapsides compétentes pour l'encapsidation d'ADN viral. La protéine gp11 est une protéine allongée retrouvée sous forme de dimère dont chaque sous-unité interagit avec une sous-unité de gp13 (ratio gp11/gp13 : 1/1) (Ignatiou *et al*, manuscrit en révision). Son absence conduit à la formation de structures aberrantes résultant d'une polymérisation non contrôlée de la protéine majoritaire de la capsid. La protéine portale gp6 joue un rôle important pour assurer l'assemblage de procapsides avec une taille normale. En effet, en son absence, une population mixte composée de procapsides de taille normale et de taille plus petite est observée. La polymérisation de gp13 pour former la coque icosédrique requiert donc uniquement la présence de gp11 tandis que gp6 assure une taille homogène de la structure (Dröge *et al*, 2000).

Pendant l'assemblage de la procapsid, la protéine portale forme un sommet spécialisé au niveau d'un des 12 sommets de la procapsid. Son interaction avec la protéine gp7 recrute cette protéine vers l'intérieur de la procapsid. La protéine gp7 n'est pas essentielle à l'assemblage de la procapsid mais son absence diminue de 3 fois l'infectivité des particules produites (Vinga *et al*, 2006).

Après l'assemblage de la procapsid, la protéine gp11 sort de la structure par des pores dans la coque conduisant à l'expansion de la procapsid (**Figure 16B**). Cette action permet d'augmenter son volume interne et de gagner en stabilité. Ce processus peut être découplé de l'encapsidation du génome (Ignatiou *et al*, manuscrit en révision) mais il est fort probable que les deux processus se succèdent rapidement *in vivo*.

L'encapsidation du génome de SPP1 est initiée par la reconnaissance et la liaison de la terminase virale (composée de la grande sous-unité gp2 et de la petite sous-unité gp1) à une région spécifique de l'ADNdb, le site *pac* (**Figures 16 et 21**) (Chai *et al*, 1995). Après la coupure endonucléolytique de *pac* par gp2, le complexe gp1-gp2 se lie au sommet portal de la procapsid pour former le moteur

d'encapsidation (Oliveira *et al*, 2013). Ce moteur puissant utilise l'activité ATPase de gp2 pour transférer l'ADN viral vers l'intérieur de la capsid (Figure 16B). Le remplissage de la capsid avec de l'ADN conduit à un changement structural qui entraîne la création de sites permettant la fixation de la protéine auxiliaire gp12 à sa surface. Cette petite protéine (6,6 kDa) forme un trimère allongé avec des propriétés collagène-like et se lie aux centres des hexamères de la capsid (Zairi *et al*, 2014). A la fin de l'encapsidation de $\approx 45,1$ kpb, la protéine gp2 clive l'ADN de manière non spécifique. Le complexe terminase-ADN se sépare de la capsid et migre vers une autre procapsid pour initier un nouveau cycle d'encapsidation. Suite à la terminaison de l'encapsidation, le canal portal est fermé par la fixation séquentielle des protéines gp15 et gp16 formant le connecteur (Lhuillier *et al*, 2009) (Figures 16B et 23). Gp16 agit comme une plateforme d'amarrage pour la queue, préassemblée dans une voie morphogénétique indépendante.

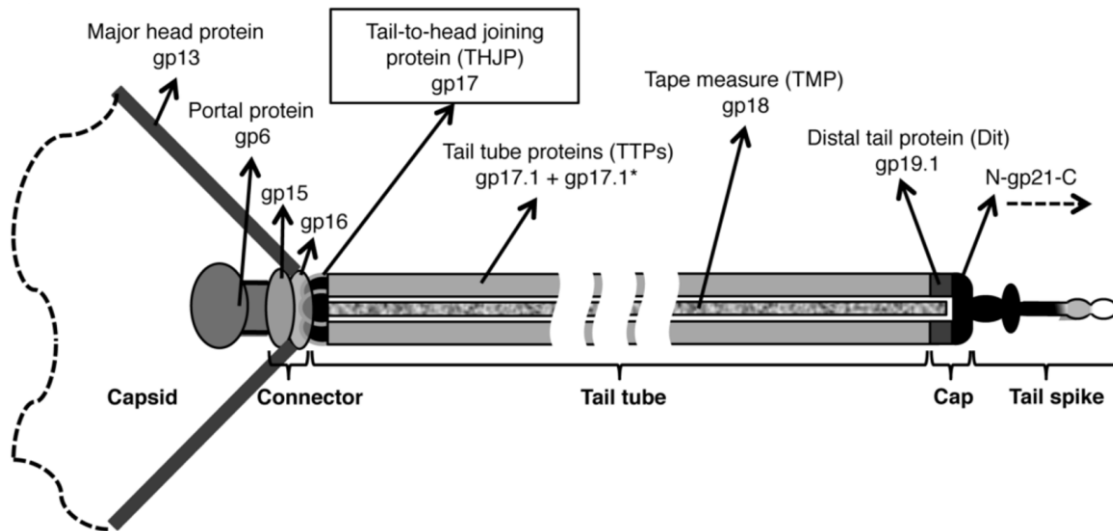


Figure 23 : Représentation schématique de la particule du phage SPP1 (Auzat *et al*, 2014). Le gradient de gris représente la fibre caudale dans laquelle des protéines encore non-identifiées peuvent être présentes. Légende : THJP : Tail-to-Head Joining Protein, TMP : Tape Measure Protein, TTP : Tail Tube Protein.

L'assemblage de la queue a lieu de manière séquentielle. Il débute par la fibre caudale gp21 ("tail spike") et finit par la protéine qui permet de lier la queue à la capsid (gp17) (Figure 23). Gp21 forme un trimère dont la partie C-terminale interagit avec le récepteur membranaire YueB (Vinga *et al*, 2012) pour le démarrage de l'infection. La partie N-terminale de gp21 forme un complexe avec la protéine gp19.1 (sous forme hexamérique) qui ferme la queue et qui s'ouvrira au début de l'infection (Goulet *et al*, 2011). La protéine gp19.1 sert de plateforme pour initier l'assemblage d'un tube de forme hélicoïdale de 160 nm, constitué des protéines gp17.1 et gp17.1* ("Tail Tube proteins : TTPs", ratio $\approx 3 : 1$) (Auzat *et al*, 2008) qui s'assemblent autour de la protéine gp18 ("Tape Measure Protein : TMP"). Lorsque le tube est assemblé, la protéine gp17 ("Tail-to-Head Joining Protein : THJP") se fixe à

l'extrémité distale de la fibre caudale pour créer l'interface nécessaire à son interaction avec le connecteur de la capsid. Cette interaction permet la formation de particules virales infectieuses. L'absence de gp17 mène à la production de têtes et de queues qui ne sont pas capables d'interagir ensemble montrant que cette protéine est essentielle à la jonction des deux structures (Auzat *et al*, 2014).

I.5. La réplication du chromosome bactérien et sa structuration

La réplication de l'ADN du phage et l'assemblage de la particule virale sont des processus qui vont bouleverser la cellule dans sa physiologie et sa structuration. Le piratage du réplisome bactérien implique que l'enzymologie et probablement la structuration cellulaire de la machinerie de réplication de *B. subtilis* aient un rôle important dans la réplication de SPP1.

Dans cette section, il est décrit comment la bactérie, dans un contexte physiologique, assure les étapes essentielles de la duplication de son génome. La réplication du chromosome bactérien, sa conformation tridimensionnelle et la transmission à sa descendance y sont détaillées.

I.5.1. La réplication du chromosome bactérien

La duplication du génome bactérien nécessite l'activité coordonnée d'un complexe à plusieurs partenaires, le réplisome. La réplication du chromosome est fondamentale pour la propagation de toutes les espèces bactériennes. Ce processus essentiel et bidirectionnel requiert de complexes challenges mécanistiques. L'ADN parental doit être ouvert pour répliquer simultanément les deux brins de manière très fidèle et efficace. De plus, parce que les deux brins parentaux ont une polarité opposée, les deux nouveaux brins d'ADN sont synthétisés différemment avec un brin précoce ("leading strand") synthétisé continuellement et un brin retardé ou tardif ("lagging strand") synthétisé de manière discontinue avec de courts fragments d'Okasaki. Le réplisome a ainsi évolué pour coordonner et coupler toutes ces activités enzymatiques en une seule machine moléculaire.

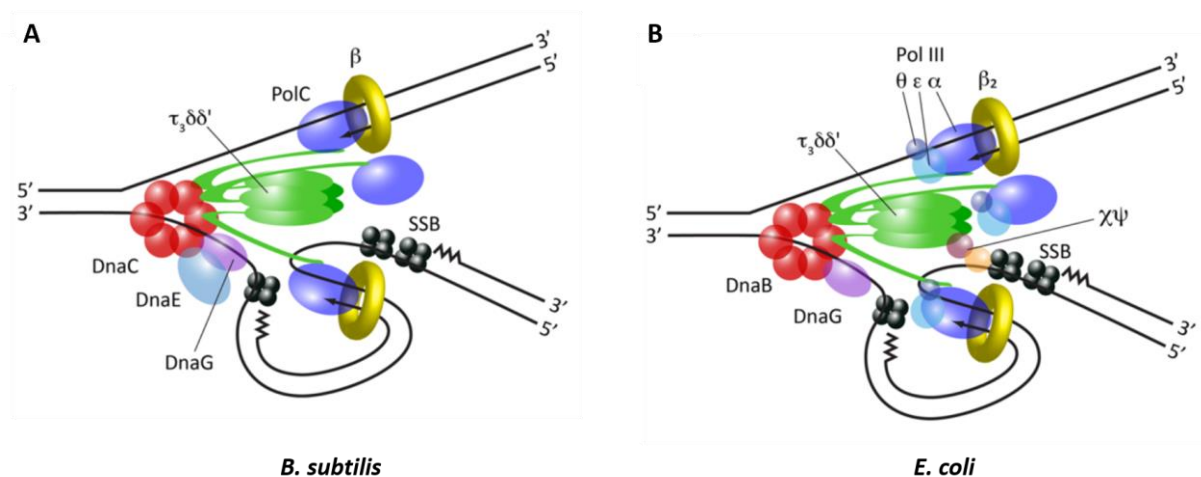


Figure 24 : Architecture du réplisome bactérien (adapté de Beattie & Reyes-Lamothe, 2015). (A) Architecture du réplisome de *B. subtilis*, majoritairement dérivé d'études *in vitro* (Sanders *et al*, 2010). (B) Architecture du réplisome d'*E. coli*, dérivé d'études *in vitro* et d'observations *in vivo*.

Les deux réplisomes les mieux caractérisés sont ceux de *B. subtilis* et d'*E. coli*. Le réplisome complet et fonctionnel de *B. subtilis* avec des concentrations physiologiques d'ADN a été reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées permettant ainsi de définir le réplisome minimal (**Tableau 2**) (Sanders *et al*, 2010). Cette étude montre qu'il existe une structure cœur conservée avec le réplisome d'*E. coli* (Beattie & Reyes-Lamothe, 2015). Il est constitué d'une hélicase DnaC (sous forme homo-hexamérique) qui interagit avec la primase DnaG, d'un complexe de chargement DnaX-HolA-HolB (= $\tau_3\delta\delta'$ sous forme pentamérique) de la pince glissante DnaN (= β) qui ancre le réplisome à l'ADN et d'une protéine de liaison à l'ADN SsbA.

Cependant, le réplisome de *B. subtilis* présente aussi une différence notable comparée à celui d'*E. coli*. Deux polymérases distinctes, PolC et DnaE, sont requises pour la réplication de l'ADN de cette bactérie (Dervyn *et al*, 2001) comme pour de nombreuses bactéries Gram-positives (Timinskas & Balvoc, 2014).

I.5.2. Les différentes étapes de la réplication de l'ADN de la bactérie *B. subtilis*

Le processus de réplication de l'ADN de *B. subtilis* peut être séparé en 3 phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

I.5.2.1. Initiation

Chez *B. subtilis*, 6 protéines, constituant le primosome, sont essentielles à l'initiation de la réplication du chromosome bactérien (**Figure 25A**) (Jameson & Wilkinson, 2017).

La réplication de l'ADN est initiée par l'interaction de la protéine de liaison à l'ADN, DnaA, au niveau de l'origine de réplication de la bactérie, *oriC*. DnaA est connue pour former un oligomère de structure hélicoïdale (Scholefield *et al*, 2012) autour de l'ADN au niveau de régions appelées "DnaA-boxes"

(**Figure 25B**). La formation de cet oligomère conduit localement à la fonte des deux brins des régions riches en A-T, les DUE. DnaD va ensuite s’associer à *oriC* par interaction directe avec DnaA (Ishigo-Oka *et al*, 2001). Puis, DnaB est recrutée sur l’*oriC* via DnaD. DnaB étant associée à la membrane, cette interaction se fait proche de la membrane cellulaire (**Figure 25C**). Une fois ce complexe assemblé, DnaB jouerait le rôle de recruteur de l’hélicase DnaC sur l’ADNsb au niveau des régions désappariées d’*oriC* par l’intermédiaire de son facteur de chargement DnaI (Ioannou *et al*, 2006).

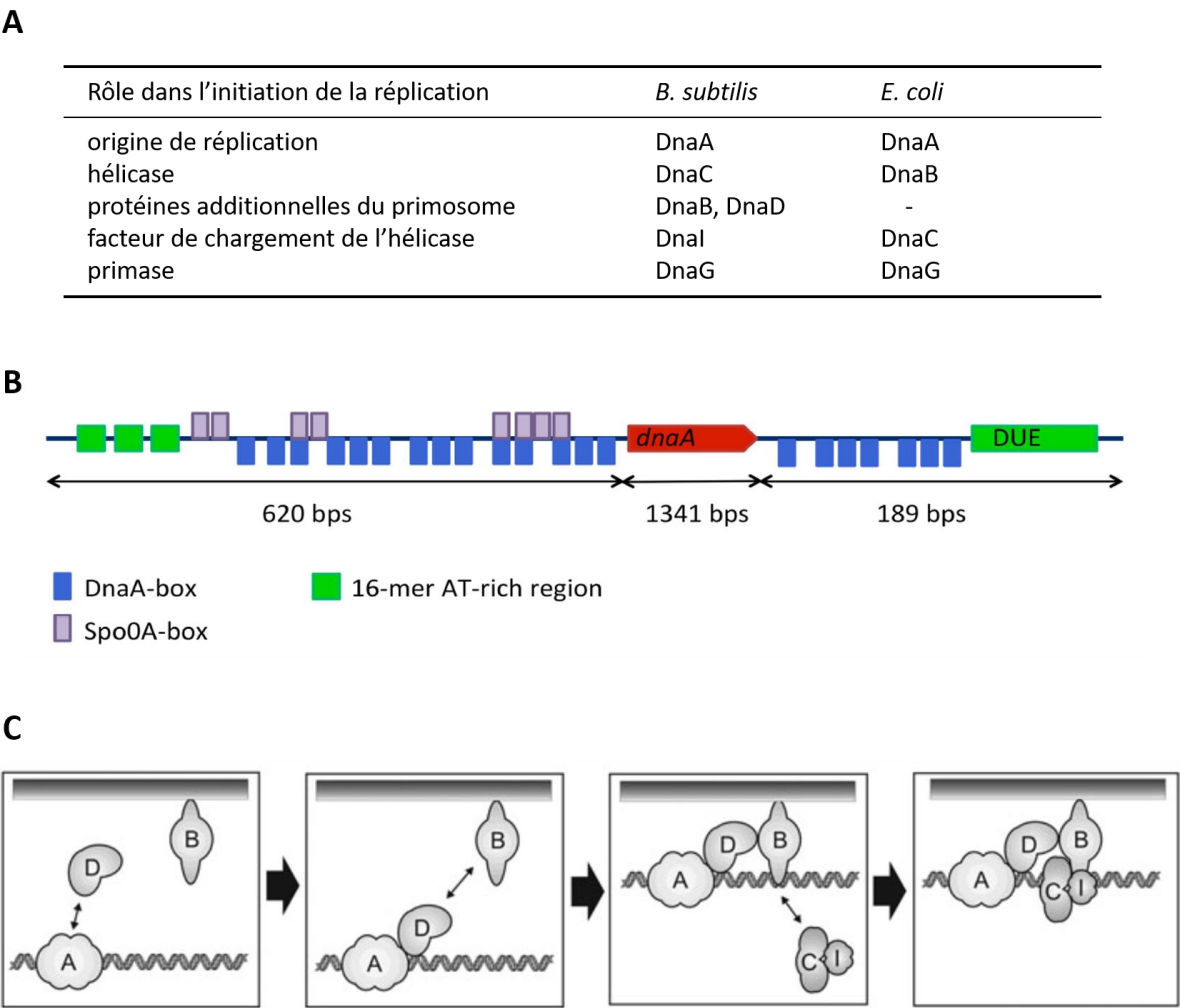


Figure 25 : Initiation de la réplication bactérienne. (A) Comparaison des protéines impliquées dans l’initiation de la réplication dans deux organismes modèles : *B. subtilis* et *E. coli* (adapté de Jameson & Wilkinson, 2017). **(B)** Origine de réplication (*oriC*) de *B. subtilis* (Jameson & Wilkinson, 2017). Les "DnaA-boxes" sont colorées en bleu, le gène *dnaA* en rouge, les DUE en vert et la "Spo0A-box" en violet. **(C)** Modèle de l’initiation de la réplication de *B. subtilis* au site *oriC* (Smits *et al*, 2010).

Le chargement de l’hélicase DnaC sur l’ADNsb est facilité par son facteur de chargement DnaI. DnaI et DnaB travailleraient ensemble pour assembler, à partir des monomères, des hexamères fonctionnels de l’hélicase directement sur l’ADNsb (Velten *et al*, 2003). DnaC recrute la primase DnaG et la pince glissante DnaN qui, par la suite, mobilisent les autres composants du replisome bactérien nécessaires à la synthèse de l’ADN (**Figure 24A** et **Tableau 2**). D’anciennes études faites avec des mutants thermosensibles ont indiqué que la synthèse d’un ARN était requis pour démarrer la réplication

(Murakami *et al*, 1976) suggérant que celui-ci servirait d'amorce pour l'initiation de la réplication sur le brin précoce. Cette étape du mécanisme d'initiation chez *B. subtilis* reste, cependant, méconnue.

I.5.2.2. Elongation

Pendant la phase d'élongation, l'ADN est synthétisé de manière processive par l'action d'un large complexe de sous-unités appelé réplisome. Le réplisome est constitué des deux polymérases (PolC et DnaE), de l'hélicase sous forme hexamérique (DnaC), de la primase (DnaG), de la pince glissante (DnaN) et de son facteur de chargement (DnaX₃HolA₁HolB₁) (**Figures 24A et 26, Tableau 2**). La protéine SsbA empêche la ré-hybridation des deux brins d'ADN sur lui-même et le protège de l'action des nucléases (Ayora *et al*, 2011).

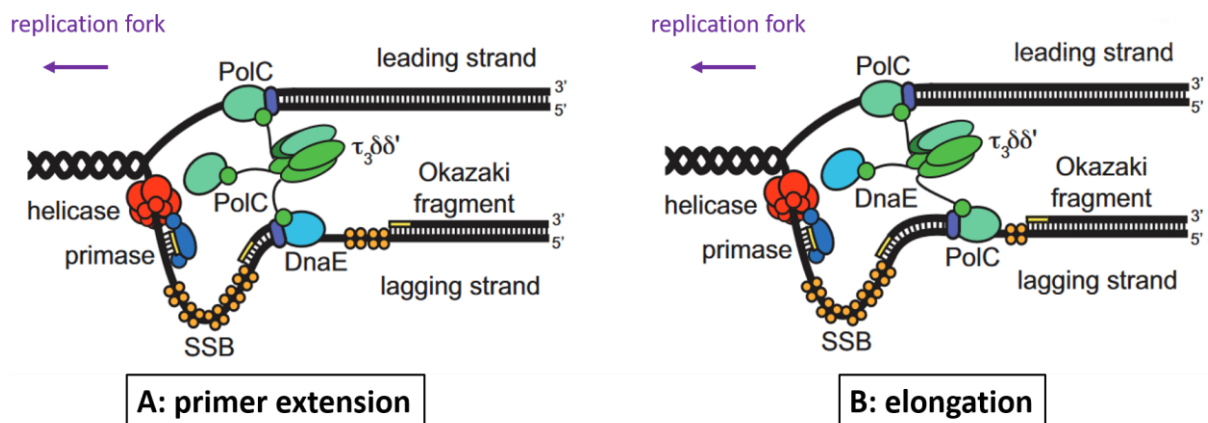


Figure 26 : Modèle de l'action des polymérases pendant la phase d'extension de l'amorce d'ARN par la protéine DnaE (A) et d'élongation de l'amorce d'ADN par la protéine PolC (B) pour la synthèse du brin retardé (Robinson *et al*, 2012).

Sanders et ses collègues ont montré que, *in vitro*, les 13 protéines constituant le réplisome bactérien étaient essentielles pour la synthèse du brin retardé mais que DnaG et DnaE ne l'étaient pas pour le brin précoce (Sanders *et al*, 2010). Ce travail confirme l'observation que les deux polymérases DnaE et PolC sont essentielles à la synthèse du brin tardif mais que seule la protéine PolC est requise pour le brin précoce (Dervyn *et al*, 2001). En effet, les deux peuvent synthétiser de l'ADN à partir d'amorces d'ADN mais seule la protéine DnaE peut démarrer à partir d'amorces d'ARN synthétisées par la primase. C'est la raison pour laquelle, sur le brin tardif, DnaE intervient en premier synthétisant de l'ADN à partir des amorces d'ARN ("primer extension", **Figure 26A**) avant que PolC ne prenne le relais pour synthétiser les fragments d'Okasaki ("elongation", **Figure 26B**) (Sanders *et al*, 2010). L'ADN ligase intervient en dernier pour souder entre eux les fragments d'Okasaki.

I.5.2.3. Terminaison

La terminaison de la réplication a lieu à un site de terminaison positionné directement à l'opposé de l'origine de réplication *oriC*. Pour *B. subtilis*, comme dans *E. coli*, la terminaison de la réplication est contrôlée par un mécanisme polaire dans lequel intervient le site *Ter* (Hill *et al*, 1987). La liaison de deux homodimères (un homodimère pour le site A et un homodimère pour le site B) de la protéine de terminaison RTP ("Replication Terminaison Protein") dans la région *Ter* est requise pour l'arrêt de la réplication (**Figure 27**). Lorsque la machinerie répliquative approche du site B (direction non permissive), le complexe ne peut plus progresser à cause de la liaison très forte entre RTP et le site B (**Figure 27**) (Duggin *et al*, 2005). Par contre, lorsque la machinerie approche le site A, la liaison entre le RTP et le site A (direction permissive) étant moins forte, la fourche est alors capable de progresser et la réplication continue.

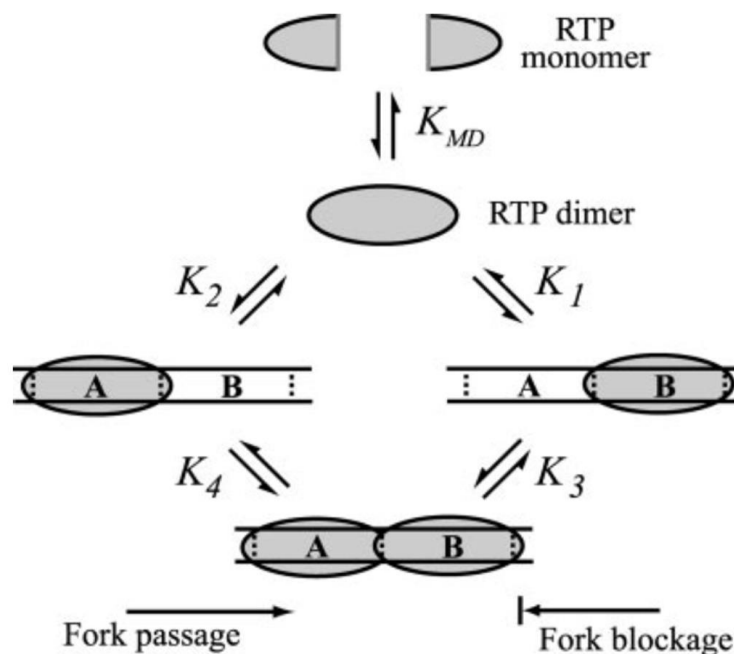


Figure 27: Modèle pour la terminaison de la réplication dans *B. subtilis* (Duggin *et al*, 2005). L'arrêt de la réplication au niveau du site *Ter* est dépendant de la constante d'affinité de RTP avec les sites A et B.

Des études sur la conformation de la protéine RTP montrent notamment que cette permissivité pourrait s'expliquer par une différence d'affinité entre le RTP et les sites A et B (**Figure 27**). Mais les conséquences structurales de la liaison au site A et la base moléculaire d'action des RTP sur la terminaison de la réplication restent encore à ce jour inconnues.

I.5.3. Condensation et structuration de l'ADN répliqué

La taille d'une molécule d'ADN d'un chromosome décondensé a toujours une taille supérieure au volume de la cellule (Holmes & Cozzarelli, 2000). Par exemple, un génome non condensé de *B. subtilis* (4,2 Mpb) représente 1,4 mm pour une longueur de bactérie autour de 0,004 mm et un volume

équivalent à $3 \mu\text{m}^3$ (en considérant une longueur de $4 \mu\text{m}$ et un diamètre de $1 \mu\text{m}$). Le processus de réplication est donc concomitant à un autre processus tout aussi complexe, la condensation de l'ADN bactérien. En effet, l'ADN doit être compacté tout en restant fonctionnel pour les grandes fonctions cellulaires telles que la transcription et la régulation des gènes, la réplication et la ségrégation fidèle des chromosomes.

Le génome de tout organisme doit être condensé. Dans les bactéries, l'ADN est efficacement compacté dans une structure appelée nucléoïde, un complexe macromoléculaire complexe qui assure simultanément la régulation des gènes et la ségrégation de l'ADN. Le repliement du nucléoïde et sa compaction s'opèrent par des protéines appelées cohésines et condensines.

Les protéines SMC ("Structural Maintenance of Chromosomes") sont des complexes ubiquitaires impliqués à différents niveaux hiérarchiques dans l'organisation chromosomale comme la réplication et la transcription. La grande majorité des bactéries possède deux sous-unités de SMC qui forment des homodimères. Elles sont généralement associées à une protéine de la famille des kleisines (ScpA) et à un troisième facteur (ScpB) (**Figure 28A**) (Mascarenhas *et al*, 2002). Les phénotypes de la délétion ou des mutations dans le gène *smc* montrent une structure du nucléoïde très fortement affectée et on note la présence de nombreuses cellules anucléées lorsque que *smc* est inactivé (Ireton *et al*, 1994). Ces observations vont dans le sens d'un rôle dans l'organisation du chromosome et possiblement dans sa ségrégation. Le complexe SMC-ScpA est recruté par la protéine Spo0J et se lie au chromosome de la bactérie au niveau des sites *parS* situés proche de l'origine de réplication (Gruber & Errington, 2009). Ce recrutement permettrait de structurer l'origine de réplication et aiderait à la ségrégation efficace du chromosome (Sullivan *et al*, 2009) par compaction de l'ADN au fur et à mesure de la réplication (Lemon & Grossman, 1998). Les complexes SMC vont migrer ainsi de manière concomitante sur les deux brins jusqu'au site de terminaison (**Figure 28B**) (Yuen & Gerton, 2018).

La structure du complexe SMC change significativement lorsqu'il entre en contact avec l'ADN. En effet, la condensation se fait selon un mécanisme d'extrusion de l'ADN (Diebold-Durand *et al*, 2017).

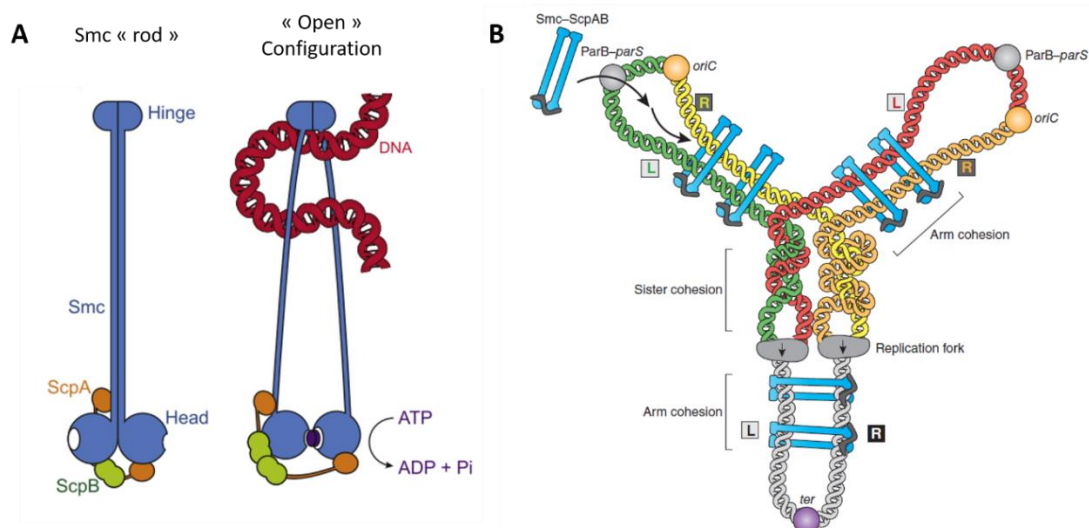


Figure 28 : Les protéines SMC organisent l'ADN et participent à sa condensation. (A) Modèle de transition de la condensine SMC-ScpAB lors de sa liaison à l'ADN (forme fermée à gauche et forme ouverte à droite) (Soh *et al*, 2015). **(B)** Le chargement du complexe SMC-ScpAB aux sites ParB-*parS* permet le rapprochement des deux bras du chromosome. Le complexe SMC-ScpAB peut migrer le long de la boucle d'ADN ou extruder les deux brins et permettre la séparation des deux molécules d'ADN (Bürmann & Gruber, 2015). Les protéines SMC participent à la condensation de l'ADN à partir d'un site proche de l'origine de réplication jusqu'au site de terminaison en même temps que la réplication a lieu.

En plus des protéines SMC, il existe aussi chez *B. subtilis* la protéine de liaison à l'ADN, HBSu ("Histone-like DNA-binding protein"). Les protéines de cette famille, essentielles à la cellule, se lient de manière non spécifique à l'ADN. Elles se retrouvent associées au nucléoïde bactérien jouant un rôle important dans sa compaction. Leur absence affecte aussi bien la croissance de la cellule que la structure du nucléoïde. En effet, lorsque la quantité d'HBSu est trop faible, les cellules présentent un nucléoïde relâché dans la cellule (**Figure 29-1**) (Köhler & Marahiel, 1997).

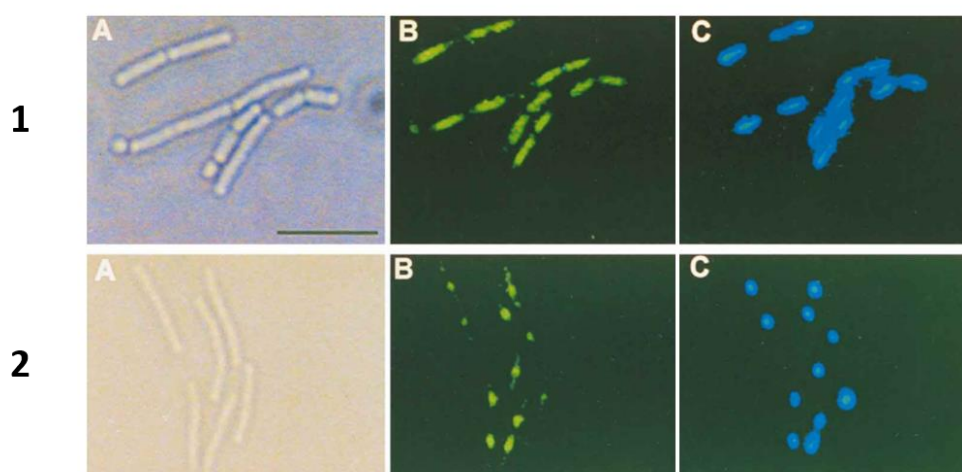


Figure 29 : Localisation de la protéine de fusion HBSuGFP (Köhler & Marahiel, 1997). Les cellules ont été poussées sans (1) ou avec induction (2) de la protéine (His₆)HBSu. **(A)** contraste de phase, **(B)** fluorescence verte de HBSuGFP, **(C)** fluorescence DAPI. L'échelle en 1A représente 5 µm.

Les protéines de type cohésines ou condensines sont essentielles aux bactéries. Elles participent à l'organisation et au réarrangement du chromosome selon des mécanismes très complexes. Leur analyse, grâce notamment à des approches de Hi-C et d'imagerie super-résolution, permet aujourd'hui d'avoir une vision plus fine de leur action sur l'architecture des génomes.

L'analyse de cartes de contact génomique du chromosome de *B. subtilis* fait apparaître deux diagonales (**Figure 30A**) (Marbouty *et al*, 2015). La principale diagonale, la plus intense, montre qu'il existe des interactions fréquentes à faible distance dans le chromosome entre TADs ("Topological Associated Domains"). De manière intéressante, une diagonale secondaire apparaît, plus faible en intensité (**Figure 30A**), mettant en évidence l'existence de contacts à longue distance, c'est-à-dire entre les deux bras du chromosome lui-même (**Figure 30B**). Ces contacts à longue distance se font de manière symétrique, de l'origine de réplication jusqu'au site de terminaison. Cette structuration est dépendante des protéines SMC notamment les contacts inter- bras (voir aussi **Figure 28B**).

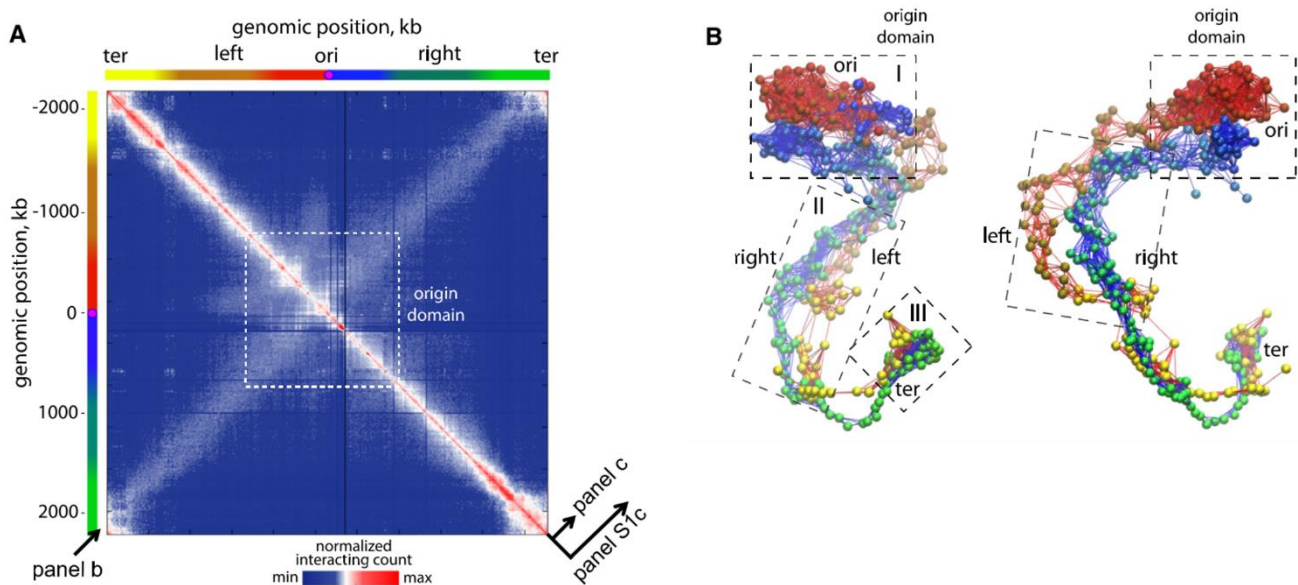


Figure 30 : Organisation du chromosome complet de *B. subtilis* (Marbouty *et al*, 2015). **(A)** Carte de contact génomique à partir d'une population bactérienne poussée en milieu riche. Les axes X et Y représentent les coordonnées génomiques centrées sur l'*oriC*. Les bras gauche et droit sont respectivement représentés par des gradients rouge-jaune et bleu-vert. Les flèches noires soulignent les motifs d'intérêt présentés en **B**. La boîte blanche représente le domaine d'origine comme défini en **B**. L'échelle de couleur reflète la fréquence des contacts entre deux régions du génome (en unité arbitraire) à partir du bleu (contacts rares) au rouge (contacts fréquents). **(B)** Représentation tridimensionnelle des contacts à partir de la carte de contact en **A**. Le chromosome est représenté comme une chaîne de billes (1 bille = 4 kb). Le code-couleur des billes reflète la position génomique linéaire le long du chromosome.

I.6. Les objectifs de la thèse

Les études menées au laboratoire ont montré que la réplication du génome viral avait lieu dans un foyer bien défini du cytoplasme de la cellule (Jakutyte *et al*, 2011). Cependant, les mécanismes permettant sa structuration, la temporalité de recrutement des protéines impliquées dans ce processus et sa communication avec l'assemblage de particule virale n'ont pas été mis en évidence. Ainsi, plusieurs objectifs ont été définis dans ce travail de thèse.

Le premier a été de quantifier l'effort énergétique et biosynthétique de la cellule associé à son infection par le bactériophage SPP1.

Le deuxième portait sur la réplication de l'ADN du phage et en particulier sur la caractérisation dans un contexte cellulaire des protéines retrouvées associées au foyer de réplication de l'ADN et les conditions nécessaires à leur recrutement. Par la suite, la dynamique spatio-temporelle de l'usine de réplication pendant le cycle infectieux a été suivie ainsi que les facteurs qui la contrôlent.

Dans un troisième temps, il a été analysé la compartimentation des différentes étapes de l'assemblage des particules virales dans le cytoplasme bactérien pour comprendre, notamment, comment l'ADN synthétisé dans le foyer de réplication était ciblé pour l'encapsidation dans les procapsides virales. Des mutants bloquant différentes étapes de l'assemblage viral ont été utilisés pour figer et ainsi caractériser ce processus à différentes étapes.

Enfin, le dernier objectif a été de suivre en temps réel les foyers de réplication de l'ADN phagique et des particules virales pendant tout le cycle infectieux pour caractériser leur dynamique et l'impact de l'infection sur les processus cellulaires.

L'ensemble de ces travaux vise à comprendre comment l'infection par SPP1 va détourner les ressources cellulaires et réorganiser l'espace cytoplasmique de *B. subtilis* pour optimiser la multiplication virale dans l'environnement cellulaire.

Pour répondre à ces questions, ces processus ont été étudiés dans un contexte infectieux dynamique par des approches de microscopie de fluorescence sur pad d'agarose, en microfluidique ou par des techniques de FRAP ("Fluorescence Recovery After Photobleaching").

Matériel et méthodes

II. Matériel et Méthodes

II.1. Le matériel

II.1.1. Les milieux

Milieu riche

LB : Luria Browth (pour 1L)

10 g bactotryptone

5 g extraits de levure

10 g NaCl

=> ajusté à pH 7,5

Les milieux de composition définie

Milieu minimum MIII

1X Milieu MIII 10X

10 mM (NH₂)SO₄

0,15 mM MnSO₄

15 mM MgSO₄

0,7 % glucose

0,04 % d'hydrolysate de caséine

0,15 µM FeCl₃

50 µg.mL⁻¹ tryptophane

50 µg.mL⁻¹ leucine

Milieu minimum MIII 10X

100 mM MgSO₄, 7H₂O

10 mM citrate de sodium, 2H₂O

10 mM asparagine

16,3 mM K₂HPO₄

24,3 mM KH₂PO₄

Solution SP1 (pour 1L)

14 g K₂HPO₄

6 g KH₂PO₄

1 g tri-sodium citrate, 2H₂O

2 g (NH₂)SO₄

0,2 g MgSO₄, 7H₂O

=> ajusté à pH 7,2

Milieu GM1 (pour 100 mL)

96,55 mL de solution SP1

1 mL d'extraits de levure 10 %

1 mL d'hydrolysate de caséine 5 %

1,25 mL de glucose 40 %

100 µL de tryptophane 5 mg.mL⁻¹

100 µL de méthionine 5 mg.mL⁻¹

Milieu GM2 (pour 10 mL)

9,65 mL de milieu GM1

0,1 mL de CaCl₂ 0,05 M

0,25 mL de MgCl₂ 0,1 M

II.1.2. Les souches bactériennes

<u>Souche</u>	<u>Caractéristiques (les concentrations sélectives d'antibiotiques utilisées sont listées dans le Tableau 4)</u>
DH5α	Souche d' <i>E. coli</i> , utilisée pour le clonage et pour la préparation de cellules compétentes (Hanahan, 1983)
YB886	Dérivée de la souche <i>B. subtilis</i> 168, délétée des prophages PBSX et SPβ, souche de référence pour la titration et la multiplication de SPP1, souche non permissive (Yasbin & Ledbetter, 1978)
HA101B	Dérivée de la souche de <i>B. subtilis</i> 168, souche permissive, utilisée pour l'amplification de phages <i>sus</i> (Okubo & Yanagida, 1968)
BG295	Dérivée de la souche de <i>B. subtilis</i> YB886, souche permissive, utilisée pour l'amplification de phages <i>sus</i> (Dröge <i>et al</i> , 2000)
GSY10000	Dérivée de la souche YB886, expression de <i>lacI-cfp</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-cfp</i>) Em ^r Lin ^r
GSY10004	Dérivée de la souche YB886, expression de <i>lacI-mcherry</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) Em ^r Lin ^r
GSY10006	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>polC-gfp</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-polC-gfp</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10007	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>dnaX-gfp</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-dnaX-gfp</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10008	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>gfp-dnaN</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-gfp-dnaN</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10010	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>gfp-ssbA</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-gfp-ssbA</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10011	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>gfp-dnaB</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-gfp-dnaB</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10012	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>dnaE-gfp</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-dnaE-gfp</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10014	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>gfp-dnaC</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-gfp-dnaC</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10024	Dérivée de la souche GSY10004, expression de <i>12-mcitrine</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-12-mcitrine</i>) Em ^r Lin ^r Kan ^r
GSY10025	Dérivée de la souche GSY10004, expression de <i>mcitrine-11</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-mcitrine-11</i>) Em ^r Lin ^r Kan ^r
BG1837	Dérivée de la souche GSY10004, expression de <i>34.1-mcitrine</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-34.1-mcitrine</i>) Em ^r Lin ^r Kan ^r
BG1833	Dérivée de la souche GSY10004, expression de <i>35-mcitrine</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-35-mcitrine</i>) Em ^r Lin ^r Kan ^r
BG1829	Dérivée de la souche GSY10004, expression de <i>40-mcitrine</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-40-mcitrine</i>) Em ^r Lin ^r Kan ^r

GSY10031	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>mcfp-dnaG</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-mcfp-dnaG</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10051	Dérivée de la souche GSY10000 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-cfp</i>) <i>trpC2 spo0J::</i> (<i>tetO₁₆₇</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-tetR-mcherry</i>) Em ^r Lin ^r Neo ^r Spc ^r
GSY10060	Dérivée de la souche GSY10004, expression ectopique de <i>mcfp-dnaX</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-mcfp-dnaX</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r
GSY10061	Dérivée de la souche GSY10060, expression ectopique de <i>mcfp-dnaX</i> et 40-mcitrine ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-mcfp-dnaX</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-40-mcitrine</i>) Em ^r Lin ^r Spc ^r Kan ^r
CAG74209	Dérivée de la souche de <i>B. subtilis</i> 168T ⁺ , souche parentale de la librairie des "knock-down" CRISPR (Peters <i>et al</i> , 2016) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) Em ^r
BEC15940	Dérivée de la souche CAG74209 ; <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{veg}-sgRNA(smc)</i>) Em ^r Cm ^r
BEC22790	Dérivée de la souche CAG74209 ; <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{veg}-sgRNA(hbs)</i>) Em ^r Cm ^r
GSY10063	Dérivée de la souche YB886 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) Spc ^r
GSY10066	Dérivée de la souche GSY10063 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) Spc ^r Em ^r
GSY10088	Dérivée de la souche GSY10066 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{veg}-sgRNA(hbs)</i>) Spc ^r Em ^r Cm ^r
GSY10089	Dérivée de la souche GSY10066 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{veg}-sgRNA(smc)</i>) Spc ^r Em ^r Cm ^r
GSY10090	Dérivée de la souche GSY10066, expression de 12-mcitrine ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-12-mCitrine</i>) Spc ^r Em ^r Kan ^r
GSY10091	Dérivée de la souche GSY10090, expression du gene 12-mcitrine ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}-dcas9</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-12-mCitrine</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{veg}-sgRNA(smc)</i>) Spc ^r Em ^r Kan ^r Cm ^r
RCL684	Dérivée de la souche YB886, expression de <i>lacI-mneongreen</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mneongreen</i>) Ery ^r Lin ^r
GSY10079	Dérivée de la souche GSY10004, expression de 39,40-mcitrine ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-39,40-mcitrine</i>) Ery ^r Lin ^r Kan ^r
GSY10092	Dérivée de la souche GSY10079, expression de 39,40-mcitrine avec le plasmide pAL47 ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-39,40-mcitrine</i>) (pAL47) Ery ^r Lin ^r Kan ^r Cm ^r
GSY10081	Dérivée de la souche GSY10025, expression de <i>mcitrine-11</i> et 12- <i>mcfp</i> ; <i>thrC::</i> (<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i>) <i>sacA::</i> (<i>P_{spac}-mcitrine-11</i>) <i>amyE::</i> (<i>P_{xyI}-12-mcfp</i>) Ery ^r Lin ^r Kan ^r Spc ^r

Tableau 4 : Concentrations finales sélectives des antibiotiques pour *E. coli* et *B. subtilis*.

Antibiotique	Résistance dans <i>E. coli</i>	Résistance dans <i>B. subtilis</i>
Chloramphénicol (Cm ^r)	10 µg.mL ⁻¹	5 µg.mL ⁻¹
Erythromycine (Em ^r)	30 µg.mL ⁻¹	0,5 µg.mL ⁻¹
Kanamycine (Kan ^r)	50 µg.mL ⁻¹	5 µg.mL ⁻¹
Lincomycine (Lin ^r)		12,5 µg.mL ⁻¹
Spectinomycine (Spc ^r)		100 µg.mL ⁻¹
Ampicilline (Amp ^r)	100 µg.mL ⁻¹	
Néomycine (Neo ^r)		5 µg.mL ⁻¹

II.1.3. Les bactériophages

SPP1wt	Phage sauvage (Riva <i>et al</i> , 1968)
SPP1delX110	Phage dérivé de SPP1wt avec la délétion <i>delX</i> (Tavares <i>et al</i> , 1992)
SPP1delX110lacO ₆₄	Phage dérivé de SPP1delX110 dans laquelle 64 opérateurs de <i>lacO</i> ont été insérés (Jakutyte <i>et al</i> , 2011)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus12	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 40 (Pedré <i>et al</i> , 1994)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus34.1	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 34.1 (S. Ayora)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus35	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 35 (S. Ayora)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus31	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 13 (Becker <i>et al</i> , 1997)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus7	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 11 (Becker <i>et al</i> , 1997)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus115	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 6 (Tavares <i>et al</i> , 1992)
SPP1delX110lacO ₆₄ sus19	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une mutation suppresseur dans le gène 2 (Chai <i>et al</i> , 1992)
SPP1delX110lacO ₆₄ Δ12	Phage SPP1delX110lacO ₆₄ avec une délétion interne dans le gène 12 (Zairi <i>et al</i> , 2014)

II.1.4. Les plasmides

<u>Vecteur</u>	<u>Caractéristiques et sélection dans <i>E. coli</i> (les concentrations d'antibiotiques sont listées dans le Tableau 4)</u>	<u>Vecteur parental</u>
pJ1	gène synthétique <i>mcherry</i> (Kan ^r) reçu d'A.O. Henriques (ITQB, Portugal)	
pHP13	Vecteur navette (Em ^r Cm ^r) (Haima <i>et al</i> , 1987)	pUC9
pKL190	<i>thrC::P_{pen}-lacI(Δ11)-cfp</i> (Amp ^r) (Lemon & Grossman, 2000)	pDG795
pSacKan	<i>sacA::kan</i> (Amp ^r)	pUC18
pJexpress	gène synthétique <i>mcitrine</i> (Amp ^r) (DNA2.0)	
pDH88	<i>P_{spac-1}-mIs-P_{pen}-lacI</i> (Amp ^r) (Henner, 1990)	pBR322
pDR200	<i>P_{lac}-LacZ'-mcfp</i> (Amp ^r) (Doan <i>et al</i> , 2005)	pDrive (Qiagen)
pSG1190	<i>amyE::P_{xyI}-cfp</i> (Amp ^r)	} pSG1729 (Lewis & Marston, 1999)
pSG1192	<i>amyE::P_{xyI}-cfp</i> (Amp ^r)	
pAL1	<i>P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i> (Em ^r Cm ^r)	pHP13
pPT300	<i>thrC::P_{pen}-lacIΔ11-mcherry</i> (Amp ^r)	pKL190
pAL19	<i>sacA::P_{spac}</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL20	<i>sacA::P_{spac}-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL21	<i>sacA::P_{spac}-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL24	<i>sacA::P_{spac}-12-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL25	<i>sacA::P_{spac}-mcitrine-11</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL28	<i>amyE::P_{xyI}-mcfp</i> (Amp ^r)	pDG1190
pAL29	<i>amyE::P_{xyI}-mcfp</i> (Amp ^r)	pDG1192
pAL31	<i>amyE::P_{xyI}-mcfp-dnaG</i> (Amp ^r)	pDG1190
pAL36	<i>amyE::P_{xyI}-mcfp-dnaX</i> (Amp ^r)	pDG1190
pAL44	<i>amyE::P_{xyI}-12-mcfp</i> (Amp ^r)	pDG1192
pML1837	<i>sacA::P_{spac}-34.1-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pML1836	<i>sacA::P_{spac}-35-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pML1829	<i>sacA::P_{spac}-40-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL46	<i>sacA::P_{spac}-39,40-mcitrine</i> (Amp ^r)	pSacKan
pAL40	<i>lacO₆₄</i> , délétion de l'origine de répllication pTA1060 de <i>B. subtilis</i> (Cm ^r)	pJW101 (Wang <i>et al</i> , 2004)
pAL47	gènes SPP1 37.3-38, <i>lacO₆₄</i> (Cm ^r)	pAL40
pUC19-EJ1	vecteur avec les amplicons de SPP1, de <i>B. subtilis</i> et T7 (qPCR)	pUC19

II.1.5. Les amorces

II.1.5.1. Amorces utilisées pour le clonage

La région en gras indique les sites de restriction ajoutés à la séquence pour le clonage.

Amorce 1	CTG CTCGAG GGTTCCGGAATGGTCAGCAAGGGAGAGG
Amorce 2	TTC GGATCC GATGCTTATTTGTATAATTCGTCCATTCC
Amorce 3	CCG GAA TTCAAAGGAGAAATCGATTAGACGCTCGAGCTCGAA GGCAGTGGAATGGTAAGCAAAGGCGAGGAAGCTTTCACAGGCG
Amorce 4	CG GGATCC TTATTATTTATACAGTTCATCCATACCATGAGTT ATGCCAGCTGCCG
Amorce 5	CCCC ATCGAT ATGTCTAAGCGTATACCGGTTTCTTGC
Amorce 6	CGC GGATCC TTATTACTCGAGAGTCGTTCCGCCGCCG
Amorce 7	TAGG ATCGATA AAATGGCGAG
Amorce 8	CTATAC ACTCGAGT GCCTTTTGC
Amorce 9	CCCC ATCGAT ATGAATCCAGAAGAAAAAACG
Amorce 10	CCCC CTCGAG ACGATCATCAAACGAC
Amorce 11	CCCC ATCGAT ATGAGTTTGAAAGAGCAGTTAGG TGAAGAGTTGTACG
Amorce 12	CGC GGATCC TTATTACTCGAGCTGTGCTTCTGCTTGT AGCTTCTTCGC
Amorce 13	CCCC ATCGAT ATGATTGAGAAAGATGTCGTTTCAG ATTTTGAAAGC
Amorce 14	CGC GGATCC TTATTACTCGAGACGATCATCAAACGACGT TCTAAATTTACAAAATTGC
Amorce 15	CCGAG GTACCAT GGTTTCAAAGGCG
Amorce 16	CGAG GGATCCC CTTATAAAGTTCGTCCATGC
Amorce 17	CGC GGATCC ACTTAGAAGGATCTGGAATGGGA AATCGGATACC
Amorce 18	CGAATTC ATCGAT TTATTTTAAAGATCGGTTCAATGTAACG
Amorce 19	CGC GGATCC ACTTAGAAGGATCTGGAATGAGTTA CCAAGCTTTATATCG
Amorce 20	CCG CTCGAG TTAGTCTTTTATTTCATTAATCC
Amorce 21	CGAG AATTCAT GGTTTCAAAGGCG
Amorce 22	CGA ACTAG TTTATTACTTATAAAGTTCGTCCATGCC
Amorce 23	CCG GGTACCAT GTCTAAGCGTATACCGGTTTCTTGC
Amorce 24	CCG CTCGAG CGGTCCAGATCCTTCTAAAGTCGTTCCGCCG CCGCTTG
Amorce 25	GT CAGGTACCTCATACTTCTAGAC AGGGATCTAGGTG AAGATCCTTTTG

Amorce 26	GG CAGGT ACCTTGCAAGATAAGAAAGAAAAGGATTTTTCGC
Amorce 27	GT CAGGT ACCCGGGGAAACCCGGCTTTTTTATTTTGG
Amorce 28	CGGTT CTAG ACAATCATTCAAATGCCTCCTCCAATTCTGC

II.1.5.2. Amorces utilisées pour la PCR quantitative

SPP1-G6-F1	CGGGCTGAAATACCTGTGGA
SPP1-G6-R1	TAGCCCCTCCTCCGATTGTT
BsGyrA-F1	GAATACGGCAGAACGGCAAA
BsGyrA-R1	TTCGTTTTGAAACCCCATGC
pUC19-F1	GGTGTAGGTCGTTCTGCTCCA
pUC19-R1	GCTGCCAGTGGCGATAAGTC
T7p07-F1	TGGTGGCTATTGGGCTAACG
T7p07-R1	GGCGACCGCTAGGACTTTCT

II.2. Les méthodes

II.2.1. Biologie moléculaire

II.2.1.1. Stratégie de clonage

II.2.1.1.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 50 µL. Le mélange réactionnel contient la matrice (50-100 ng), les amorces (0,5 µM), les dNTPs (200 µM) et la polymérase (Taq ou Phusion, New England Biolabs).

Tableau 5 : Programmes d'amplification de l'ADN par PCR. Lorsqu'il y a deux informations dans la case, la première concerne la polymérase Phusion et la deuxième concerne la polymérase Taq (souligné).

Etape	Température	Durée
1- Dénaturation	98°C	1 minute
2- Amplification (30 cycles)	98°C	10 secondes / <u>60 secondes</u>
	45-65°C	30 secondes / <u>60 secondes</u>
	72°C / <u>68°C</u>	20 secondes par kb / <u>60 secondes par kb</u>
3- Extension finale	72°C / <u>68°C</u>	10 minutes

La température d'hybridation est ajustée en fonction du T_m des amorces utilisées. La durée d'élongation est définie en fonction de la taille du fragment à amplifier et de la polymérase choisie. Les programmes de PCR utilisés sont compilés dans le **Tableau 5**.

II.2.1.1.2. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % dans du tampon TAE 1X (TAE 20X : 0,8 M Tris-HCl pH 8,5, 0,45 M acide acétique et 0,5 M EDTA, ajusté à pH 8,5). Les fragments sont séparés en fonction de leur masse moléculaire puis colorés au bromure d'éthidium (BET). Les fragments sont découpés sur gel puis purifiés avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

II.2.1.1.3. Clonage

Le plasmide destiné à recevoir l'insert est linéarisé par digestion enzymatique et purifié sur gel d'agarose. Le vecteur et l'insert purifiés sont assemblés par ligation pendant la nuit à 16°C en présence de la T4 DNA ligase suivant les instructions du fournisseur (New England Biolabs). Les stratégies de clonage sont décrites dans la section II.2.1.2.

II.2.1.1.4. Transformation d'*E. coli* et criblage des transformants

Les réactions de ligation (10 à 20 µL) sont transformées dans 100 µL de bactéries chimio-compétentes DH5α (section II.2.2.2.1). Les colonies obtenues sont prélevées etensemencées dans du milieu sélectif (milieu riche LB supplémenté avec les antibiotiques adéquats) et incubées à 37°C pendant la nuit. L'ADN plasmidique est extrait et purifié en utilisant le kit d'extraction NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel). Le plasmide purifié est séquencé pour vérifier la construction obtenue. Les souches sélectionnées sont congelées à -80°C dans du milieu LB supplémenté avec 20 % de glycérol.

II.2.1.2. Constructions des souches

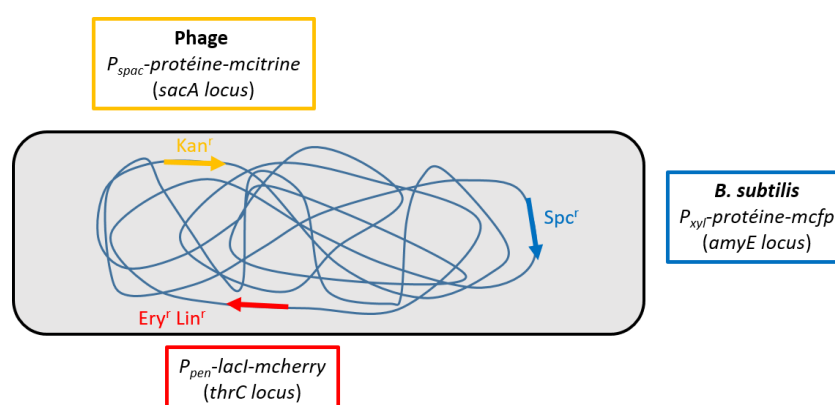


Figure 31 : Localisation dans le chromosome de *B. subtilis* des gènes codant des fusions avec des protéines rapportrices fluorescentes. La stratégie générale utilisée pour les constructions et leur insertion dans les *loci* du chromosome bactérien sont schématisées. Le gène codant pour la protéine fluorescente mCherry est fusionné au gène *lacI* pour la localisation de l'ADN des phages dérivés de SPP1delX110lacO₆₄, le gène codant pour la protéine fluorescente mCitrine aux gènes de SPP1 et le gène codant pour la protéine fluorescente mCFP aux gènes de la bactérie. Lorsque des variations de cette stratégie ont été utilisées, elles sont décrites ci-dessous.

II.2.1.2.1. Fusion *lacI-mcherry*, rapportrice de l'ADN viral, insérée dans le locus *thrC*

Le gène *mcherry* (dont la séquence a été optimisée pour son utilisation dans *B. subtilis*) est amplifié par PCR à partir du vecteur pJ1 (reçu d'A.O. Henriques) avec les amorces 1 et 2. Le produit de PCR obtenu est digéré par les enzymes de restriction XhoI et BamHI et cloné dans le vecteur pHP13 digéré avec les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu, pAL1, est ensuite digéré par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI et inséré dans le plasmide pKL190 digéré avec les mêmes enzymes pour donner le vecteur pPT300. Ce plasmide est linéarisé par digestion avec l'enzyme XbaI et utilisé pour transformer la souche YB886. La fusion LacI-mCherry, insérée dans le locus *thrC*, permet l'obtention de la souche GSY10004.

II.2.1.2.2. Fusions de gènes de SPP1 au gène *mcitrine* et insertion dans le locus *sacA*

Le vecteur pSacKan (obtenu du Bacillus Gene Stock Center) est modifié pour fusionner les gènes codant pour les protéines du phage (gp11, gp12, gp34.1, gp40 et gp39-gp40) au gène de la protéine fluorescente mCitrine dont la séquence a été optimisée pour son utilisation dans *B. subtilis* (pJexpress-DNA2.0). Le promoteur *Pspac* est amplifié à partir du vecteur pDH88, digéré avec les enzymes de restrictions BamHI et XbaI et inséré dans le vecteur pSacKan digéré avec les enzymes de restriction BglII et XbaI pour obtenir le vecteur pAL19. Pour les fusions des protéines de SPP1 au N-terminus de la mCitrine (protéine phage-mCitrine), le gène *mcitrine* est amplifié à partir du vecteur pJexpress avec les amorces 3 et 4 et inséré dans le pAL19 après digestion avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. On obtient le vecteur pAL21. Pour les fusions des protéines de SPP1 au C-terminus de la mCitrine (mCitrine-protéine phage), pJexpress est digéré avec les enzymes BamHI et EcoRI pour extraire le gène *mcitrine* et inséré dans le pAL19 digéré avec les mêmes enzymes de restrictions. On obtient le vecteur pAL20.

Les gènes *12*, *34.1*, *40* et *39,40* de SPP1 sont respectivement amplifiés avec les amorces 5/6, 7/8, 9/10 et 11/12 et insérés dans le pAL21 après digestion avec les enzymes ClaI et XhoI.

Le gène *11* de SPP1 est amplifié avec les amorces 13 et 14 et inséré dans le vecteur pAL20 entre les sites de restriction ClaI et BamHI.

Les 5 plasmides obtenus avec les gènes de SPP1 sont linéarisés avec l'enzyme Scal et utilisés pour transformer la souche GSY10004.

II.2.1.2.3. Fusions de gènes de l'hôte au gène *mcfp* et insertion dans le locus *amyE*

Le vecteur pSG1190 est modifié pour exprimer des fusions de la protéine fluorescente mCFP en N-terminus de protéines de l'hôte. La séquence de *mcfp* a été optimisée pour son utilisation dans *B. subtilis* (reçue de T. Doan et de D. Rudner). Le gène *mcfp* est amplifié à partir du vecteur pDR200

avec les amorces 15 et 16 et inséré dans le vecteur pDG1190 entre les sites de restrictions BamHI et KpnI pour remplacer le gène *cfp* non-optimisé. On obtient le vecteur pAL28. Les gènes *dnaG* et *dnaX* de *B. subtilis* sont respectivement amplifiés avec les amorces 17/18 et 19/20. Les produits de PCR sont ensuite respectivement digérés avec les enzymes BamHI/ClaI et BamHI/XhoI puis insérés dans le pAL28 lui-même digéré par les mêmes enzymes. Les plasmides obtenus avec les gènes de l'hôte (pAL31 et pAL36) sont linéarisés avec l'enzyme SacI et utilisés pour transformer la souche GSY10004.

II.2.1.2.4. Fusion du gène 12 de SPP1 au gène *mcfp* et insertion dans le locus *amyE*

Le vecteur pSG1192 est modifié pour exprimer la fusion de la protéine fluorescente mCFP en C-terminus de la protéine gp12 du phage. La séquence de *mcfp* a été optimisée pour son utilisation dans *B. subtilis* (reçue de T. Doan et de D. Rudner). Le gène *mcfp* est amplifié à partir du vecteur pDR200 avec les amorces 21 et 22 et inséré dans le vecteur pDG1192 entre les sites de restrictions EcoRI et SpeI pour remplacer le gène *cfp* non-optimisé. On obtient le vecteur pAL29. Le gène 12 de SPP1 est amplifié avec les amorces 23 et 24. Le produit de PCR est ensuite digéré avec les enzymes KpnI et XhoI puis inséré dans le pAL29 lui-même digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu avec le gène 12 de SPP1 (pAL44) est linéarisé avec l'enzyme SacI et utilisé pour transformer la souche GSY10025.

II.2.1.2.5. Fusions de gènes de l'hôte au gène *gfp* et insertion dans le locus *amyE*

L'ADN chromosomique des souches exprimant les fusions *polC-gfp*, *dnaX-gfp*, *gfp-dnaN*, *gfp-ssbA*, *gfp-dnaB*, *dnaE-gfp* et *gfp-dnaC* (Meile *et al*, 2006) est purifié et transformé dans la souche GSY10004.

II.2.1.2.6. Système minimal de réplication *in vivo*

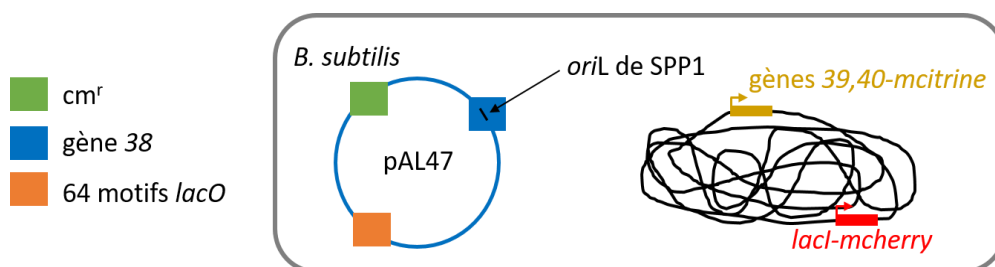


Figure 32 : Schéma du système minimal de réplication de SPP1 en utilisant un système de trans-complémentation dans *B. subtilis* (souche GSY10092). Les gènes codant pour les protéines gp39 et gp40-mCitrine ont été insérés dans le chromosome bactérien sous le contrôle du promoteur *Pspac*. Les gènes codant pour les protéines gp37.3 et gp38 ont été clonés dans un plasmide incapable de se répliquer dans *B. subtilis* générant le plasmide pAL47. Gp38 en complexe avec les protéines gp39 et gp40 va se lier à *oriL*, localisé sur son propre gène, pour initier la réplication. 64 motifs répétés *lacO* sont également présents sur le plasmide pour le visualiser dans la bactérie avec la protéine LacI-mCherry.

Le vecteur pJW101 (Wang *et al*, 2004) est utilisé comme matrice pour amplifier l'origine de réplication de pUC9 dans *E. coli* et la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pHP13 avec les amorces 25 et 26. Le fragment obtenu est digéré par l'enzyme de restriction KpnI puis une ligation est faite pour que le fragment se recircularise générant le vecteur pAL40, amplifié dans *E. coli*. Un fragment contenant les gènes 37.3 et 38 est amplifié avec les amorces 27 et 28 et inséré dans le pAL40 entre les sites de restriction XbaI et KpnI. Le plasmide résultant, pAL47, est transformé dans *B. subtilis* GSY10079 qui exprime les gènes 39 et 40-*mcitrine* sous le contrôle du promoteur *Pspac* générant GSY10092 (Figure 32).

II.2.2. Microbiologie et génétique

II.2.2.1. Préparation des bactéries (pré-)compétentes

II.2.2.1.1. *E. coli*

Une culture de nuit de bactéries *E. coli* est diluée au 1:200 dans du milieu LB frais et incubée à 37°C pendant 2 à 3 heures jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,6. Les cellules sont placées sur la glace pendant 15 minutes puis elles sont centrifugées à 4 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 100 mL de 50 mM $CaCl_2$ et gardé sur la glace pendant 20 minutes. Les cellules sont centrifugées à 4 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et les bactéries sont reprises dans 20 mL de tampon (50mM $CaCl_2$ et 20 % glycérol). Des aliquots de 100 μ L et 500 μ L de cellules *E. coli* compétentes sont congelés dans un bain de carboglace et conservés à -80°C.

II.2.2.1.2. *B. subtilis*

Les bactéries *B. subtilis* (pré-)compétentes sont préparées selon le protocole de Boylan *et al* (1972). Une culture de nuit de bactéries est diluée au 1:50 dans 10 mL de GM1 et incubée à 37°C avec un suivi de la courbe de croissance toutes les 15 minutes. 90 minutes après la fin de la phase exponentielle, 20 % de glycérol sont ajoutés à la culture puis le mélange est agité vigoureusement pour que le mélange cellules-glycérol soit homogène. Des aliquots de 500 μ L de cellules (pré-)compétentes sont congelés dans un bain de carboglace et conservés à -80°C.

II.2.2.2. Transformations bactériennes

II.2.2.2.1. *E. coli*

100 μ L de cellules *E. coli* compétentes (section II.2.2.1.1) sont incubés dans la glace avec 10-20 μ L de plasmide à transformer ou avec 10-20 μ L d'eau (contrôle négatif) pendant 30 minutes. Un choc thermique à 42°C est réalisé pendant 45 secondes. Les cellules sont ensuite placées pendant 5 minutes dans la glace. 900 μ L de LB sont ajoutés aux différents échantillons puis les cellules sont incubées

pendant 1 heure à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 8 000 g et les culots obtenus sont resuspendus dans 100 µL de milieu LB frais. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB Agar 2 % contenant les antibiotiques adéquats et incubées pendant la nuit à 37°C.

II.2.2.2. *B. subtilis*

Les cellules pré-compétentes de *B. subtilis* (section II.2.2.1.2) sont diluées au 1:10 dans du milieu GM2 et incubées avec agitation pendant 1 heure à 37°C. Après avoir supplémenté la culture bactérienne avec 20 mM MgSO₄, 1 µg d'ADN est ajouté à 1 mL de culture pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 8 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1 mL de milieu LB frais puis incubé pendant 30 minutes à 37°C. Les bactéries sont sédimentées à 8 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante et reprises dans 100 µL de milieu LB frais. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB Agar 2 % contenant les antibiotiques adéquats et incubées pendant la nuit à 37°C.

II.2.2.3. Transduction dans *B. subtilis*

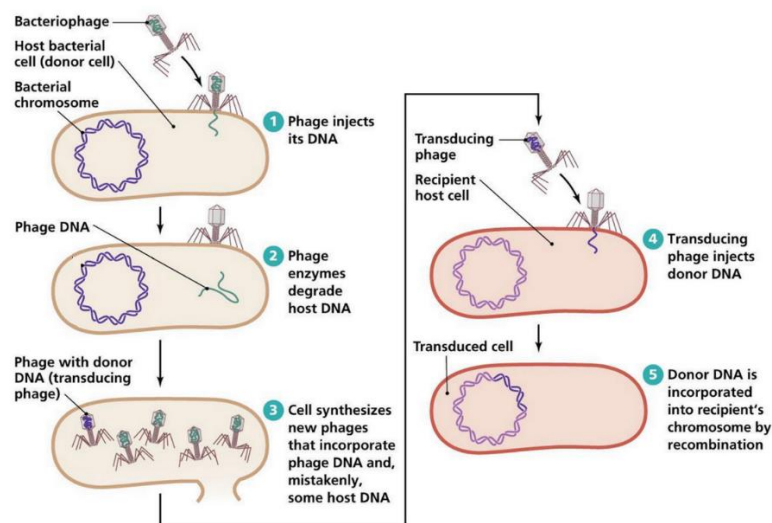


Figure 33 : Transduction bactérienne (Copyright© 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings). Le lysat transducteur est produit par l'infection de la souche donatrice (étapes 1 à 3). L'infection de la souche receveuse par ce lysat conduit à la transduction de gènes de la souche donatrice vers cette souche receveuse (étapes 4 et 5).

Le principe de la transduction bactérienne est schématisé dans la **Figure 33**. La méthode pour la transduction de *B. subtilis* a été adaptée de Jakutyte *et al* (2011). La souche donneuse est diluée au 1:100 dans 10 mL de milieu LB frais et incubée à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} = 0,8. La culture est supplémentée avec 10 mM CaCl₂ et les cellules sont infectées avec le phage SPP1wt à une multiplicité d'infection de 5 pendant 2 heures à 37°C. Les débris cellulaires et les bactéries non lysées sont

sédimentés à 5 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé, filtré avec un filtre 0,45 µm et le lysat est titré avec la souche YB886 (section II.2.2.4).

Le lendemain, à partir d'une culture de nuit, la souche receveuse est diluée au 1:100 dans 10 mL de milieu LB frais et incubée à 37°C jusqu'à une $DO_{600nm} = 1,5$ (équivalente à $\approx 4.10^8$ cfu.mL⁻¹). 300 µL de culture sont prélevés, supplémentés avec 10 mM CaCl₂ et infectés avec le lysat (obtenu la veille et titré sur la souche YB886) à une multiplicité d'infection de 1 pendant 10 minutes à 37°C. 1,5 mL de milieu LB (préalablement chauffé à 37°C) sont ajoutés et les cellules sont incubées à 37°C pendant 10 minutes. Les bactéries sont centrifugées à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 300 µL de milieu LB préchauffé supplémenté avec 40 µL de sérum anti-SPP1 et les bactéries sont incubées à 37°C pendant 30 minutes. Cette étape permet d'éviter la sur-infection des bactéries transduites par des phages SPP1 libres dans la culture. Les cellules sont sédimentées à 13 000 rpm pendant 5 minutes et le culot est resuspendu dans 300 µL de milieu LB préchauffé. Des dilutions sériées sont faites ($0, 10^{-1}, 10^{-2}$ et 10^{-3}), 100 µL de chaque dilution sont étalés sur LB Agar 2 % contenant les antibiotiques adéquats et les boîtes sont incubées pendant la nuit à 37°C.

II.2.2.4. Titration des phages

Le phage à titrer est dilué en série ($10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$) dans du tampon TBT (100 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, ajusté à pH 7,5). Les cellules sont diluées dans du milieu LB frais pour la souche YB886 et dans du milieu MIII frais pour les souches permissives HA101B et BG295. Elles sont cultivées à 37°C jusqu'à une $DO_{600nm} > 0,8$. Dans une boîte de Pétri vide, une goutte de 100 µL de bactéries et une goutte de 100 µL du phage dilué sont déposées et mélangées avec 10 mL de LB agar 0,7 % (supplémenté avec 10 mM CaCl₂) (**Figure 34**). Après solidification, les boîtes sont placées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, les plages de lyse de chaque dilution sont comptées et le titre du phage est ainsi obtenu.

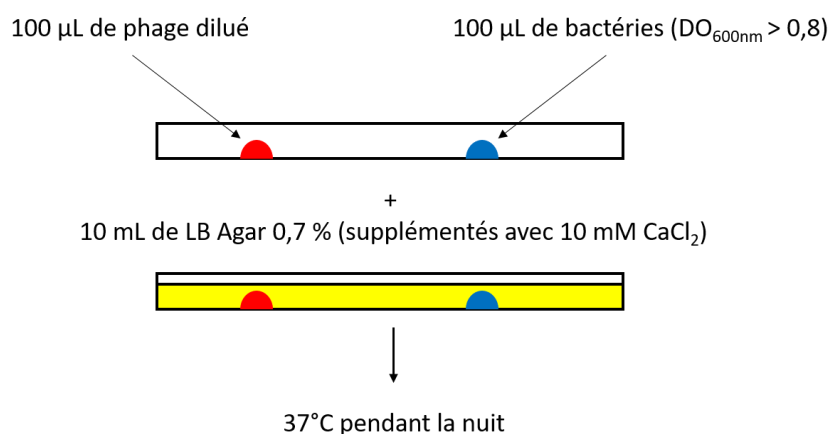


Figure 34 : Méthode de titration du bactériophage SPP1.

II.2.3. Biochimie

II.2.3.1. Purification de l'ADN chromosomique de *B. subtilis*

Les cellules sont poussées pendant la nuit dans 5 mL de milieu LB à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} supérieure à 1,5. Les cellules sont centrifugées et le culot est repris dans 500 μ L (1:10 du volume initial de culture) de solution I (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 μ g.mL⁻¹ RNase et 1 mg.mL⁻¹ lysozyme) et incubé pendant 1 heure à température ambiante. 0,5 % de SDS sont ajoutés et une incubation dans la glace pendant 10 minutes est faite. De la pronase, pré-incubée à 37°C pendant 30 minutes, est ajoutée et une incubation de 30 minutes à 37°C est réalisée. L'ADN est extrait deux fois avec un mélange contenant du phénol et du chloroforme 1:1 (v/v) puis une fois avec du chloroforme 1:1 (v/v). L'ADN, présent dans la phase aqueuse, est dialysé deux fois dans un grand volume de tampon (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) puis conservé à 4°C. La concentration et la pureté sont quantifiées au Nanodrop.

II.2.3.2. Préparation d'extraits de *B. subtilis* infectées par SPP1

La méthode est adaptée d'Isidro *et al*, 2004b. Les cellules d'une culture de nuit sont diluées au 1:100 dans du milieu LB frais et incubées à 37°C jusqu'à une $DO_{600nm} = 0,8$. La culture est supplémentée avec 10 mM CaCl₂ et les cellules sont infectées avec le phage SPP1 à une multiplicité d'infection de 5 à 37°C. A 25 minutes post-infection, des aliquots de 1 mL sont prélevés, les cellules sont centrifugées à 8 000 g à 4°C pendant 5 minutes et les culots sont congelés à -20°C. Après décongélation dans la glace, les culots sont repris dans 1:20 du volume initial de culture dans du tampon de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM glucose, 1 mg.mL⁻¹ lysozyme et 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche)) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Un volume équivalent de tampon de lyse froid (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 1 % NP40, 5 mM MgCl₂, 1 μ g.mL⁻¹ DNase et 100 μ g.mL⁻¹ RNase) est ajouté et incubé dans la glace pendant 30 minutes. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 14 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont immédiatement utilisés pour l'analyse des protéines sur gel SDS-PAGE ou western blot.

II.2.3.3. Production et purification des intermédiaires d'assemblage de SPP1

La méthode est adaptée de Becker *et al* (1997). Les cellules d'une culture de nuit sont diluées au 1:50 dans 300 mL de milieu LB frais et incubées à 37°C jusqu'à une $DO_{600nm} = 0,8$. La culture est supplémentée avec 10 mM CaCl₂ et les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 5 avec le phage SPP1 (sauvage ou mutant) dont on souhaite étudier les structures. La culture infectée est

incubée à 37°C pendant 3 heures avec agitation. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15 300 *g* à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant avec les particules de SPP1 est récupéré et centrifugé pendant la nuit à 20 300 *g* à 4°C. Le culot est récupéré et couvert avec 250 µL de tampon R (50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 50 mM glutamate de potassium, 10 mM EDTA). Après une incubation de 15 minutes en chambre froide, le culot est resuspendu délicatement et 25 mM MgCl₂, 25 U Benzonase, 100 µg.mL⁻¹ RNase et 1X d'inhibiteurs de protéases sont ajoutés et homogénéisés en chambre froide pendant 3 heures sur une roue. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 25 900 *g* pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est déposé sur un gradient linéaire de glycérol (10-30 % de glycérol (v/v) dans du tampon R) et ultra-centrifugé à 35 000 rpm à 4°C pendant 90 minutes. Des fractions de 1 mL sont collectées et analysées sur gel SDS-PAGE, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Les fractions contenant les particules de SPP1 (procapsides ou capsides) sont réunies et analysées par western blot.

II.2.3.4. Production et purification de particules virales de SPP1

Les cellules d'une culture de nuit sont diluées au 1:50 dans 750 mL de milieu LB frais et incubées à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} = 0,8. La culture est supplémentée avec 10 mM CaCl₂ et les cellules sont infectées avec le phage SPP1 à une multiplicité d'infection de 5 à 37°C pendant 2 heures avec agitation. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 8 000 *g* à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est centrifugé à 8 000 *g* à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, le culot, contenant les phages, est repris délicatement dans 5 mL de TBT puis la suspension est déposée sur un gradient discontinu de chlorure de césium (couches de 1,7 ; 1,5 et 1,45 g.mL⁻¹ de CsCl dans du tampon TBT) et centrifugée à 24 000 rpm pendant 5 heures à une température supérieure à 18°C (le chlorure de césium précipite à froid). Après centrifugation, la bande bleue contenant le phage purifié est prélevée à l'aide d'une seringue en perçant le tube de centrifugation. Pour finir, le phage est dialysé deux fois dans un grand volume de tampon TBT à 4°C.

II.2.3.5. Western blot

20 µL d'extraits bactériens totaux (section II.2.3.2) ou d'échantillons de structures (partiellement purifiés (section II.2.3.3 et II.2.3.4) sont mélangés avec 3 µL de tampon de charge 10X (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 1 M β-mercaptoéthanol, 20 % SDS, 0,2 % bleu de Bromophénol, 10 % glycérol) et chauffés à 95°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel SDS-PAGE et soumis à une migration électrophorétique pendant ≈1h30 à 80 mA. Les protéines migrées sur gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 2 heures à 100 V dans du tampon de transfert (20 % éthanol, 1X Tris-Glycine, 0,01 % SDS). La membrane est incubée dans une solution de blocage (5 % lait écrémé, 0,1 % Tween 20, 1X PBS pH 8) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée deux

fois avec du tampon de lavage (1X TBS pH 8, 0,05 % Tween 20) puis incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage (**Tableau 6**) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 4 fois avec du tampon de lavage et incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1:10 000 dans du tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Après 4 lavages, la membrane est incubée avec une solution ECL (GE Healthcare) permettant la détection par chimio-luminescence des protéines immuno-marquées au contact d'un film photographique. Des expositions de 30 secondes à 1 heure sont faites.

Tableau 6 : Concentrations des anticorps primaires et temps d'exposition utilisés.

Anticorps primaire	Dilution dans le tampon de blocage	Temps d'exposition
anti-gp11 (lapin 187)	1:500	30 à 60 secondes
anti-gp6 (lapin 1731)	1:100	1 à 10 minutes
anti-GFP monoclonal souris BOEHRINGER	1:100	20 à 100 minutes
anti-SPP1 (lapin 337)	1:100	≈ 30 minutes
anti-gp12 (lapin 1809)	1:200	5 à 10 minutes

II.2.4. Analyses quantitatives de l'ADN

II.2.4.1. Préparation d'extraits d'ADN total et d'ADN protégé de l'action de la DNase de *B. subtilis* infectées par SPP1

Une culture de jour de *B. subtilis* poussée en milieu riche (LB) à une densité de 10^8 cfu.mL⁻¹ (DO_{600nm} ≈ 0,8) est infectée avec le phage SPP1 avec une multiplicité d'infection de 5. Deux aliquots d'1 mL de la culture, un pour la quantification de l'ADN total (extraits d'ADN total) et l'autre pour la quantification de l'ADN encapsidé (extraits d'ADN protégé de la DNase) (**Figure 35**) sont prélevés aux temps 0, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes post-infection. Les échantillons sont centrifugés pendant 3 minutes à 11 000 g puis les culots sont congelés à -20°C. Après décongélation dans la glace, tous les culots sont resuspendus dans 500 µL de tampon de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glucose, 50 mM NaCl, 2 mg.mL⁻¹ lysozyme et 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche)) pendant 10 minutes à température ambiante.

Les extraits d'ADN total sont traités avec 500 µL de tampon de lyse A (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 % NP40, 10 mM EDTA et 100 µg.mL⁻¹ RNase) pendant 30 minutes dans la glace. Puis chaque extrait est déprotéinisé avec 0,5 % de SDS et 50 µg.mL⁻¹ de protéinase K pendant 1 heure à 65°C.

Les extraits d'ADN protégé de la DNase sont traités avec 500 µL de tampon de lyse B (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 % NP40, 5 mM MgCl₂, 100 µg.mL⁻¹ RNase et 100 U Benzonase) pendant 1 heure

à 37°C. Puis, chaque extrait est déprotéinisé avec 0,5 % de SDS, 50 µg.mL⁻¹ de protéinase K et 10 mM d'EDTA pendant 1 heure à 65°C.

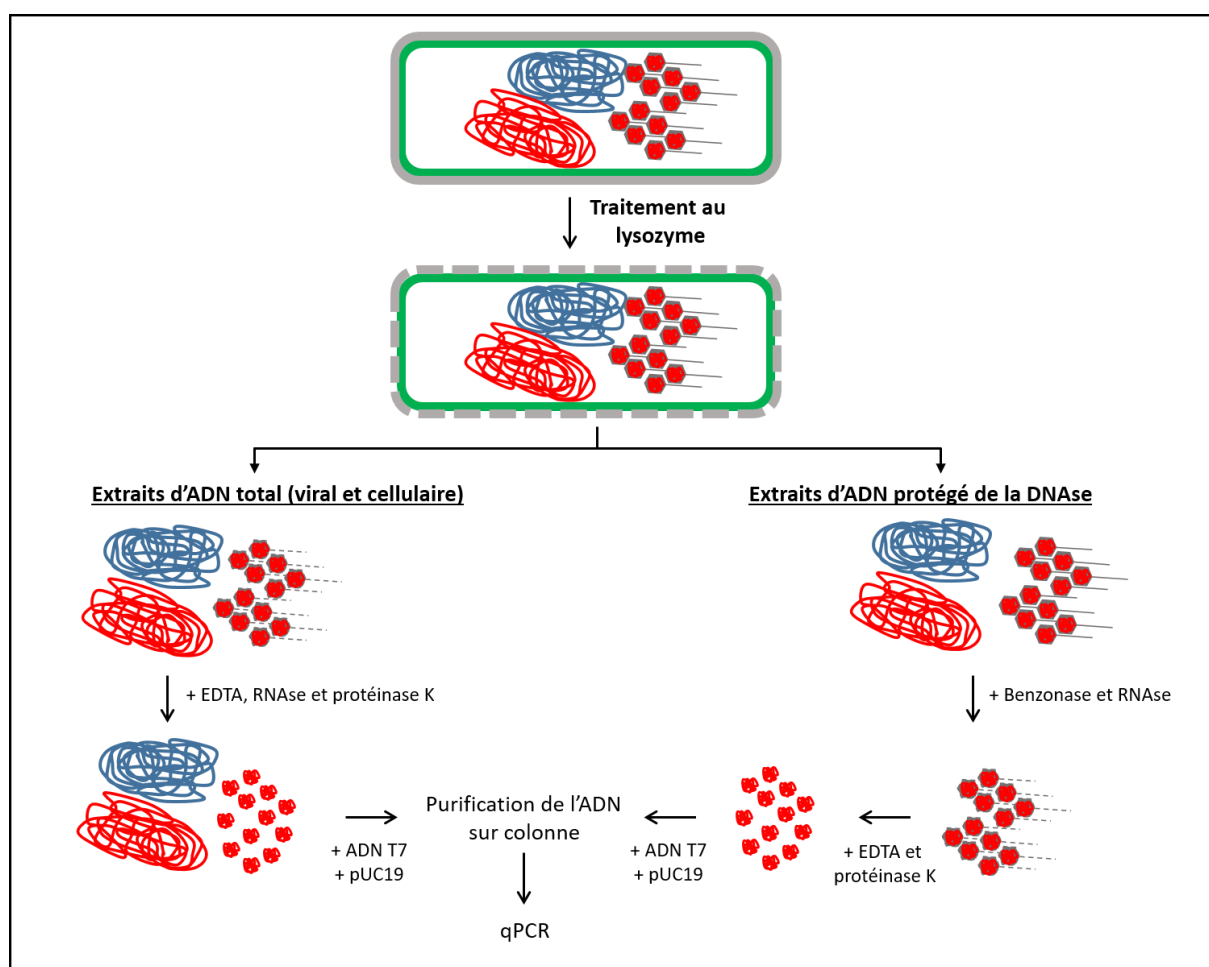


Figure 35 : Protocole d'extraction de l'ADN total (viral et cellulaire) et protégé de l'action de la DNase pour leur quantification par PCR quantitative (qPCR). Voir texte pour les détails.

II.2.4.2. Purification des extraits d'ADN et quantification par PCR quantitative (qPCR)

Les extraits préparés ci-dessus sont purifiés avec le kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) selon le protocole suivant. 80 µL de tampon B3 (chauffé préalablement à 70°C pour réduire sa viscosité) supplémenté avec 20 ng de plasmide pUC19 et 200 ng d'ADN génomique du phage T7 (utilisés comme carrier d'ADN et pour la normalisation des données) sont ajoutés à 80 µL de chaque extrait, vortexés pendant 2 x 5 secondes à 2 000 rpm (MixMate® - Eppendorf) et incubés pendant 10 minutes à 70°C. 80 µL d'éthanol sont ajoutés à chaque échantillon et vortexés 2 x 5 secondes à 2 000 rpm. Les échantillons sont purifiés sur colonne avec deux lavages de 50 µL dans le tampon B5 et l'ADN est élué avec 2 x 50 µL de tampon BE préalablement chauffé à 70°C.

Pour la quantification, les échantillons d'ADN purifiés sont dilués 300 fois dans des tubes DNA LoBind (Eppendorf®). 3 µL d'échantillon dilué sont ajoutés à 5 µL de Fast SYBR™ Green Master Mix 2x (LifeTechnologies) et 0,5 µL de chaque couple d'amorces (10 µM) (section II.1.5.2) dans un volume final de 10 µL. Les réactions ont été réalisées sur le QuantStudio 12K Flex (LifeTechnologies) en microplaques de 384 puits (mode fast : 95°C/20 sec - (95°C/1 sec - 60°C/20 sec) x 40)) suivies d'une courbe de dénaturation de 0,05°C/sec pour l'analyse des courbes de fusion des amplicons obtenus. Un contrôle négatif est effectué en absence d'échantillon et toutes les réactions sont faites en duplicat technique. Les amorces ont été sélectionnées en utilisant les logiciels Primer Blast (NCBI) et Primer-Express (LifeTechnologies). La spécificité des amorces a été vérifiée par une analyse Blast sur les génomes de SPP1 et de *B. subtilis*. L'efficacité des amorces a été mesurée par des courbes standards sur 4 log de concentration. La spécificité des produits de PCR est contrôlée par l'analyse des courbes de dénaturation.

La quantification du nombre de copies dans chaque échantillon est obtenue en réalisant dans la même expérience une gamme du plasmide pUC19-EJ1. Ce plasmide contient les séquences des 4 amplicons générés par les amorces utilisées dans ces expériences. La gamme de plasmide utilisée a été calculée pour avoir 1.10^7 - 2.10^6 - 4.10^5 - 8.10^4 - $1,6.10^4$ - $3,2.10^3$ - $6,4.10^2$ copies par réaction de PCR quantitative (facteur de 5 entre chaque point de la gamme). Cette gamme permet de calculer le nombre de copies de pUC19, de T7, de SPP1 et de génome de *B. subtilis* présent dans chaque échantillon analysé. La valeur moyenne du Ct (Cycle Threshold) des duplicats techniques des échantillons est convertie en nombre de copies pour chacun des gènes testés. Le calcul du nombre de copies de T7, ajouté en quantité égale dans tous les échantillons avant la purification, permet de normaliser les données obtenues par les rendements de purification des échantillons. Les valeurs en quantité normalisée de SPP1 et BsGyrA sont utilisées pour calculer le nombre de copies de SPP1 par génome *B. subtilis*. Les duplicats biologiques de chaque série et les 3 séries d'expériences indépendantes sont utilisés pour calculer la valeur moyenne et l'écart-type des ratios mesurés. Le ratio entre les échantillons des extraits d'ADN protégé de la DNase et ceux des extraits d'ADN total permet de calculer le pourcentage d'encapsidation pour chaque condition expérimentale.

II.2.4.3. Quantification par Qubit

Les extraits préparés ci-dessus (section II.2.4.1) sont quantifiés sur le Qubit™ 3.0 Fluorometer (Invitrogen™) avec le kit Qubit™ dsDNA HS Assay (ThermoFisher Scientific). Toutes les mesures des échantillons et des points de gamme des standards sont faites dans 200 µL final de tampon Qubit dsDNA HS contenant 1 µL du réactif fluorophore et 3 µL du tampon utilisé pour l'extraction des ADN totaux. La gamme de standard a été faite en utilisant des quantités croissantes du DNA HS Standard 2

du kit (0 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20 - 40 - 60 - 80 ng). La mesure des échantillons a été faite en utilisant 3 μ L d'extrait. Chaque échantillon a été préparé en duplicat et mesuré deux fois au Qubit. La quantité d'ADN dans chaque échantillon a été déterminée selon l'équation de la gamme du standard et par la moyenne des 4 mesures effectuées.

II.2.5. Microscopie de fluorescence

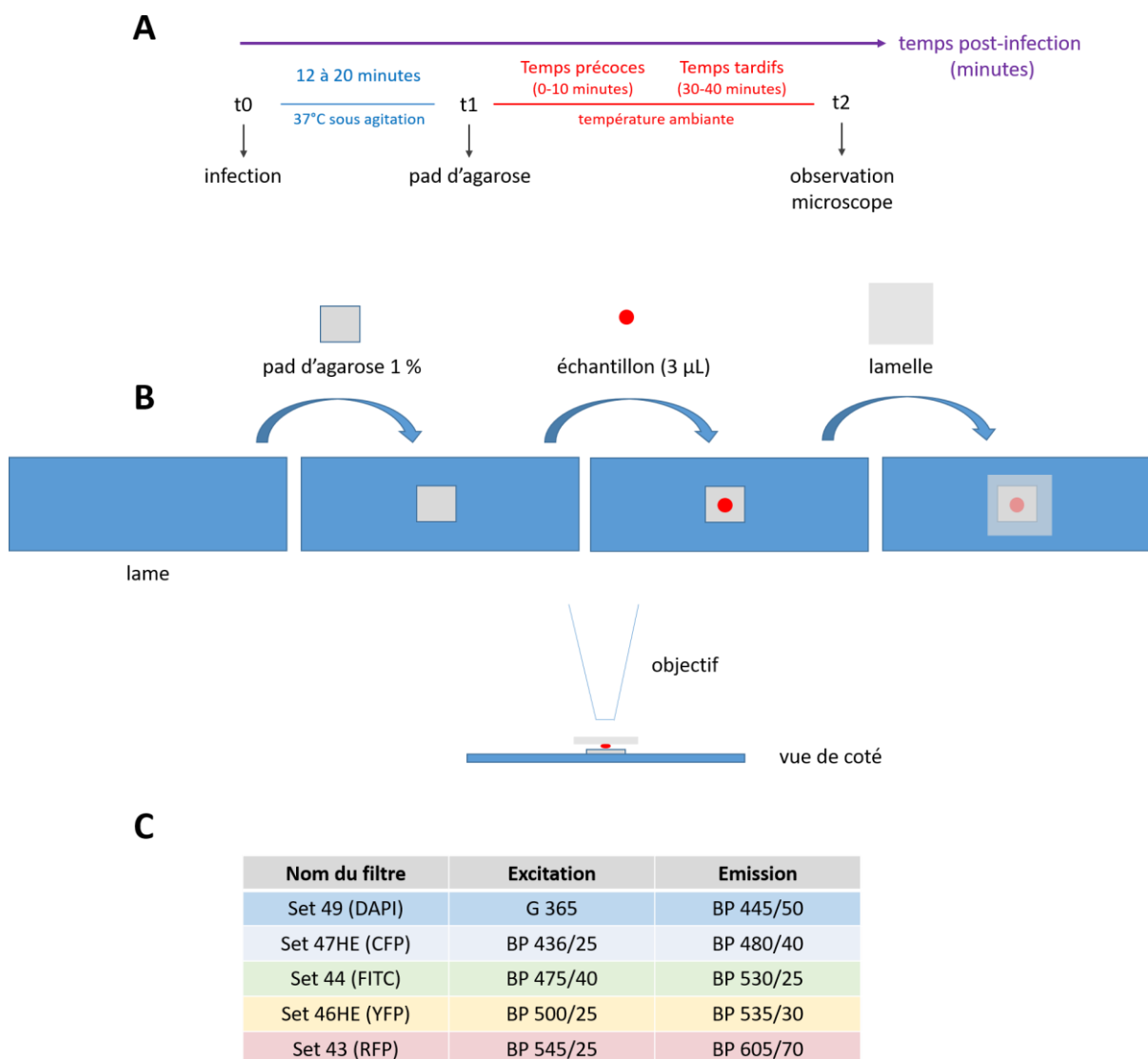


Figure 36 : Imagerie de l'infection de SPP1 par microscopie de fluorescence. (A) Protocole d'infection des cellules par le bactériophage SPP1. Le temps post-infection correspond au temps d'incubation à 37°C (t1) additionné au temps d'observation sur le pad d'agarose (t2). **(B)** Schéma de préparation de l'échantillon avant son observation au microscope de fluorescence. **(C)** Filtres utilisés pour les expériences de microscopie de fluorescence. Légende : BP : Bande Passante.

II.2.5.1. Observation sur pad d'agarose

La souche de *B. subtilis* est diluée au 1:100 à partir d'une culture de nuit dans du LB supplémenté avec 1 mM IPTG ou 1 % xylose (si nécessaire) et mise en culture à 37°C avec agitation. A une densité optique de 0,8, les cellules, supplémentées avec 10 mM CaCl_2 , sont infectées avec une multiplicité d'infection

de 2 pendant 12 à 20 minutes à 37°C. Un volume de 3 µL de la culture infectée est ensuite déposé sur un pad d'agarose 1 % dilué dans de l'eau (Jakutyte *et al*, 2011) puis observé avec un microscope Zeiss Axio Observer Z1 à température ambiante à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection) avec les filtres adéquats (**Figure 36C**).

II.2.5.2. Observation en système microfluidique

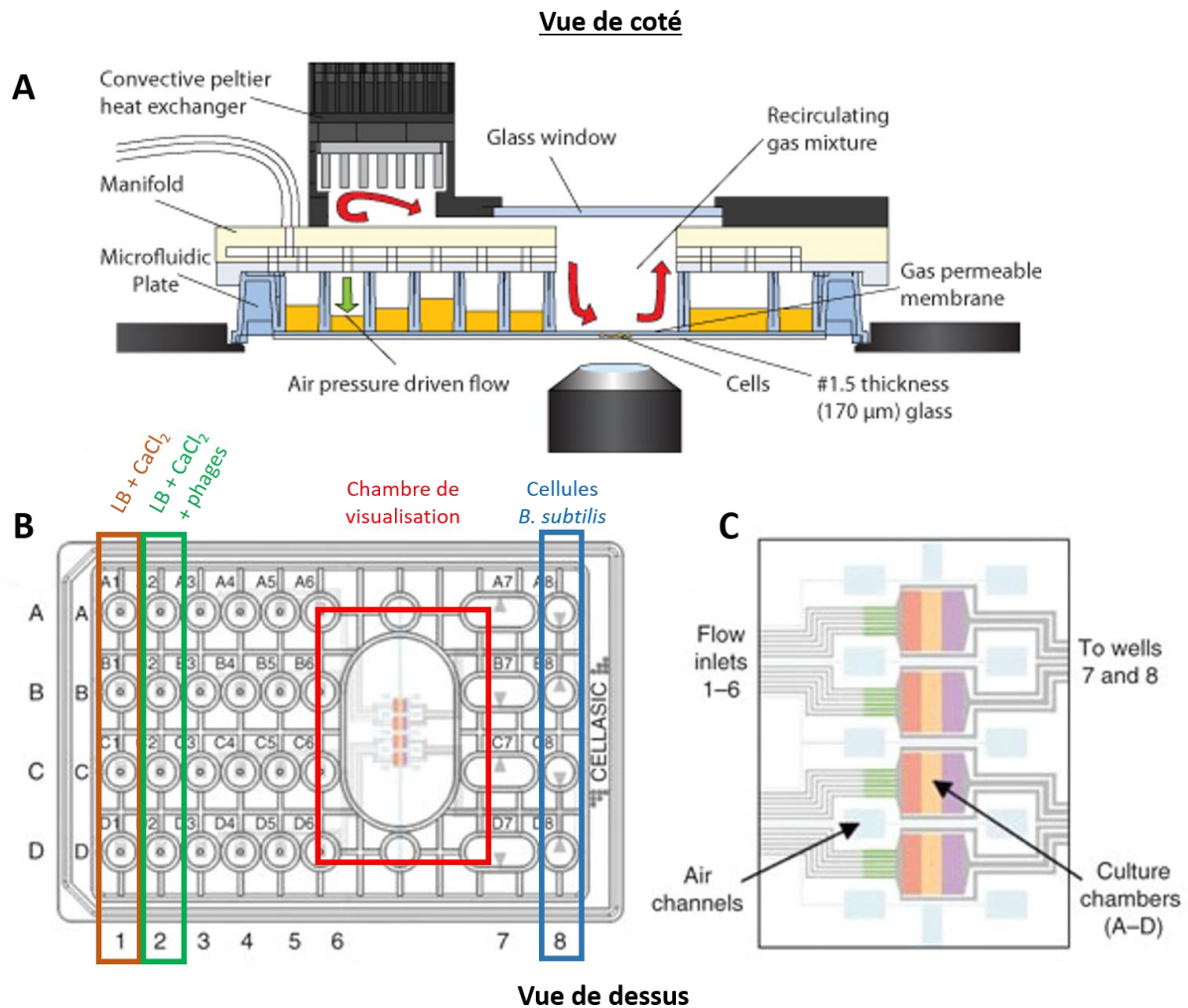


Figure 37 : Système microfluidique pour l'observation en temps réel de l'infection phagique sur des bactéries en culture. (A) Vue de côté du système de microfluidique (CellASIC® ONIX Microfluidic Platform - MerckMillipore) placé dans le microscope. **(B)** Vue du dessus des plaques utilisées pour les expériences de microfluidique (CellASIC® ONIX Microfluidic Plates for Bacterial Cells - MerckMillipore). Avant toute utilisation de la plaque, les chambres qui seront utilisées sont lavées 2 fois avec du milieu LB. **(C)** Détail de la chambre de visualisation encadrée par le rectangle en rouge dans **(B)**.

La souche de *B. subtilis* est diluée au 1:100 à partir d'une culture de nuit dans du LB supplémenté avec 1 mM IPTG et mise en culture à 37°C avec agitation. A une densité optique de 0,5 - 0,6, les cellules sont centrifugées et resuspendues avec du milieu LB frais supplémenté avec 10 mM CaCl_2 pour les concentrer 5 fois. Dans une plaque CellASIC® ONIX Microfluidic Plates for Bacterial Cells

(MerckMillipore) (**Figure 37B**) préalablement lavée avec du tampon LB, les différents milieux sont ajoutés dans les puits comme suit :

- 100 µL de cellules sont déposés dans la valve A8
- 200 µL de milieu LB + 10 mM CaCl₂ sont déposés dans la valve A1
- 200 µL de milieu LB + 10 mM de CaCl₂ + phages dilués au 1:200 sont déposés dans la valve A2

La plaque est placée dans le microscope Nikon (modèle Ti-Eclipse), préalablement thermostaté à 37°C, avec un objectif 100X Oil (NA 1.3 WD : 0.2 mm CFI Plan Fluor- Phase - Nikon), une caméra EMCCD Andor iXon 897 (Oxford Instruments) et un module CellASIC® ONIX Microfluidic Platform (MerckMillipore) (**Figure 37A**).

Le programme suivant est utilisé sur le module CellASIC® ONIX et piloté avec le logiciel CellASIC® ONIX FG (Version 5.0.2 - MerckMillipore):

- Injection des cellules dans la chambre de visualisation : valve A8 : 2 x 15 secondes à 2 psi
- Equilibration et croissance des cellules : valve A1 : 20 minutes à 5 psi
- Injection des phages dans la chambre de visualisation : valve A2 : 3 minutes à 5 psi
- Infection : valve A1 : 90 minutes à 5 psi

Une image est prise toutes les 2,5 minutes dans les canaux RFP, FITC et Phase.

II.2.5.3. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) des usines de réplication

La souche de *B. subtilis* RCL684 est diluée au 1:100 à partir d'une culture de nuit dans du milieu LB frais et incubée à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} ≈ 0,8. La culture est supplémentée avec 10 mM CaCl₂ et les cellules sont infectées avec le phage SPP1 à une multiplicité d'infection de 1 à 37°C. A 6 ou 23 minutes post-infection, 3 µL de la culture infectée sont déposés sur un pad d'agarose (1 % agarose dilué dans de l'eau) puis observés avec un microscope Nikon (modèle Ti-Eclipse), préalablement thermostaté à 37°C, avec un objectif 100X Oil (NA 1.3 WD : 0.2 mm CFI Plan Fluor- Phase - Nikon). Une image est prise toutes les 5 secondes pendant 10 minutes en contraste de phase et en fluorescence (laser 488 nm) avec la caméra EMCCD Andor iXon 897 (Oxford Instruments). Pour les cellules traitées avec l'inhibiteur de la polymérase PolC 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracil (HPUra ; reçue de NC Brown, GLSynthesis, Worcester, MA), la drogue est ajoutée après les 23 minutes d'infection à une concentration finale de 200 µM. Après 1 minute à température ambiante, 3 µL de la culture sont déposés sur un pad d'agarose contenant également la drogue (1 % agarose dilué dans de l'eau + 200 µM d'HPUra).

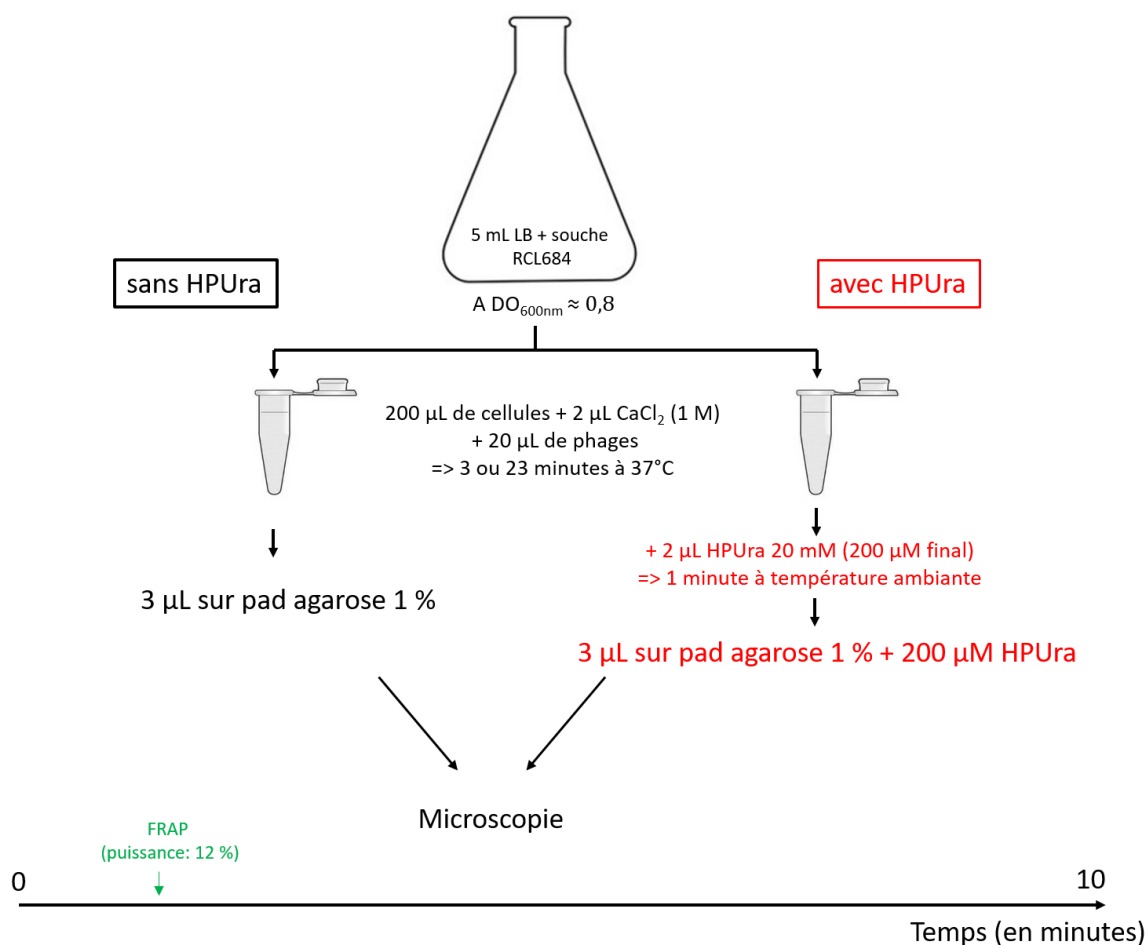


Figure 38 : Protocole des expériences de FRAP des cellules RCL684 infectées en présence ou en absence de HPUra (inhibiteur de la polymérase PolC).

II.2.5.4. Observation de l'infection de bactéries filamentées

Pour observer les usines virales dans des cellules de longueur « infinie », nous avons utilisé une drogue qui inhibe la septation de *B. subtilis*. Une culture de nuit des souches GSY10024 ou GSY10025 a été diluée au 1:100 dans du milieu LB supplémenté avec 1 mM IPTG pour induire la production des protéines gp12-mCitrine ou mCitrine-gp11. Les souches sont mises en culture à 37°C. A une DO_{600nm} de 0,4 - 0,5, la drogue PC290723 (Calbiochem) a été ajoutée à la culture à une concentration finale de 0,1 $\mu g.mL^{-1}$ suivie par une incubation pendant 1 heure à 37°C. Les cellules sont ensuite supplémentées avec 10 mM $CaCl_2$ et infectées avec une multiplicité d'infection de 0,1 pendant 20 minutes à 37°C. 3 µL de cellules infectées sont déposés sur un pad d'agarose 1 % préparé dans de l'eau puis les cellules ont été observées avec un microscope Zeiss Axio Observer Z1 à température ambiante à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et à tardifs (40-50 minutes post-infection) avec les filtres BrightField, YFP et RFP. Pour la cinétique avec la souche GSY10025, une image a été prise toutes les 10 minutes.

II.2.6. Analyses quantitatives des images de microscopie de fluorescence

L'analyse automatique des zones de réplication et d'accumulation des particules virales lors de l'infection des cellules *B. subtilis* par différents phages SPP1 a été effectuée par un algorithme développé sous Matlab (version R2016B) par Cyrille Billaudeau (MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas). La méthode d'analyse est constituée de trois étapes successives.

II.2.6.1. Détection et identification des cellules

L'objectif est de générer une image binaire dans laquelle les cellules sont individualisées. Tout d'abord, les pixels de l'image associés à l'arrière-plan sont identifiés par la méthode de classification dite des *k*-means (2 noyaux) sur l'image d'épi-fluorescence à partir du canal FITC. Puis, l'image en lumière transmise par fond clair est prétraitée par un filtre 'top-hat' (élément structurant : disque de rayon = 15 pixels) pour rehausser les cellules par rapport à l'arrière-plan et les contours des cellules sont révélés par un filtre à différence de Gaussienne. Sur cette image prétraitée, les pixels associés à l'arrière-plan sont tous assignés à une même valeur et une nouvelle segmentation est réalisée par la méthode des *k*-means (3 noyaux) afin d'identifier les pixels associés à l'arrière-plan, au contour et l'intérieur des bactéries. Finalement, le masque binaire des cellules est obtenu en ne tenant compte que des pixels associés à l'intérieur des cellules. Néanmoins, en absence de marquage membranaire lors des observations en microscopie, il est impossible de bien isoler toutes les cellules (en particulier lorsque celles-ci forment des filaments). C'est pourquoi, chaque masque binaire a été contrôlé et corrigé manuellement pour séparer les cellules ou éliminer les cellules mortes. Certaines caractéristiques morphologiques des cellules sont directement quantifiées sur ces images (surface et longueur des cellules).

II.2.6.2. Localisation et morphologie des usines de réplication de l'ADN du phage

Dans un premier temps, l'image d'épi-fluorescence associée au marquage de l'ADN du phage est prétraitée (dé-bruitage par un filtre médian 3x3) et les pixels associés à l'arrière-plan (détectés à l'étape précédente) sont assignés à une même valeur. Puis, les foyers de réplication sont segmentés par la méthode de classification des *k*-means (3 noyaux) en ne retenant que les régions de surface supérieure à 7 pixels². Le résultat obtenu est une image binaire qui permet :

- d'identifier, de localiser et de mesurer la surface des zones de réplication.
- de dénombrer les foyers de réplication par cellule afin d'identifier les cellules non-infectées, mono-infectées ou multi-infectées.
- de caractériser la morphologie des foyers de réplication (longueur et largeur) en ajustant une ellipse autour de ces zones.
- de mesurer la distance du centre du foyer de réplication aux deux pôles de la cellule.

- de quantifier l'intensité moyenne de la fluorescence dans la zone de réplication.

II.2.6.3. Localisation et morphologie des zones d'accumulation de procapsides et de capsides

L'identification des usines d'assemblage a été réalisée uniquement sur les cellules mono-infectées, identifiées par la présence d'un seul foyer d'ADN de SPP1 (section II.2.6.2.), par un seuillage des images d'épi-fluorescence des marqueurs des procapsides ou des capsides par la méthode de *k*-means (2 noyaux dans les cellules). Pour cela, les zones dont la surface est inférieure à 6 pixels² ou celles dont le pourcentage de pixels d'intensité au-dessus du seuil d'activation est inférieur à 5 % (le seuil d'activation est défini comme la moyenne + 3 écart-types des valeurs d'intensité de fluorescence de toutes les cellules non-infectées) sont éliminées. Le résultat obtenu est une image binaire qui permet :

- d'identifier, de dénombrer, de localiser et de mesurer la surface des zones de réplication par cellule mono-infectée.
- de mesurer la distance entre un foyer de particules virales et un foyer de réplication.
- de mesurer le pourcentage de recouvrement des foyers de particules virales et de réplication de l'ADN viral (en cas de chevauchement) ou la distance de séparation entre les deux zones (si elles sont disjointes).
- de déterminer la distribution des foyers de particules virales de part et d'autre de l'usine de réplication de l'ADN de SPP1.
- de caractériser la morphologie des foyers de particules virales (longueur et largeur) en ajustant une ellipse autour de ces zones.
- de quantifier l'intensité moyenne de la fluorescence dans la zone d'assemblage.

II.2.7. Microscopie électronique

II.2.7.1. Préparation des cellules infectées

Une culture de nuit de *B. subtilis* YB886 est diluée au 1:100 dans du milieu LB frais et incubée à 37°C jusqu'à une $DO_{600nm} = 0,8$. La culture est supplémentée avec 10 mM $CaCl_2$ et les cellules sont infectées avec le phage SPP1 à une multiplicité d'infection de 10 à 37°C. A 35 minutes post-infection, 4 mL de la culture sont prélevés et immédiatement mélangés avec une solution de fixation (4 % paraformaldéhyde, 0,4 % glutaraldéhyde, 20 mM $MgCl_2$, 1X PBS pH 8) et incubés à température ambiante pendant 2 heures avec agitation sur roue. Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 3 500 *g*, lavées deux fois avec du tampon de lavage (10 mM $MgCl_2$, 1X PBS pH 8) et reprises dans du tampon TBT (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,5). Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 3 500 *g* et le surnageant est éliminé. Le culot est inclus dans 150 µL de gélatine 10 % (dissous dans du tampon TBT) et les billes de gélatine contenant les cellules fixées sont déposées

sur du parafilm. Les billes sont conservées dans 2,3 M de sucrose (préparé dans du tampon TBT) et conservées à 4°C.

II.2.7.2. Coupe et marquages des cellules infectées

Les billes de gélatine contenant les cellules fixées sont coupées à -80°C avec un ultramicrotome EM UC7 (Leica) sous azote liquide. La coupe commence par la formation d'une pyramide (couteau Diatom « Trim45 » DTB45) puis des sections de 90 nm sont faites (couteau Diatom « cryo immuno » DCIMM3530) (**Figure 39**).



Figure 39 : Schéma pour la coupe des billes de gélatine en forme de pyramide pour l'obtention de coupes de 90 nm d'épaisseur de bactéries infectées par le phage SPP1.

Les coupes obtenues sont déposées sur des grilles de cuivre (diamètre : 3,05 mm, Plano GmbH, Wetzlar, Germany) recouvertes d'un film de carbone puis lavées 5 fois pendant 10 minutes dans du tampon TBT. Les grilles sont incubées dans 50 µL de tampon A (**Tableau 7**) pendant 1 heure à température ambiante. Les grilles sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du tampon TBT puis deux fois pendant 5 minutes dans du tampon 1X PBS pH 8 supplémenté avec 10 mM CaCl₂. Chaque grille est incubée dans 500 µL de tampon de blocage pendant 30 minutes à température ambiante puis avec 10 µL de tampon avec les anticorps primaires (**Tableau 7**) à 4°C pendant la nuit. Les grilles sont lavées 4 fois avec du tampon 1X PBS pH 8 supplémenté avec 10 mM MgCl₂ puis chaque grille est incubée avec 10 µL de tampon avec les anticorps secondaires marqués à l'or colloïdal ayant des diamètres de 5 ou de 15 nm (**Tableau 7**). L'incubation est faite pendant 2 heures dans une chambre humidifiée. Enfin, les grilles sont lavées 4 fois dans du tampon 1X PBS pH 8 supplémenté avec 10 mM

MgCl₂ puis deux fois dans de l'eau, séchées sur papier Whatman et plongées dans une solution contenant 2 % d'acétate d'uranyl pendant 30 secondes.

Tableau 7 : Tampons et concentrations des anticorps primaires et secondaires utilisés pour chaque traitement pour les expériences de microscopie électronique. Composition du tampon de marquage : 20 mM Tris-HCl, 0,9 % NaCl ajusté à pH 8. Légende : CWFG : Cold Water Fish Gelatin ; anti-ADNdb : anticorps monoclonal de souris anti-ADNdb ([3519 DNA] (ab27156) Abcam).

	Sans traitement	Traitement avec la benzonase	Traitement avec la trypsine	Temps d'incubation
Tampon A	TBT	TBT + 25 U de Benzonase	TBT + 10 µg.mL ⁻¹ de trypsine	1 heure à température ambiante
Tampon de blocage	Tampon de marquage + 0,4 % BSA + 0,1 % gélatine CWFG	Tampon de marquage + 0,4 % BSA	Tampon de marquage + 0,4 % BSA + 0,1 % gélatine CWFG	30 minutes à température ambiante
Anticorps primaire	Tampon de marquage + sérum anti-sus70 (1:150) + anti-ADNdb (1:200) + 0,4 % BSA			pendant la nuit à 4°C
Anticorps secondaire	Tampon de marquage + anti-IgG-lapin-Or15nm (1:200) + anti-IgG-souris-Or5nm (1:200) + 0,4 % BSA			2 heures dans une chambre humidifiée

II.2.7.3. Conditions d'observation des grilles de cellules immuno-marquées

Les grilles ainsi préparées ont été observées sur un microscope électronique FEI Tecnai G² F20.

II.2.8. Calcul du coût énergétique de l'infection virale pour la cellule

Les paramètres suivants ont été utilisés pour calculer le coût énergétique de l'infection de SPP1 (**Tableau 10**) :

- taille du génome dans le virion de SPP1 : 45,1 kpb
- nombre de nucléotides d'un génome de SPP1 : 88 032 bases

Le nombre de copies de chaque protéine connue pour former la particule virale a été calculé et converti en nombre d'acides aminés. Il représente un peu plus de 200 000 acides aminés par virion infectieux (**Tableau 8**).

Basés sur ces données, les processus de réplication du génome, de transcription, d'encapsidation de l'ADN viral et de traduction des protéines ont été convertis en une unité commune: le nombre d'ATP nécessaire pour chacun de ces processus.

Deux coûts sont répertoriés dans le **Tableau 9**: le coût direct (P_D) et le coût indirect (P_O) (Mahmoudabadi *et al*, 2017). Le coût direct représente l'énergie nécessaire (en hydrolyse de molécules d'ATP) pour chacun des processus requis pour la formation d'une particule virale.

Le coût indirect représente l'énergie perdue par l'utilisation de précurseurs métaboliques dans les voies biosynthétiques de la cellule pour la synthèse des composants du virion plutôt que comme source énergétique métabolisée par la glycolyse ou le cycle de Krebs (Mahmoudabadi *et al*, 2017). De

ce fait, la cellule doit produire davantage d'énergie pour compenser cette dépense. Le coût indirect est estimé en nombre de molécules d'ATP non synthétisées à cause de leur détournement en tant que précurseurs métaboliques.

L'énergie totale nécessaire à l'infection virale correspond donc à $P_T = P_D + P_O$.

Tableau 8 : Protéines connues présentes dans la particule virale infectieuse de SPP1 et leur nombre de copies retrouvé par virion.

Protéine	Taille (en AA)	Nombre moyen de copies	Fonction	Nombre total d'acides aminés	Références
gp6	503	12	protéine portale	6 036	Lurz <i>et al</i> , 2001
gp7	308	≈ 3	protéine minoritaire de la procapside et de la capsid	924	Stiege <i>et al</i> , 2003
gp12	64	180	protéine auxiliaire de la capsid	11 520	White <i>et al</i> , 2012 ; Zairi <i>et al</i> , 2014
gp13	324	415	protéine majoritaire de la capsid	134 460	Dröge <i>et al</i> , 2000
gp15	102	12	protéine adaptatrice du connecteur	1 224	Lhuillier <i>et al</i> , 2009
gp16	109	12	protéine bouchon du connecteur	1 308	Lhuillier <i>et al</i> , 2009
gp17	134	6	protéine d'interface queue-capsid	804	Chagot <i>et al</i> , 2012 ; Auzat <i>et al</i> , 2014
gp17.1	177	180	protéine majoritaire de la queue	31 860	Auzat <i>et al</i> , 2008
gp17.1*	264	60	protéine majoritaire de la queue	15 840	Auzat <i>et al</i> , 2008
gp18	1 032	?	"tape measure protein"	?	Plisson <i>et al</i> , 2007
gp19.1	253	6	protéine distale de la queue	1 518	Goulet <i>et al</i> , 2011
gp21	1 108	3	protéine de la fibre caudale	3 324	Goulet <i>et al</i> , 2011

208 818 AA

Les calculs présentés dans le **Tableau 9** assument que la cellule est cultivée en condition d'aérobie à 37°C avec pour seule source de carbone le glucose. Dans le cas d'une culture en milieu riche, le coût indirect est probablement inférieur car le milieu de culture apporte des composants (exemple : acides aminés) que la cellule n'a pas besoin de synthétiser *de novo*. Comme cette contribution est difficile à estimer, nous avons aussi calculé P_O pour l'infection par SPP1.

Tableau 9 : Calcul du nombre de molécules d'ATP nécessaires à chaque processus pendant l'infection virale pour la formation d'une particule virale. Les coûts directs et indirects en hydrolyse de molécules d'ATP de la réplication de l'ADN (nt), de la transcription (nt), de l'ADN encapsidé (nt) et de la traduction (AA) sont basés sur les estimations de Mahmoudabadi *et al* (2017). Légende : nt : nombre de nucléotides par génome de virus ; AA : nombre d'acides aminés constituant un virion.

	Réplication	Transcription	Encapsidation	Traduction
Coût direct	$P_D = 2 \times 13 \times \text{nt}$	$P_D = 31 \times 0,07 \times \text{nt}$	$P_D = 2 \times \text{nt}$	$P_D = 6 \times \text{AA}$
Coût indirect	$P_O = 2 \times 34 \times \text{nt}$	$P_O = 31 \times 0,074 \times \text{nt}$	0	$P_O = 25 \times \text{AA}$
Coût total	$P_T = 94 \times \text{nt}$	$P_T \approx 4,45 \times \text{nt}$	$P_T = 2 \times \text{nt}$	$P_T = 31 \times \text{AA}$

Résultats

III. Résultats

Lors de l'infection virale de la bactérie *B. subtilis*, SPP1 va mettre en place une stratégie très efficace pour sa multiplication. L'infection monopolise les ressources de la bactérie et les détourne à son profit pour répliquer l'ADN viral et produire les protéines structurales qui mèneront à la construction de la particule virale. L'étude de l'impact de ces étapes essentielles du cycle viral (**Figure 40**) sur la bactérie et le programme spatio-temporel de la restructuration de l'organisation cellulaire qu'elles imposent sont l'objet de cette thèse.

III.1. Réplication de l'ADN viral dans la bactérie infectée par SPP1

III.1.1. Quantification de la réplication et de l'encapsidation du génome viral pendant l'infection

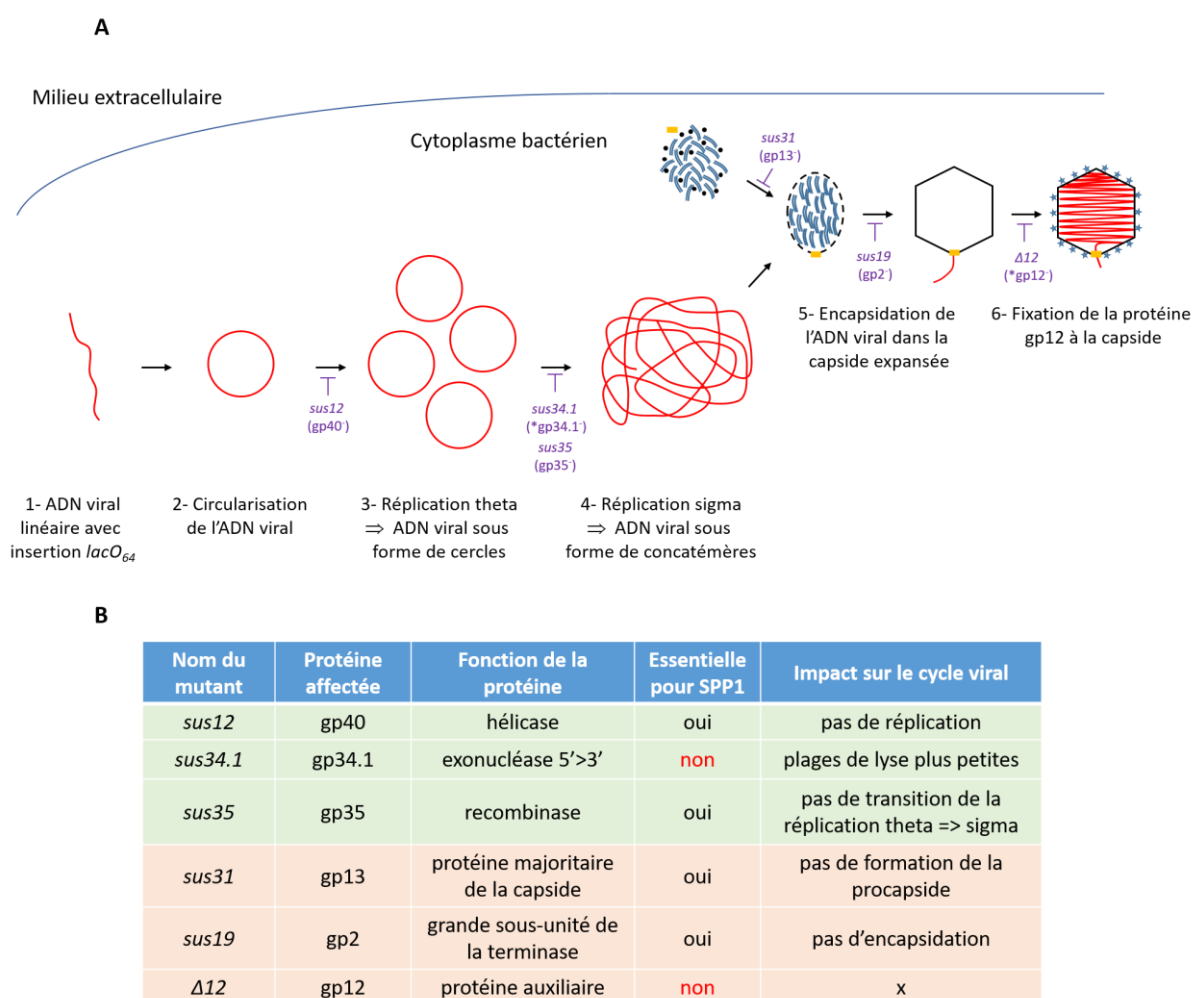


Figure 40 : Programme séquentiel des étapes de la réplication du génome et de l'assemblage de la nucléocapside du bactériophage SPP1. **(A)** Schéma de ces deux processus (sections I.4.3 et I.4.4) et les différents mutants utilisés pour leur blocage total (SPP1*sus12*, *sus35*, *sus31* et *sus19*), partiel (SPP1*sus34.1*) ou pour produire des nucléocapsides sans gp12 (SPP1 $\Delta 12$). Les mutants et les gènes qu'ils affectent sont présentés en violet. * : protéine non-essentielle. **(B)** Récapitulatif des mutants de SPP1 utilisés dans ce travail de thèse. Les protéines qu'ils affectent ainsi que leur fonction et leur impact sur le cycle viral sont présentés.

Une fois le chromosome linéaire de SPP1 éjecté dans le cytoplasme de la bactérie et recircularisé, l'ADN viral va être rapidement répliqué pour amplifier et générer un nombre important de copies du génome viral. Celles-ci sont ensuite empaquetées dans des procapsides virales afin de générer des particules virales infectieuses.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au nombre de copies d'ADN viral total synthétisé et encapsidé pendant les 30 premières minutes du cycle viral, temps à partir duquel la lyse des bactéries infectées commence dans nos conditions de culture (milieu riche LB, 37°C avec agitation). Cette quantification nous permet de voir l'évolution intracellulaire du nombre de copies virales totales synthétisées et du nombre de copies virales protégées de la DNase par la particule virale pendant le cycle viral.

Quatre phages différents ont été utilisés dans une première expérience. Le phage SPP1*delX110lacO₆₄* est le phage de référence qui sera utilisé pour toute la suite du travail présenté dans ce manuscrit. Il porte la délétion *delX* (Tavares *et al*, 1992) et 64 motifs *lacO* répétés (*lacO₆₄*) qui ont été insérés dans une région non-essentielle du génome de SPP1*delX110* (Jakutyte *et al*, 2011). Cette délétion est nécessaire car SPP1*wt* encapside 104 % de son génome, la redondance terminale de ces molécules étant nécessaire à leur recircularisation dans le cytoplasme de la bactérie lors de l'entrée (**Figure 40A**). L'augmentation de la taille du génome due à l'insertion de *lacO₆₄* doit donc être compensée par la délétion *delX* afin que le chromosome de SPP1*delX110lacO₆₄* ait une redondance terminale qui permette sa recircularisation. Ainsi, le phage SPP1*delX110* a été testé pour observer si l'ajout des motifs *lacO₆₄* a une influence sur la réplication de SPP1. Enfin, deux mutants permettant de stopper le processus soit de réplication (mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus12*) soit d'encapsidation (mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus19*) ont aussi été analysés (**Figure 40**).

A 10 minutes post-infection, la quantité d'ADN viral libre dans le cytoplasme de la cellule est sensiblement la même pour les phages SPP1*delX110*, SPP1*delX110lacO₆₄* et SPP1*delX110lacO₆₄sus19* (**Figure 41**). Le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus12* présente une quantité inférieure aux 3 autres phages car ce mutant ne produit pas l'hélicase virale, gp40, protéine essentielle à la réplication du génome virale (**Figures 40 et 41**) (Missich *et al*, 1997). La détection des quelques copies d'ADN de SPP1 est le résultat de phages ayant infecté et transféré leur ADN dans la cellule mais dont la réplication n'a pas été initiée. A 25 minutes post-infection, le nombre de copies d'ADN viral total augmente fortement pour les phages capables de se répliquer (**Figure 41**). Les phages SPP1*delX110* et SPP1*delX110lacO₆₄* montrent que 30 % de l'ADN viral est protégé dans les capsides. Le phage mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus19* ne présente pas de copies d'ADN viral protégé, ce qui est cohérent avec l'absence dans ce mutant de la protéine gp2, sous-unité du moteur moléculaire, essentielle à

l'encapsidation de l'ADN viral dans la nucléocapside (**Figure 40**) (Chai *et al*, 1992 ; Oliveira *et al*, 2005). Par contre, la quantité d'ADN total de ce phage est globalement inférieure aux phages capables d'encapsider de l'ADN viral suggérant que l'encapsidation pourrait avoir une influence en stimulant la réplication du génome viral.

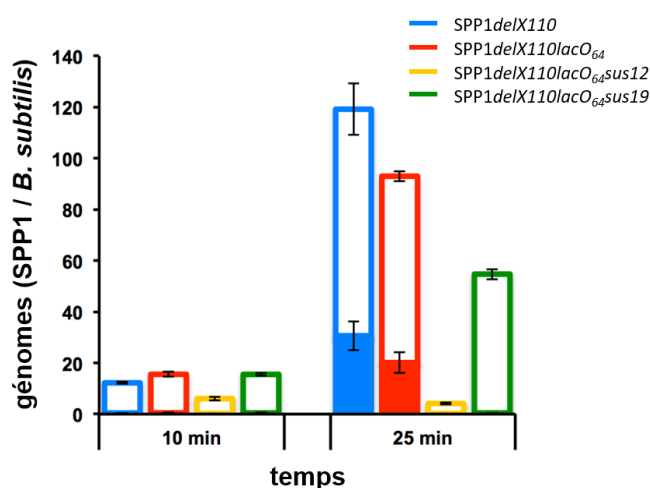


Figure 41 : Quantification du nombre de copies d'ADN viral total (barre vide) et encapsidé (barre pleine) par PCR quantitative à 10 minutes et 25 minutes post-infection. La souche GSY10004 a été infectée avec les phages SPP1delX110 (en bleu), SPP1delX110lacO₆₄ (en rouge), SPP1delX110lacO₆₄sus12 (en jaune) et SPP1delX110lacO₆₄sus19 (en vert) avec une multiplicité d'infection de 5 pfu.cfu⁻¹. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

La réplication et d'une façon moins importance l'encapsidation de l'ADN sont réduites lors de l'infection de la souche produisant la protéine LacI-mcherry par SPP1delX110lacO₆₄ en comparaison avec le phage parental SPP1delX110 (**Figure 41**). Pour mieux caractériser cet effet, nous avons quantifié par titration le nombre de particules infectieuses totales dans des cellules infectées par le phage SPP1 sauvage (SPP1wt), le phage délété de la région *delX110* (SPP1delX110) et le phage dans lequel les 64 motifs *lacO* ont été insérés (SPP1delX110lacO₆₄).

Durant les 15 premières minutes, le nombre de particules infectieuses totales est inférieur à 4.10⁻¹ phages par bactérie dans les 3 infections (résultats non montrés) (**Figure 42A**). A partir de 15 minutes, leur nombre augmente de façon exponentielle. Pour cette expérience (et pour les suivantes), la quantification a été faite jusqu'à 30 minutes, point après lequel la lyse bactérienne démarre conduisant à un fort ralentissement de la densité optique de la culture suivi par sa décroissance rapide (**Figure 42B**). Ces résultats montrent, tout d'abord, que la délétion *delX110* réduit la descendance des particules virales par rapport au phage sauvage. Un effet plus prononcé est observé pour SPP1delX110lacO₆₄. La présence des répétitions du motif *lacO* sur son génome réduit d'un facteur de 2,5 la descendance de ce phage par rapport au phage parental SPP1wt et d'un facteur de 1.5 par rapport au phage SPP1delX110 à 30 minutes post-infection (**Figure 42A**). Cette différence, qui est en

accord avec les résultats de PCR quantitative (**Figure 41**) peut s'expliquer par la présence de la protéine LacI-mCherry liée avec une forte affinité aux motifs *lacO*₆₄ intégrés dans le génome de SPP1. En effet, les machines moléculaires de réplication et d'encapsidation du génome doivent enlever la protéine LacI-mCherry de l'ADN de SPP1*delX110lacO*₆₄, ce qui entraîne un ralentissement de ces deux processus.

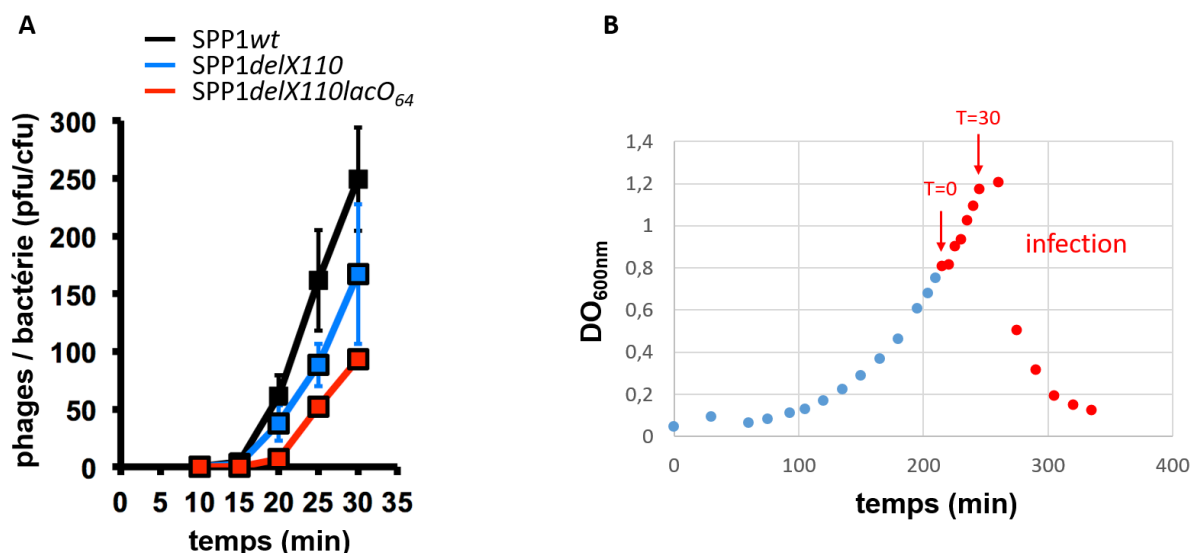


Figure 42 : (A) Quantification par titration du nombre de particules infectieuses totales par bactérie à 0, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes post-infection. La souche GSY10004 a été infectée par les phages SPP1wt (en noir), SPP1*delX110* (en bleu) et SPP1*delX110lacO*₆₄ (en rouge) avec une multiplicité d'infection de 5. Des aliquots de la culture infectée ont été prélevés aux temps indiqués et lysés avec du chloroforme dans la glace pendant 2 heures avant titration. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes. (B) Courbe de lyse de cellules GSY10004 infectées par le phage SPP1*delX110lacO*₆₄ avec une multiplicité de 5 à DO_{600nm} = 0,8.

Pour comprendre l'évolution de la quantité totale d'ADN dans la cellule au cours de l'infection, nous avons quantifié sa concentration totale, ADN viral et ADN bactérien confondus, de 0 à 30 minutes post-infection. Pour cela, nous avons travaillé sur des cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO*₆₄ et des cellules non-infectées. Nous avons aussi distingué l'ADN total de celui retrouvé dans les particules virales (**Figure 43**).

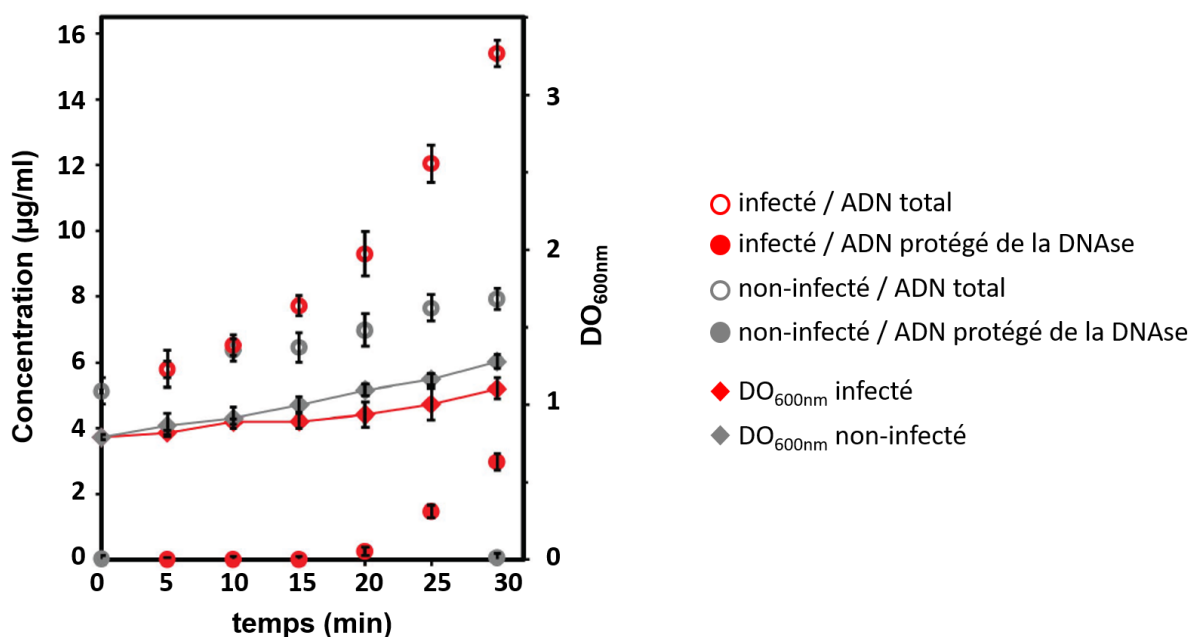


Figure 43 : Quantification de la concentration d'ADN total dans des bactéries infectées et non-infectées. L'expérience a été faite sur des cellules GSY10004 non-infectées (symboles gris) et infectées par le phage SPP1delX110lacO₆₄ avec une multiplicité d'infection de 5 aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes post-infection (symboles rouges). Les deux cultures, non-infectée et infectée, sont issues d'une même culture initiale jusqu'au moment de l'infection pour permettre une analyse comparative. Les culots d'échantillons bactériens prélevés à différents temps ont été traités pour extraire soit l'ADN total des cellules (ADN total, cercles vides) soit uniquement l'ADN encapsidé dans les particules virales (ADN protégé de la DNase, cercles pleins). Les concentrations d'ADN ont été déterminées par Qubit (échelle de gauche). La densité optique des cellules infectées et non-infectées a également été mesurée à chaque point de la cinétique (losanges, échelle de droite). Les résultats présentés sont la moyenne de 3 expériences indépendantes.

La **Figure 43** illustre que lors de l'infection, la quantité d'ADN total dans la cellule commence à augmenter de manière significative à 15 minutes post-infection pour aller jusqu'à doubler à 30 minutes si on la compare à des cellules non-infectées. On observe l'apparition d'ADN protégé dans des capsides virales à partir de 20 minutes. A 30 minutes post-infection, dans les cellules infectées et après soustraction de la concentration d'ADN correspondant à celle de *B. subtilis*, 44 % de l'ADN retrouvé dans la bactérie correspond à de l'ADN protégé. Le suivi de la densité optique des cultures met en évidence qu'il y a peu de variation dans les densités optiques de ces deux cultures jusqu'à 30 minutes avec toutefois un ralentissement dans la croissance des cellules infectées.

Cette expérience n'apporte qu'une estimation approximative du ratio entre les quantités d'ADN viral et bactérien. Pour distinguer et quantifier de manière rigoureuse l'origine de chaque ADN, des expériences de PCR quantitative ont été menées.

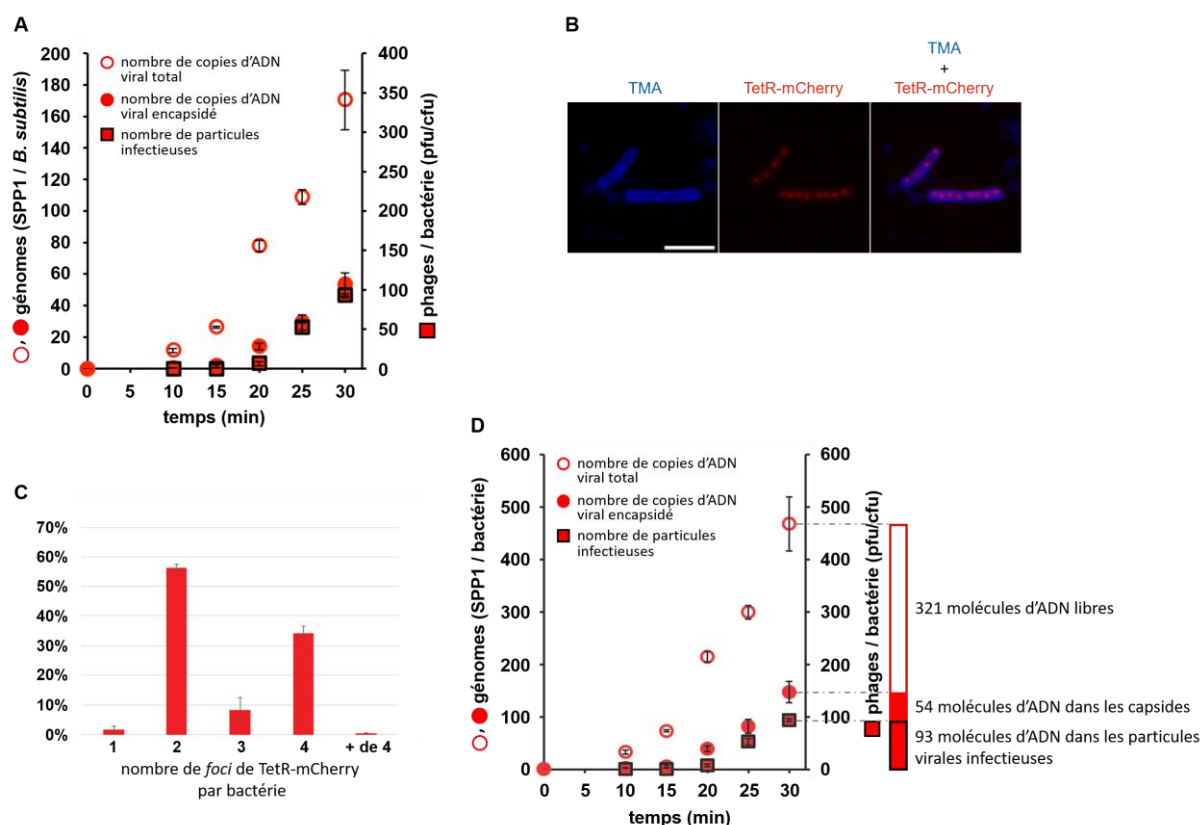


Figure 44 : Quantification du nombre de copies du génome de SPP1delX110lacO₆₄ pendant l'infection. (A) PCR quantitative du nombre de copies de génome viral total (cercles vides) et encapsidé (cercles pleins) par génome bactérien au cours du temps (échelle de gauche). Le nombre total de particules virales infectieuses formées (intra- et extra- cellulaires) a été quantifié par titration (échelle de droite). La souche GSY10004 a été infectée avec le phage SPP1delX110lacO₆₄ avec une multiplicité de 5. **(B)** Localisation de l'origine de réplication du chromosome bactérien. Des cellules GSY10051 produisant la protéine TetR-mCherry (rouge) et ayant une insertion du motif *tetO*₁₆₇ dans la région *oriC* ont été observées par microscopie de fluorescence. Le contour cellulaire a été visualisé avec le marqueur membranaire TMA (bleu). La barre d'échelle correspond à 5 μ m. **(C)** Comptage du nombre de foyers de la région *oriC* retrouvé par bactérie utilisant le système rapporteur de **(B)**. Une moyenne de 200 bactéries a été comptée et le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. **(D)** La valeur moyenne de 2,74 copies du chromosome de *B. subtilis* par bactérie issue de **(C)** permet de rapporter le nombre de génomes de SPP1 par génome bactérien obtenus par PCR quantitative en **(A)** au nombre de génomes de SPP1 synthétisés par bactérie (échelle de gauche). Ces valeurs peuvent être directement comparées au nombre de particules infectieuses par bactérie (échelle de droite). Ces données permettent ainsi de quantifier la moyenne de molécules d'ADN synthétisées, encapsidées et le nombre de particules infectieuses formées par bactérie infectée. Les valeurs à 30 minutes post-infection sont présentées dans le schéma à droite.

Les **Figures 43, 44A et 44D** illustrent que les 15 premières minutes de l'infection sont principalement dédiées à la réplication de l'ADN viral. A partir de 15 minutes, quelques molécules d'ADN sont retrouvées protégées dans les capsides, suggérant que l'encapsidation débute. Cependant, les particules virales infectieuses ne sont pas détectables. Ce n'est qu'à partir de 25 minutes que les premiers virions sont dénombrés dans les cellules infectées.

La présence de très nombreuses copies d'ADN viral non-encapsidées suggère qu'il semble important qu'un pool d'ADN viral libre soit présent en quantité suffisante dans la bactérie pour que

l'encapsidation puisse démarrer. Son pourcentage va augmenter jusqu'à atteindre 70 % à 30 minutes post-infection montrant que la réplication n'est pas un facteur limitant et qu'elle a lieu pendant tout le processus infectieux.

Ces résultats (**Figure 44A**) ont été obtenus par PCR quantitative en faisant le ratio du nombre de génomes de SPP1 sur le nombre de génomes de *B. subtilis* quantifié dans chaque échantillon. Afin de pouvoir comparer ces données au nombre de phages infectieux produits par bactérie (échelle de droite sur la **Figure 44A**), il est nécessaire de le convertir en nombre de génomes de SPP1 par bactérie. Pour cela, la souche GSY10051, produisant la protéine TetR-mCherry et ayant une insertion du motif *tetO*₁₆₇ dans la région *oriC*, permet de compter le nombre d'origines de réplication par bactérie (**Figure 44B**). Le marqueur membranaire TMA a été utilisé pour définir le contour bactérien. Ce comptage a permis de définir une moyenne 2,74 origines de réplication par bactérie dans nos conditions de culture (**Figure 44C**), une valeur inférieure aux 4 origines de réplication par cellule obtenue dans les conditions de culture de *B. subtilis* de Moriya *et al* (2009).

La connaissance du nombre moyen de génomes bactériens par bactérie a permis de convertir le ratio de génomes de SPP1/*B. subtilis* (**Figure 44A**) en nombre de génomes de SPP1/bactérie (**Figure 44D**). Ainsi, en ajustant les échelles (**Figure 44D**), on peut conclure que la plupart des capsides qui ont empaqueté de l'ADN de SPP1 mène à la formation de particules virales infectieuses. Au total, à 30 minutes post-infection, le cytoplasme bactérien contient en plus du génome de *B. subtilis*, environ 320 copies du génome viral libres, 50 capsides pleines d'ADN et 100 particules infectieuses de SPP1~~delX110lacO~~₆₄.

On observe que, lors de l'infection, la quantité d'ADN de SPP1 augmente exponentiellement dès la détection des premières copies du génome viral ($\approx$ 10 minutes post-infection) jusqu'à la lyse (**Figures 44A et 44D**). A 30 minutes post-infection, $\approx$ 470 copies du génome de SPP1 sont synthétisées par bactérie (**Figure 44D**) ce qui correspond à un peu plus de 20 Mpb d'ADN. Cette valeur est 1,8 fois supérieure à la masse d'ADN bactérien qui est d' $\approx$ 11 Mpb, en considérant une moyenne de 2,74 copies du génome de *B. subtilis* par bactérie (**Figure 44C**). Bien que la quantité d'ADN total dans la cellule infectée ne soit que dupliquée dans les mesures obtenues par Qubit (**Figure 43**), ce qui peut correspondre à une sous-estimation, il est clair que l'infection impose un effort majeur à la machinerie de réplication de l'ADN.

III.1.2. Coût de l'infection de SPP1~~delX110lacO~~₆₄ pour la cellule

La synthèse de l'ADN viral et l'assemblage des particules virales sont des processus très énergivores en ressources cellulaires. Les données quantitatives obtenues ci-dessus nous permettent de faire un calcul de leur facture énergétique pour *B. subtilis* en matière de molécules d'ATP hydrolysées en

utilisant les hypothèses et les valeurs décrites par Mahmoudabadi *et al* (2017). Le nombre de molécules d'ATP utilisées pour la réplication (synthèse d'ADN) et pour l'assemblage de la particule virale (transcription et traduction des protéines structurales ainsi que l'énergie dépensée par le moteur qui encapside l'ADN dans la procapside virale) a été calculé (coût direct). Un coût indirect lui a été rajouté. Ce coût indirect est le résultat de l'utilisation de précurseurs métaboliques pour la biosynthèse de nucléotides et d'acides aminés nécessaire à la réplication et à l'assemblage de la particule virale. Ces précurseurs métaboliques ne sont ainsi pas utilisés comme source d'énergie pour la synthèse de molécules d'ATP (Mahmoudabadi *et al*, 2017).

De manière équivalente aux deux virus pris comme exemples dans l'étude de Mahmoudabadi *et al* (2017), nous avons calculé l'énergie que coûtait la formation de 150 particules virales (≈ 50 capsides et ≈ 100 virus infectieux) (**Figure 44D**) pour *B. subtilis* (voir section II.2.8). Les processus considérés sont spécifiques à la réplication du génome viral présent dans ces particules (nt), à la transcription des gènes codant pour les protéines structurales (nt), à l'encapsidation de l'ADN viral (nt) et enfin à la traduction des protéines structurales (AA).

Tableau 10 : Coût énergétique de l'infection de SPP1delX110lacO₆₄ pour la bactérie *B. subtilis*. Les coûts pris en compte pour cette infection sont seulement la réplication de l'ADN viral encapsidé, la transcription de gènes de protéines du virion, l'encapsidation du génome et la traduction des protéines du virion. D'abord, le calcul a été fait pour une particule virale (par virion) puis il a été multiplié par 150 (par infection) pour avoir le coût total de chaque processus. Une unité correspond à l'énergie résultant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La taille du génome dans le virion est de 45,1 kpb (Godinho *et al*, 2018) et la particule virale est composée de $\approx 2.10^5$ AA (section II.2.8) (**Tableau 8**).

		Réplication	Transcription	Encapsidation	Traduction	Total
Cout direct	Par virion	$1,173.10^6$	$0,979.10^5$	$9,02.10^4$	$1,252.10^6$	$2,613.10^6$
	Par infection	$1,759.10^8$	$1,468.10^7$	$1,353.10^7$	$1,878.10^8$	$3,92.10^8$
Cout indirect	Par virion	$3,067.10^6$	$1,035.10^5$		$5,22.10^6$	$8,391.10^6$
	Par infection	$4,6.10^8$	$1,552.10^7$		$7,83.10^8$	$1,259.10^9$
Cout total	Par virion	$4,24.10^6$	$2,014.10^5$	$9,02.10^4$	$6,473.10^6$	$1,1.10^7$
	Par infection	$6,359.10^8$	$3,02.10^7$	$1,353.10^7$	$9,71.10^8$	$1,65.10^9$

La consommation d'ATP (source d'énergie retrouvée chez tous les organismes vivants) est utilisée comme référence parce qu'elle permet la comparaison du coût de ces processus entre les différents systèmes biologiques. Les valeurs obtenues ne concernent que les processus dédiés à la formation de la particule virale. Par contre, ils ne tiennent compte ni des autres processus associés à l'infection, ni de la synthèse des protéines non structurales du phage, ni des produits phagiques produits en excès et non-incorporés dans la particule virale (exemple : ADN phagique libre dans la cellule, **Figure 44D**). Le coût calculé reste donc une sous-estimation de l'effort énergétique total demandé à la cellule pendant l'infection par SPP1.

Dans le **Tableau 10**, on observe que, comme pour les deux virus étudiés dans le papier (T4 et Influenza), le processus le plus coûteux pour la cellule est la traduction des protéines structurales de la particule virale.

III.1.3. Localisation de l'ADN viral libre dans la cellule infectée

La quantification d'ADN viral pendant l'infection met en évidence qu'une quantité d'ADN supérieure à celle de la bactérie est synthétisée dans un intervalle de temps de 20 minutes (entre les temps 10 et 30 minutes post-infection, **Figures 43, 44A et 44D**). Il a été montré précédemment que la réplication du génome de SPP1 a lieu dans un foyer dans le cytoplasme de *B. subtilis* (**Figure 7**) (Jakutyte *et al*, 2011). Nous nous sommes donc ensuite intéressés à une étude plus approfondie de la localisation de la réplication dans les cellules infectées et aux facteurs cellulaires et viraux impliqués dans ce processus complexe.

Le système rapporteur de Jakutyte *et al* (2011) permettant la localisation des molécules d'ADN viral dans le cytoplasme de cellules bactériennes infectées a été utilisé (**Figure 7**). Le foyer de réplication occupe une position bien définie dans le cytoplasme de la bactérie et il augmente en taille au fur et à mesure que la réplication a lieu.

Afin de comprendre comment l'ADN viral évoluait dans la cellule au cours du temps, nous avons quantifié plusieurs paramètres sur la taille, l'intensité et la localisation du foyer de réplication dans les cellules infectées. Pour cela, des cellules infectées par SPP1*delX110lacO₆₄* (**Figure 45A**) ou par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* (**Figure 45B**), un mutant incapable d'encapsider l'ADN viral, ont été analysées à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection).

Il est important de noter que, dans les observations de microscopie de fluorescence faites sur pad d'agarose, le cycle infectieux est significativement ralenti par rapport aux infections en milieu liquide. En effet, 12 à 20 minutes après le début de l'infection faite en milieu liquide à 37°C, les bactéries infectées sont transférées sur un pad d'agarose préparé dans de l'eau, pour limiter l'auto-fluorescence du milieu LB, et incubées à température ambiante avec une faible oxygénation (**Figures 36A et 36B**). Les temps post-infection dans ces expériences d'infection non-optimale ne peuvent donc pas être directement comparés aux temps observés en culture liquide. De plus, pour les analyses quantitatives d'imagerie des bactéries infectées, seules les cellules mono-infectées (avec un seul foyer de réplication) ont été traitées. Enfin, le pourcentage de bactéries non-infectées a été calculé suivant la loi de Poisson dans les populations bactériennes analysées pour confirmer que la majorité des bactéries observées était mono-infectée.

Dans la **Figure 45D**, on observe que quelle que soit la taille du foyer de réplication, sa distance moyenne aux pôles ne varie pas indiquant que la place définie à des temps précoces se maintient à des temps tardifs malgré la croissance de la bactérie. En ce qui concerne son intensité moyenne, elle est 1,5 fois inférieure dans l'infection par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* comparée à celle par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* (**Figure 45E**). D'un autre côté, la forme du foyer dans les cellules infectées par SPP1*delX110lacO₆₄sus19* est significativement plus allongée, en particulier à des temps tardifs, que celle retrouvée dans les cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* (**Figure 45F**). La grande taille des foyers de réplication de SPP1*delX110lacO₆₄sus19* et leur faible intensité suggèrent que l'ADN phagique est moins compacté dans le foyer lorsqu'il n'y a pas d'encapsidation de l'ADN. Cependant, on ne peut pas exclure qu'à des temps tardifs, la disponibilité de la protéine rapportrice LacI-mCherry devient limitante car elle totalement recrutée sur l'ADN viral, impliquant que tout l'ADN libre de SPP1 n'est pas marqué.

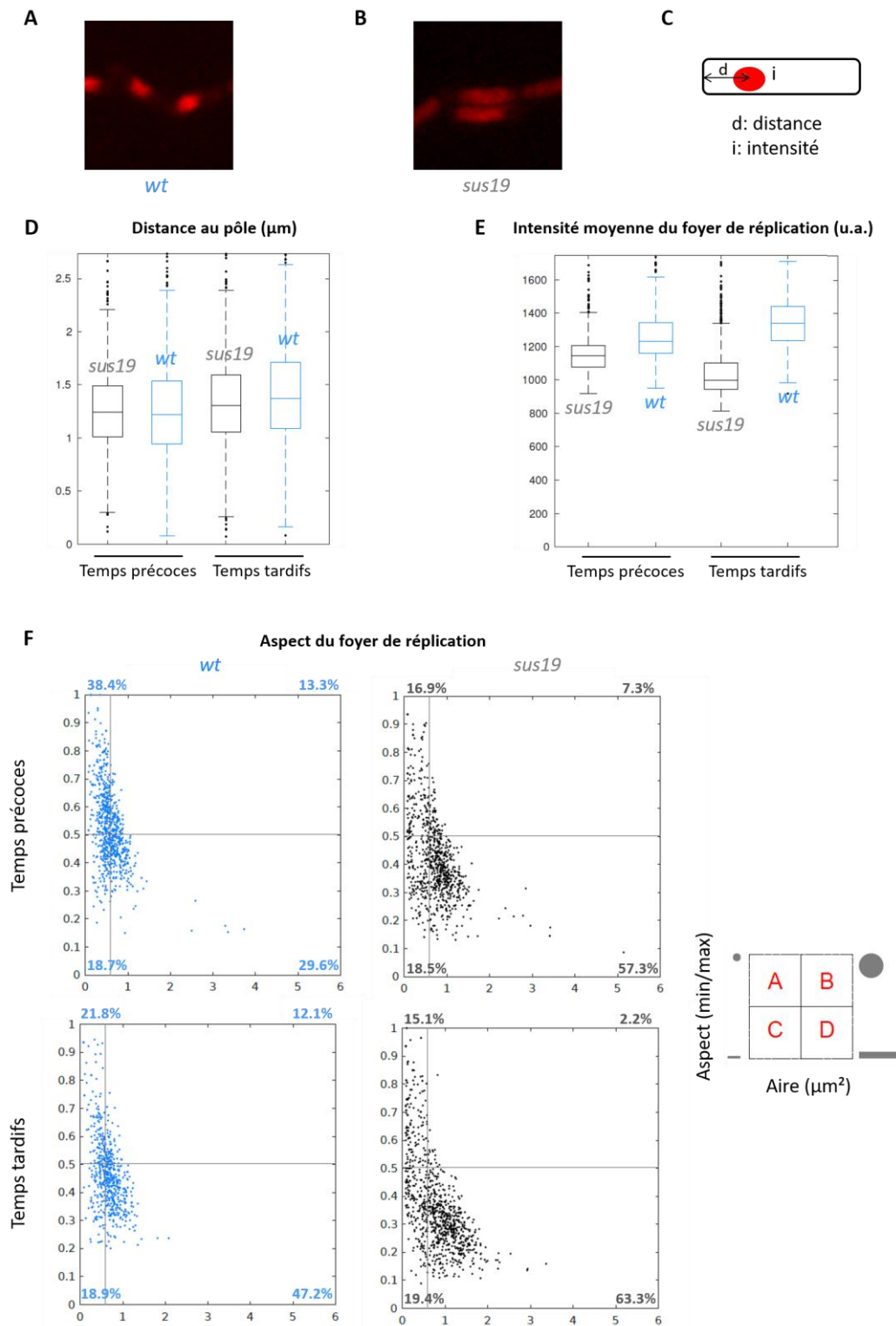


Figure 45 : Analyses quantitatives de la localisation des foyers de réplication dans des bactéries mono-infectées. Des bactéries GSY10024 et GSY10025 ont été respectivement infectées par les phages **(A)** *SPP1delX110lacO₆₄* (abrégé *wt*, en bleu) ou **(B)** *SPP1delX110lacO₆₄sus19* (abrégé *sus19*, en gris) avec une multiplicité d'infection de 2 phages par bactérie, calculée à partir du titre du lysat des phages. Cette valeur a été corrigée *a posteriori*, basée sur le nombre de bactéries non-infectées dans la population totale en utilisant la loi de Poisson. **(C)** Le schéma est une aide visuelle pour identifier la taille et la forme des foyers attendus. Les quantifications ont été faites uniquement sur des cellules présentant un seul foyer de réplication (mono-infection) à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection). Une moyenne de 600 bactéries mono-infectées pour chaque condition a été analysée et les quantifications représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. **(D)** Distance du foyer de réplication au pôle le plus proche (en μm). **(E)** Intensité moyenne dans le foyer de réplication (u.a. : unité arbitraire). **(F)** Aspect (min/max) du foyer de réplication en fonction de l'aire totale du foyer de réplication exprimée en μm².

III.1.4. Protéines cellulaires impliquées dans la réplication virale

Contrairement à d'autres bactériophages tels que T7 (Grippe & Richardson, 1971 ; Oey *et al*, 1971) ou $\Phi 29$ (Watabe & Junetsu, 1983 ; Blanco & Salas, 1984), le phage SPP1 ne code pas pour sa propre ADN polymérase et il est dépendant de plusieurs protéines du réplisome de *B. subtilis* pour répliquer son génome (section I.4.3) (Pedré *et al*, 1994) (**Tableaux 2 et 11**). On peut observer que les protéines qui constituent le cœur du réplisome sont essentielles à la réplication de l'ADN viral hormis l'hélicase (**Figure 24A et Tableau 11**). Nous avons donc étudié si les protéines du réplisome bactérien colocalisaient avec le foyer de réplication de SPP1 pour évaluer leur implication dans la réplication de l'ADN viral. Les protéines de *B. subtilis* participant à la réplication du génome de l'hôte ont été fusionnées avec une protéine fluorescence GFP (Meile *et al*, 2006) ou mCFP (ce travail) et leur localisation a été visualisée par microscopie de fluorescence en absence et en présence d'infection (**Figure 46**).

Tableau 11 : Protéines du réplisome de *B. subtilis*, leur fonction dans le complexe de réplication, leur rôle dans l'infection de SPP1 (Pedré *et al*, 1994) et leur localisation dans la cellule non-infectée cultivée en milieu riche LB (Meile *et al*, 2006). Les fusions de ces protéines à des protéines fluorescentes utilisées dans ce travail sont présentées à droite.

Protéines de <i>B. subtilis</i>	Fonction	Essentielle pour la réplication de SPP1	Localisation dans la cellule non-infectée	Fusion
PolC	polymérase	oui	centrale	C-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006)
DnaE	polymérase (brin retardé)	oui	centrale	C-Ter (Dervyn <i>et al</i> , non publié)
DnaX	ADN polIII (sous-unité τ), facteur de chargement	oui	centrale	C-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006) N-Ter (ce travail)
DnaN	ADN polIII (sous-unité β), pince glissante	oui	centrale	N-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006)
DnaG	primase	oui	homogène	N-Ter (ce travail)
SsbA	protéine de liaison à l'ADN simple brin	non	centrale	N-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006)
DnaB	protéine initiateur de la réplication de l'ADN	non	centrale, proche de la membrane	N-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006)
DnaC	hélicase	non	homogène	N-Ter (Meile <i>et al</i> , 2006)

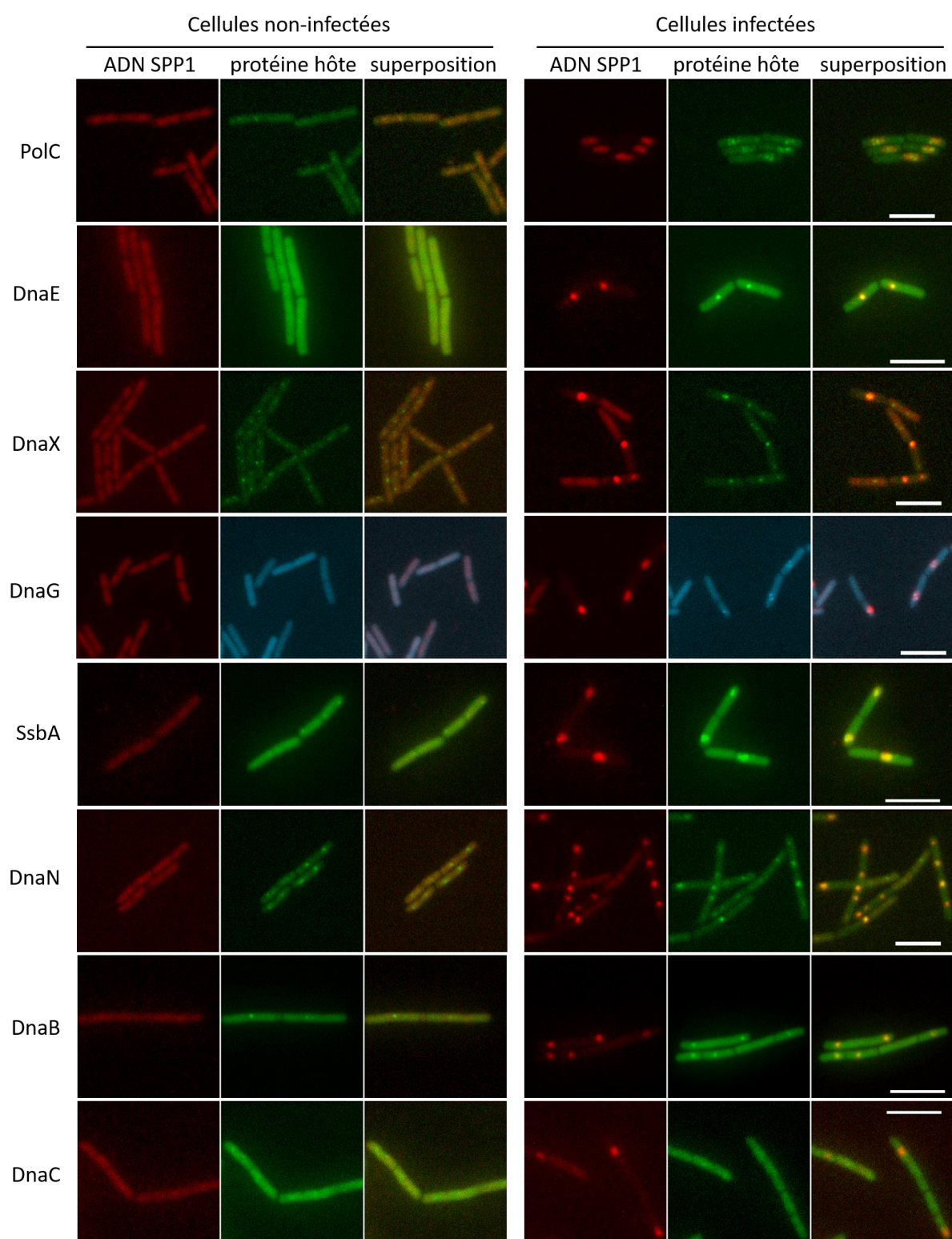


Figure 46 : Localisation des protéines du réplisome bactérien dans des cellules dérivées de *B. subtilis* GSY1004 non-infectées et infectées avec le phage SPP1~~delX110~~lacO₆₄. Les bactéries ont été infectées avec une multiplicité d'infection de 2 phages par bactérie et visualisées à des temps tardifs post-infection. Les fusions de protéines fluorescentes aux composants du réplisome bactérien sont listées dans le **Tableau 11**. L'échelle représente 5 µm.

En absence d'infection, les protéines du réplisome de *B. subtilis* peuvent être séparées en deux catégories : les protéines qui restent homogènes dans le cytoplasme de la bactérie et les protéines qui vont se localiser et former un foyer. Dans cette dernière catégorie, on retrouve les protéines PolC, DnaX, SsbA, DnaN et DnaB (**Tableau 11** et **Figure 46 - gauche**). L'intensité est différente selon la protéine étudiée. Les protéines du réplisome étant essentielles à la réplication du génome bactérien, cette localisation pourrait correspondre aux fourches de réplication de l'ADN bactérien. Il est important de prendre en compte le fait que dans les cellules observées, il co-existe la protéine endogène et la protéine fusionnée avec la protéine fluorescence, la protéine endogène pouvant être privilégiée à celle marquée.

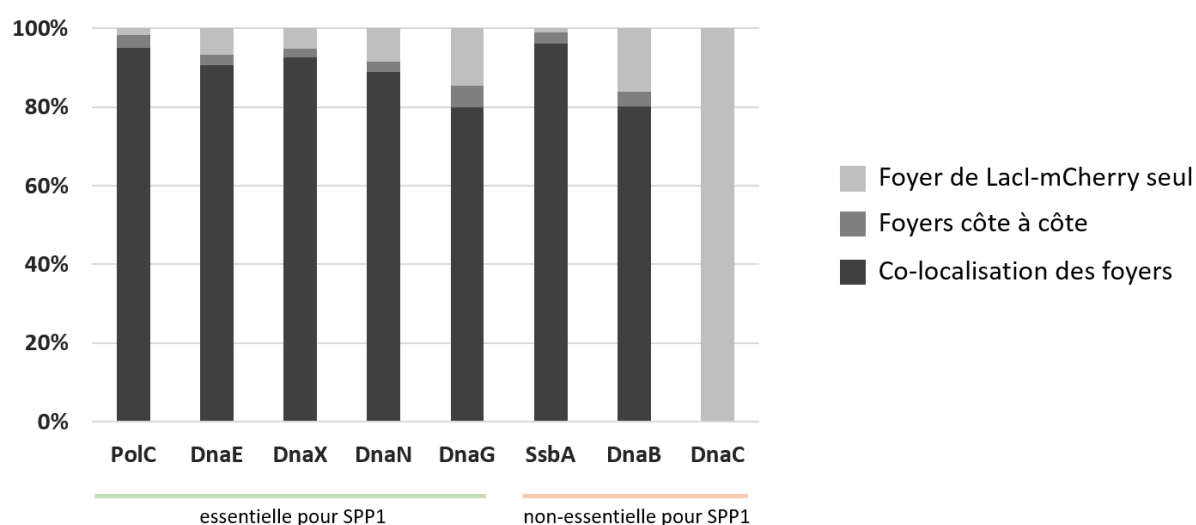


Figure 47 : Localisation des protéines du réplisome bactérien par rapport au foyer de réplication phagique. Un nombre de 100 bactéries a été compté pour chaque souche étudiée.

Lorsque les cellules sont infectées par SPP1, toutes les protéines du réplisome bactérien colocalisent avec le foyer de réplication du virus à l'exception de l'hélicase bactérienne DnaC (**Figures 46 et 47**). Les foyers des protéines du réplisome deviennent rapidement plus grands que ceux observés dans les cellules non-infectées et leur taille va augmenter avec celle du foyer de réplication viral. Certaines protéines, non-essentiels à la réplication de l'ADN de SPP1 (SsbA et DnaB), sont aussi recrutées au sein du foyer de réplication (**Figures 46 et 47**). Ceci suggère que c'est l'ensemble du réplisome bactérien qui est globalement détourné pour la synthèse de nouvelles copies de l'ADN viral. Seule l'hélicase, DnaC, reste homogène dans le cytoplasme. Il est aussi intéressant d'observer que DnaB semble quitter sa localisation péri-membranaire retrouvée dans la bactérie non-infectée (section I.5.2) (**Figures 25C et 46**) (Meile *et al*, 2006 ; Jameson & Wilkinson, 2017).

On peut aussi noter que la localisation des protéines du réplisome au sein du foyer de réplication pendant l'infection est différente d'une protéine à l'autre. Les protéines PolC, DnaX et DnaG ont une distribution ponctiforme et non-homogène, contrairement aux protéines DnaE, SsbA, DnaN et DnaB

qui ont la même forme que la zone de réplication (**Figure 46**). La localisation ponctiforme pourrait correspondre à des zones du foyer avec une forte activité de réplication.

L'hélicase bactérienne DnaC, protéine essentielle à l'ouverture de l'ADN pour permettre au complexe de réplication de s'apparier aux fourches de réplication, n'est pas nécessaire pour la réplication de l'ADN viral et ne semble pas être recrutée au sein du foyer (**Figures 46 et 47, Tableau 11**).

III.1.5. Protéines virales impliquées dans la réplication de l'ADN du phage

III.1.5.1. Initiation de la réplication

L'initiation de la réplication requiert les protéines virales gp38, gp39 et gp40 (**Figure 20**). Nous nous sommes intéressés en particulier à l'hélicase de SPP1, gp40. Cette protéine, essentielle à la réplication de l'ADN du phage, est un homologue de l'hélicase bactérienne DnaC. Gp40 catalyse l'ouverture de l'ADNdb permettant ainsi au réplisome de se fixer à l'ADNsb et de démarrer la réplication. Cette protéine est connue pour interagir avec la partie N-terminale de la primase DnaG du réplisome bactérien (Wang *et al*, 2007) et avec la partie C-terminale de la protéine DnaX (Martínez-Jiménez *et al*, 2002). Son gène a été fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente mCitrine en 3' (gp40-mCitrine) et a été inséré dans le chromosome bactérien dans le locus *sacA* sous le contrôle d'un promoteur *spac* inductible à l'IPTG. On note que le rajout de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM n'inhibe pas suffisamment la liaison de LacI-mCherry aux répétitions *lacO₆₄* présentes sur le génome de SPP1 permettant la visualisation simultanée de l'ADN de SPP1~~*IX110lacO₆₄*~~ et de gp40-mCitrine. La localisation de gp40-mCitrine a été étudiée en absence et présence d'infection. La complémentation de cette souche avec le phage SPP1~~*IX110lacO₆₄*~~*sus12* (gp40⁻) ne produisant pas cette protéine a été testée et validée.

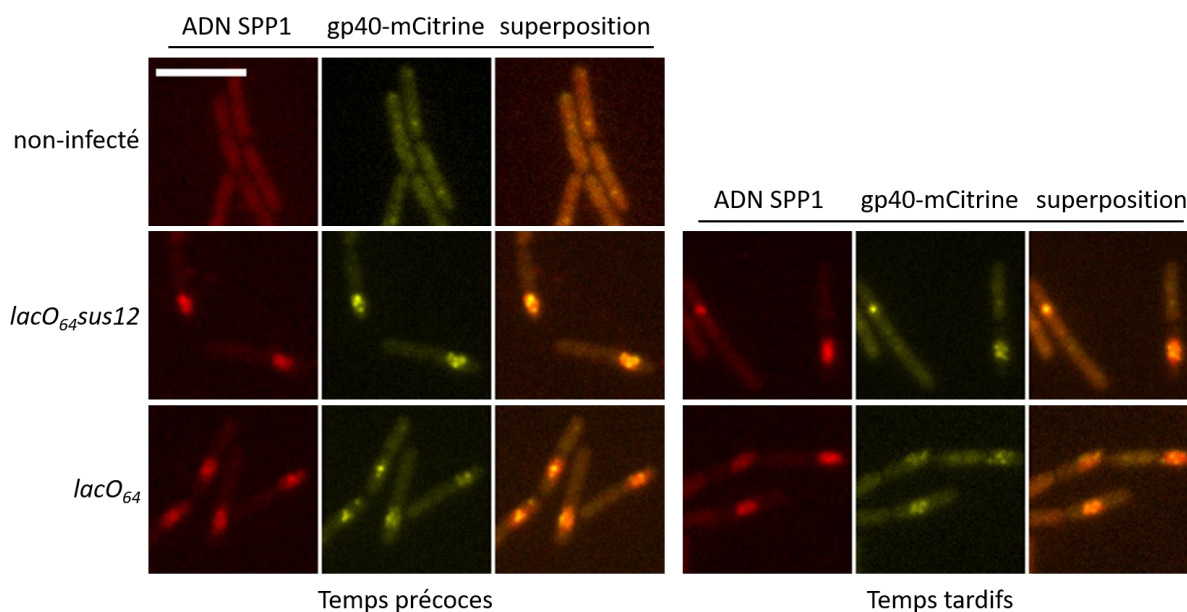


Figure 48 : Localisation de la protéine gp40-mCitrine dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et après infection avec les phages SPP1*delX110lacO₆₄sus12* (gp40⁻) et SPP1*delX110lacO₆₄* avec une multiplicité d'infection de 2 à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection). De petits foyers fluorescents de gp40-mCitrine sont détectés dans les bactéries non-infectées (flèches blanches). L'échelle représente 5 µm.

En absence d'infection, la distribution de gp40 n'est pas homogène dans le cytoplasme de la bactérie. Elle se localise dans de petits foyers dans le cytoplasme bactérien (flèches blanches dans la **Figure 48**). Ce "pattern" ressemble à celui retrouvé dans les cellules non-infectées pour les protéines PolC ou DnaX (**Figure 46**). Compte tenu de la capacité de gp40 à interagir avec deux protéines du réplisome bactérien (DnaG et DnaX), cette localisation, spécifique, a fort probablement lieu au niveau des fourches de réplication de l'ADN bactérien.

Lorsque les cellules sont infectées par SPP1, on observe un recrutement massif de gp40 au sein du foyer de réplication. Ce recrutement est plus important dans le mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus12* qui n'est pas capable de produire la protéine gp40, notamment à des temps précoces. Dans ce mutant, seule la protéine gp40-mCitrine est utilisée pour la réplication de l'ADN viral. De manière intéressante, la localisation de la protéine gp40 n'est pas homogène dans le foyer de réplication, il semble y avoir des zones plus enrichies en gp40 (**Figure 48**). Ce profil ressemble à celui retrouvé pour les protéines DnaX et PolC en conditions d'infection (**Figure 46**).

Afin de savoir si la protéine gp40 colocalise avec DnaX dans des régions spécifiques des foyers de réplication, nous avons inséré la fusion mCFP-DnaX dans le locus *amyE* du chromosome de la bactérie dans la souche codant pour gp40-mCitrine. La localisation des protéines gp40 et DnaX a été suivie en absence et en présence d'infection (**Figure 49**).

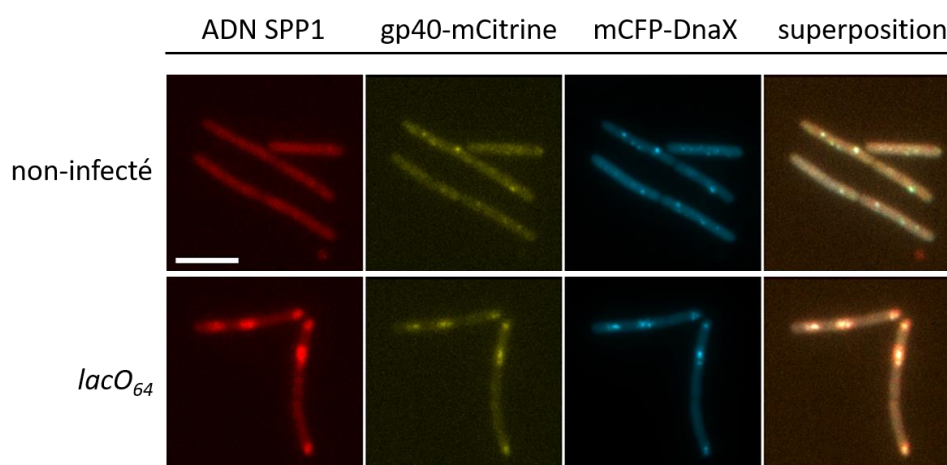


Figure 49 : Localisation de l'ADN de SPP1 et des protéines gp40-mCitrine et mCFP-DnaX dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et infectées avec le phage SPP1~~deIX110~~*lacO*₆₄ (abrégé *lacO*₆₄) avec une multiplicité d'infection de 2 après 30 minutes d'infection. L'échelle représente 5 µm.

Dans les cellules non-infectées, les protéines gp40 et DnaX forment de petits foyers qui colocalisent l'un avec l'autre. Nous suspectons que les deux protéines sont recrutées dans les fourches de réplication de l'ADN bactérien. En conditions d'infection, les deux protéines sont retrouvées en plus grande quantité dans le foyer de réplication de SPP1 où elles colocalisent avec un "pattern" ponctiforme (**Figure 49**). La protéine gp40 semble être la protéine qui recrute le réplisome bactérien des fourches de réplication de l'ADN bactérien vers l'ADN viral.

L'hélicase virale gp40 est essentielle, avec les protéines gp38 et gp39, pour l'initiation de la réplication. Ces 3 protéines virales sont nécessaires et suffisantes au démarrage de la réplication dans *B. subtilis* où elles vont recruter le réplisome bactérien *via* les interactions de gp40 avec DnaX et DnaG (**Figure 20**) (section I.4.3.1) (Seco & Ayora, 2017). Afin de comprendre si ces 3 protéines sont uniquement destinées à la réplication l'ADN de SPP1 ou capables de répliquer tout type d'ADN circulaire, un système minimal de réplication a été construit dans un plasmide pAL47 contenant un gène de résistance au chloramphénicol, des répétitions *lacO* et le gène 38 de SPP1 qui inclut l'origine de réplication de SPP1 *oriL* (**Figure 32**).

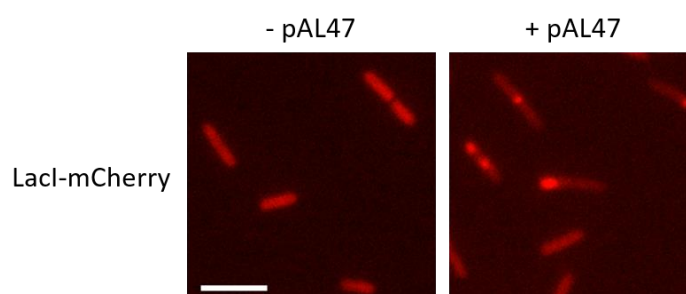


Figure 50 : *B. subtilis* GSY10092 produisant LacI-mCherry et les protéines virales gp39 et gp40 en absence ou en présence du plasmide pAL47. Le système génétique utilisé est schématisé dans la **Figure 32**. Les détails de sa construction sont décrits dans la section II.2.1.2.5. L'échelle représente 5 µm.

La **Figure 50** montre que lorsque le plasmide pAL47 est absent de la cellule, la fluorescence de LacI-mCherry reste homogène. Par contre, lorsque le plasmide est présent, il se réplique à partir d'*oriL* rendant les bactéries résistantes au chloramphénicol et la cellule présente des foyers de réplication du plasmide pAL47. Gp38, gp39 et gp40 ne sont pas uniquement spécifiques de l'ADN viral et permettent la réplication d'autres types d'ADN circulaire dans *B. subtilis* à partir d'origines reconnues par gp38.

III.1.5.2. Switch du mode de réplication theta au mode sigma

La réplication du bactériophage SPP1 se fait selon deux modes: le premier (mode theta) permet, à partir de la première copie d'ADN viral entrée dans la cellule et recircularisée, de répliquer l'ADN sous forme circulaire. Après quelques cycles de réplication permettant de générer un nombre suffisant de copies d'ADN circulaire, le mode de réplication va changer pour un mode sigma afin de produire des concatémères d'ADN, substrat nécessaire à l'encapsidation (**Figure 40A**) (section I.4.3.2). Cette transition essentielle pour le phage dépend principalement de deux protéines de SPP1 : l'exonucléase 5'>3' gp34.1 et la recombinaison gp35 (essentielle à la réplication) (**Figures 21 et 40B, Tableau 1**).

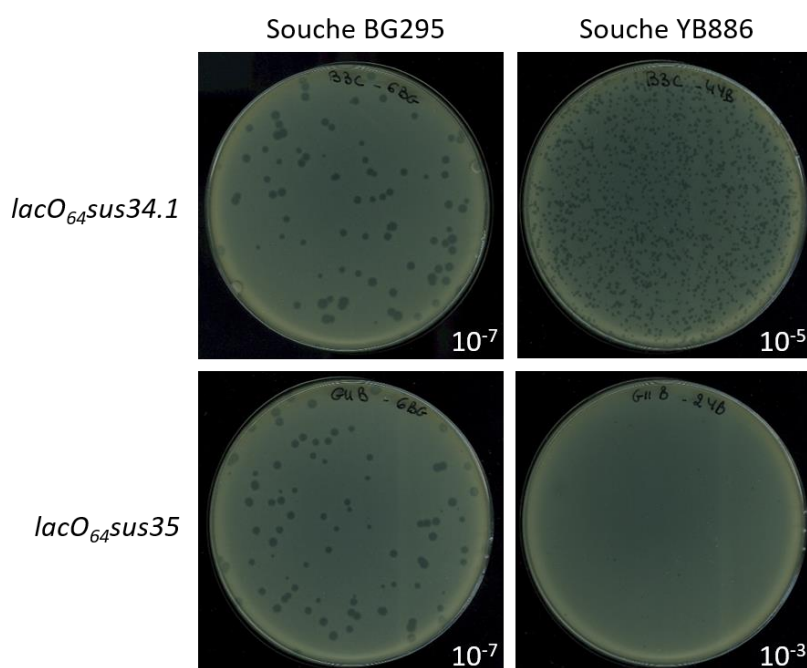


Figure 51 : Titrations des phages SPP1delX110lacO₆₄sus34.1 et SPP1delX110lacO₆₄sus35 dans les souches YB886 (non permissive) et BG295 (permissive). Des titrations à des dilutions différentes des phages sont présentées (indiquées dans le coin inférieur droit de chaque panneau) pour mettre en évidence la différence de phénotype de plaque (SPP1delX110lacO₆₄sus34.1) ou de titre (SPP1delX110lacO₆₄sus35) en condition permissive (gauche) et non permissive (droite).

Des phages portant un codon stop (mutants *sus*) dans les gènes 34.1 ou 35 ont un phénotype différent dans des titrations en condition non permissive. On observe que le mutant SPP1delX110lacO₆₄sus35 présente des plaques de lyse uniquement avec la souche permissive BG295 (**Figure 51 - bas**). Cette

souche, contrairement à la souche YB886, possède un ARN de transfert (ARNt) supprimeur du codon stop. Le phage peut donc, malgré la présence d'un codon stop au début du gène 35, se multiplier, ce qui n'est pas le cas dans la souche YB886. Dans le cas du mutant SPP1~~delX110~~lacO₆₄sus34.1, on observe des plages de lyse dans les deux souches. Ces résultats confirment que gp34.1 n'est pas essentielle pour SPP1 (Valero-Rello *et al*, 2017) (**Tableau 1**). Cependant, les plages de lyse sont beaucoup plus petites dans la souche non permissive YB886 que dans BG295 (**Figure 51 - haut**) signifiant que l'absence de la protéine gp34.1 réduit de façon majeure la multiplication de SPP1 (Valero-Rello *et al*, 2017).

Pour comprendre quel est le rôle de chaque protéine et l'ordre dans lequel elles interviennent dans la réplication du génome de SPP1, une souche produisant la protéine gp34.1 fusionnée à la protéine fluorescente mCitrine a été construite. La localisation de gp34.1 a été étudiée en absence et en présence d'infection avec différents phages défectifs dans la réplication du génome de SPP1 (**Figure 52**).

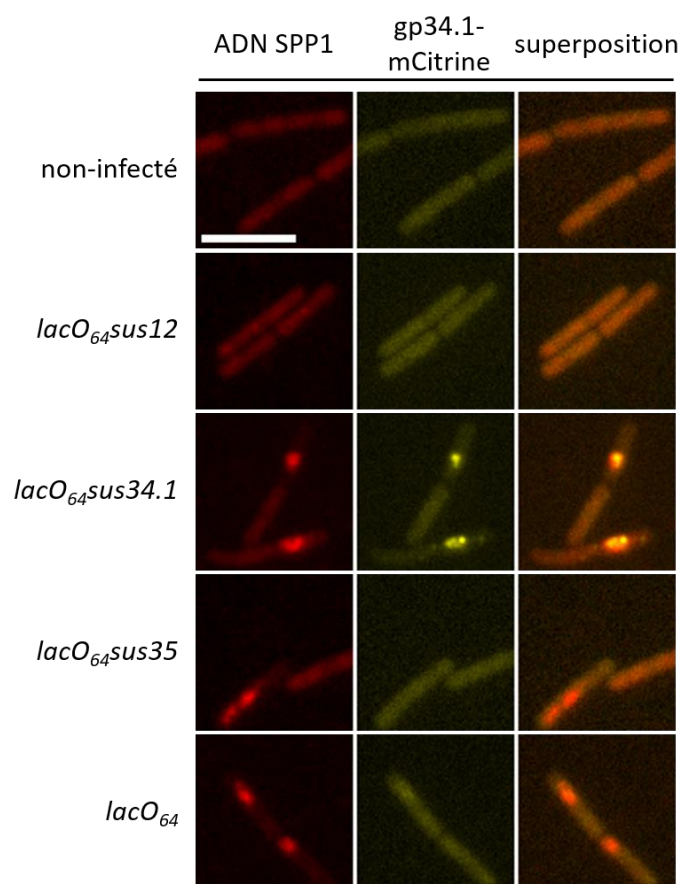


Figure 52 : Localisation de la protéine gp34.1-mCitrine dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et après infection avec les phages SPP1~~delX110~~lacO₆₄sus12 (gp40⁻), SPP1~~delX110~~lacO₆₄sus34.1 (gp34.1⁻), SPP1~~delX110~~lacO₆₄sus35 (gp35⁻) et SPP1~~delX110~~lacO₆₄ avec une multiplicité d'infection de 2 après 30 minutes d'infection. Les flèches blanches indiquent de petits foyers d'ADN de SPP1 en absence de réplication de l'ADN correspondant probablement à un génome de SPP1 recircularisé. L'échelle représente 5 µm.

En absence d'infection, la fluorescence de la protéine gp34.1 reste homogène dans la cellule. C'est aussi le cas pour les cellules infectées avec le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus12* qui est défectif pour la protéine gp40, le phage ne pouvant pas se répliquer. Par contre, on observe de petits foyers dans le canal de LacI-mCherry. Dans cette infection, l'ADN viral est entré dans la cellule et il a pu se recirculariser. Ces foyers correspondent probablement à des molécules uniques d'ADN viral. Dans le cas de l'infection par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus34.1*, bien que la protéine ne soit pas essentielle pour le virus, elle est très fortement recrutée au niveau de l'ADN viral. Sa localisation n'est d'ailleurs pas homogène dans le foyer de réplication (**Figure 52**) présentant des zones plus intenses comme celles observées pour gp40, PolC et DnaX (**Figures 46, 48 et 49**). Par contre, lorsque les cellules sont infectées par un phage défectif pour la protéine gp35 ou par le phage infectieux SPP1*delX110lacO₆₄*, on n'observe pas de recrutement de gp34.1-mCitrine dans le foyer de réplication. Ceci implique que quand le phage infectieux code pour une gp34.1 fonctionnelle, la gp34.1-mCitrine présente dans la bactérie n'est pas recrutée vers le foyer de réplication en quantité détectable (**Figure 52**). Dans le cas de l'infection avec SPP1*delX110lacO₆₄sus35*, on ne peut donc pas conclure quant à l'absence de gp34.1-mCitrine dans le foyer de réplication. Elle peut être due soit au fait que gp35 recrute gp34.1 soit que gp34.1 produit par ce phage est préférentiellement mobilisée vers le foyer comme dans le cas de SPP1*delX110lacO₆₄*. Un mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus34.1sus35* permettrait de discriminer ces deux possibilités mais nous ne sommes pas encore arrivés à le construire. Il est intéressant de noter que la forme du foyer de réplication dans le mutant gp35⁻ est différente de celle observée dans une infection sauvage. Il a une tendance à être dédoublé (**Figure 52**) mais nous n'en connaissons pas encore la raison. Ce mutant doit accumuler des copies du génome de SPP1 sous forme circulaire dans ses foyers de réplication car il est défectif pour le switch du mode de réplication theta vers sigma (**Figure 40**).

III.1.6. Dynamique de l'ADN viral dans la cellule infectée

Pour davantage comprendre la dynamique du foyer de réplication de SPP1 dans la bactérie, nous avons effectué des expériences de FRAP ("Fluorescence Recovery After Photobleaching"). Cette technique permet d'éteindre de manière irréversible la fluorescence des protéines dans une zone restreinte de la cellule par photoblanchiment à l'aide d'un flash lumineux obtenu en exposant très brièvement la zone avec un laser (**Figure 53A**).

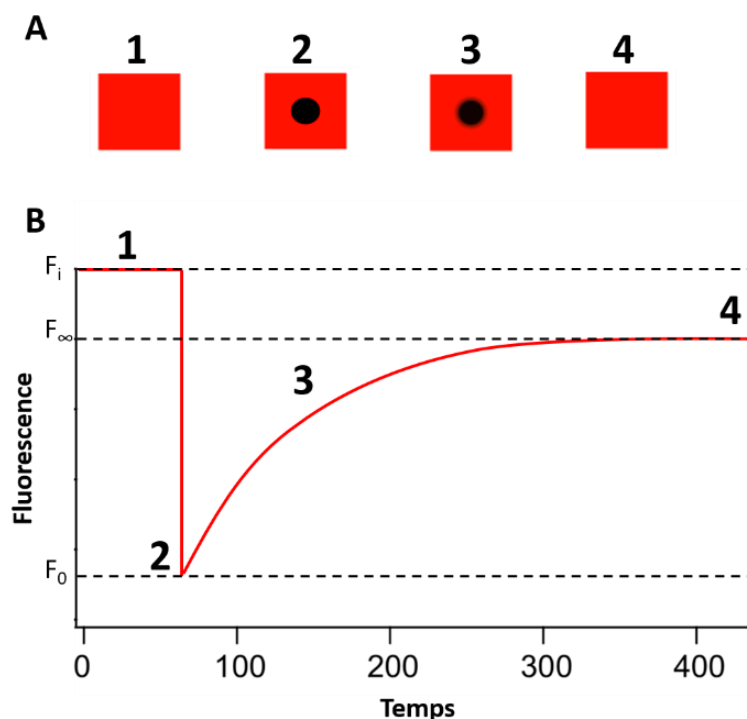


Figure 53 : Principe du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). (A) La technique consiste à illuminer temporairement une portion d'un échantillon avec une forte intensité de lumière de manière à provoquer une extinction localisée (photoblanchiment) de la fluorescence. (B) Tracé caractéristique d'une expérience de FRAP. F_i représente l'intensité de fluorescence au début de l'expérience, F_0 correspond à la fluorescence minimale obtenue après photoblanchiment et F_∞ correspond au maximum de fluorescence récupérée à la fin de l'expérience (Trugnan *et al*, 2004).

On crée ainsi deux populations de molécules, une fluorescente et l'autre pas, spatialement distinctes dans la cellule. Si les molécules fluorescentes sont libres de se déplacer, on assiste à une redistribution des deux populations entre la zone photoblanchie et le milieu adjacent jusqu'à l'homogénéisation des populations conduisant à une réduction de la fluorescence totale moyenne dans la cellule (**Figure 53B**). Les études faites ont uniquement porté sur le foyer de réplication. La question était de comprendre si la réplication virale avait lieu partout dans le foyer de réplication ou si elle avait une localisation spécifique (périphérie du foyer ou à des points bien précis, **Figure 54A**). Pour ces expériences, nous avons travaillé avec une souche exprimant la protéine LacI-mNeonGreen dont la séquence est aussi insérée dans le chromosome de la bactérie au locus *thrC* sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Cette protéine fluorescente, plus brillante et plus stable dans le temps, est un meilleur outil pour ces expériences de FRAP.

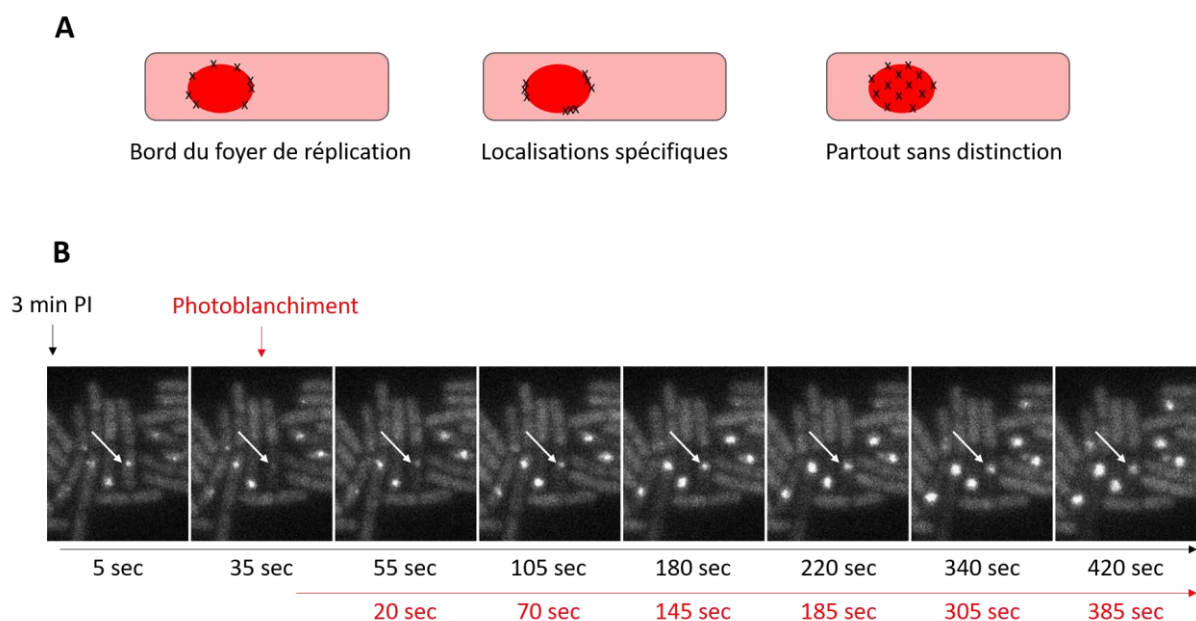


Figure 54 : (A) Zones dans le foyer de réplication où la réplication virale peut avoir lieu. (B) Expérience de FRAP avec des cellules RCL684 infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* avec une multiplicité d'infection de 1 pendant 3 minutes à 37°C. Le photoblanchiment a été fait 35 secondes après le début de la cinétique. La flèche indique le foyer de réplication qui a été photoblanchi dans son ensemble. Le temps de récupération après photoblanchiment est présenté en rouge.

La première expérience menée a porté sur des foyers de réplication de petites tailles (3 minutes post-infection) dans laquelle le foyer a été majoritairement éteint. La récupération de la fluorescence est suivie pendant 10 minutes avec une image prise toutes les 5 secondes. Cette cinétique montre qu'après le photoblanchiment, la fluorescence dans le foyer redevient rapidement homogène (**Figure 54B**) mais avec une intensité de fluorescence diminuée. Ces résultats suggèrent que de nouvelles molécules d'ADN viral avec des répétitions *lacO₆₄* continuent d'être synthétisées et qu'elles sont marquées par les protéines LacI-mNeonGreen libres dans le cytoplasme. La récupération homogène de la fluorescence montre que LacI-mNeonGreen se fixe partout dans le foyer de réplication. Elle peut être le résultat d'une réplication de l'ADN dans différentes régions du foyer (hypothèse de droite dans la **Figure 54A**) qui dépouille l'ADN des protéines LacI-mNeonGreen éteintes et synthétise de nouvelles molécules d'ADN avec les motifs *lacO₆₄* au fur et à mesure de son avancement. Elle peut aussi être le résultat de mouvements de l'ADN au sein du foyer qui permettraient un échange rapide des molécules de LacI-mNeonGreen éteintes, ceci malgré leur forte affinité pour les répétitions *lacO*, avec des LacI-mNeonGreen fluorescentes libres.

Pour distinguer ces deux hypothèses, une deuxième expérience consistant à utiliser, dans les mêmes conditions d'infection que précédemment, un inhibiteur de la polymérase bactérienne PolC, essentielle pour la réplication de l'ADN viral, a été faite. Pour cela, nous avons utilisé le phage mutant

SPP1*delX110lacO₆₄sus19* dans lequel il n'y a pas d'encapsidation du génome, la totalité de l'ADN viral étant libre et disponible dans le cytoplasme de la bactérie.

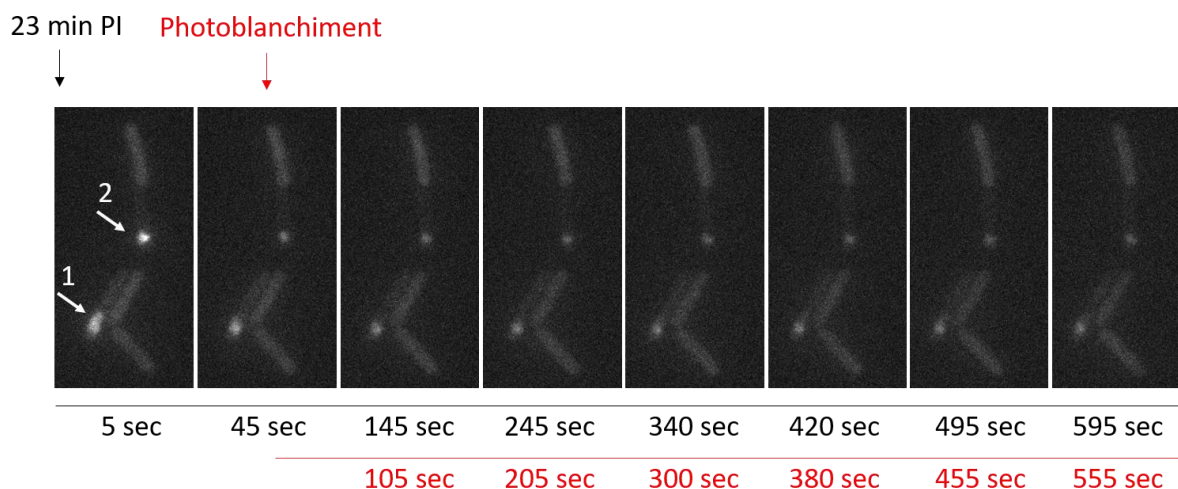


Figure 55 : Expérience de FRAP avec des cellules RCL684 infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* avec une multiplicité d'infection de 1 pendant 23 minutes à 37°C en présence d'HPUra. Le photoblanchiment a été fait 45 secondes après le début de la cinétique. Les flèches blanches indiquent les foyers de réplication photoblanchis en présence (**1**) ou en absence (**2**) de molécules LacI-mNeonGreen libres dans le cytoplasme bactérien.

Dans la cinétique en présence d'HPUra, il n'y a pas de recouvrement détectable de la zone photoblanchie suggérant que l'inhibition de la réplication a un fort impact sur la dynamique des molécules d'ADN du phage dans le foyer de réplication. Cette observation est aussi bien valable pour des foyers de réplication photoblanchis observés dans des cellules dans lesquelles des LacI-mNeonGreen sont disponibles (**Figure 55**, flèche 1) que dans des cellules complètement déplétées des molécules fluorescentes (**Figure 55**, flèche 2). Cette dynamique pourrait être importante pour que la terminase ait accès à la séquence *pac* présente sur le génome viral afin d'initier l'encapsidation de l'ADN du phage dans la procapside.

III.2. Assemblage de la particule virale dans la cellule infectée

La voie d'assemblage de la particule virale (**Figure 56**) commence par la formation d'une structure icosaédrique ronde, la procapside, composée de 4 protéines : la protéine majoritaire de la capsid gp13, la protéine d'échafaudage gp11, la protéine portale gp6 et la protéine minoritaire gp7 (section I.4.4) (Becker *et al*, 1997 ; Dröge *et al*, 2000). L'expansion de la procapside va entraîner la sortie de la protéine d'échafaudage *via* les pores présents dans la structure afin de permettre l'insertion de l'ADN nouvellement synthétisé à l'intérieur. Ces deux actions conduisent à un changement de conformation de la procapside (Dröge *et al*, 2000). Elle acquiert sa forme finale icosaédrique et des sites de liaisons pour la protéine de décoration, gp12, sont créés (White *et al*, 2012). La queue, assemblée dans une

voie d'assemblage indépendante, se fixe par la suite au sommet portal aboutissant à la particule virale infectieuse.

Cette voie d'assemblage peut être divisée en deux phases distinctes : l'état de procapside dans les temps précoces et l'état de capside dans les temps tardifs. Pour étudier ces deux stades, nous avons choisi une protéine rapportrice pour chaque état (**Figure 56**). Pour le stade procapside, la protéine d'échafaudage gp11 présente uniquement à l'intérieur de la structure avant encapsidation de l'ADN a été choisie. Pour le stade capside, la protéine auxiliaire gp12, qui se fixe à la surface de la capside uniquement si l'expansion et l'encapsidation de l'ADN viral ont lieu, a été utilisée. Ainsi, dans un contexte sauvage, les protéines gp11 et gp12 ne co-existent jamais dans la même structure.

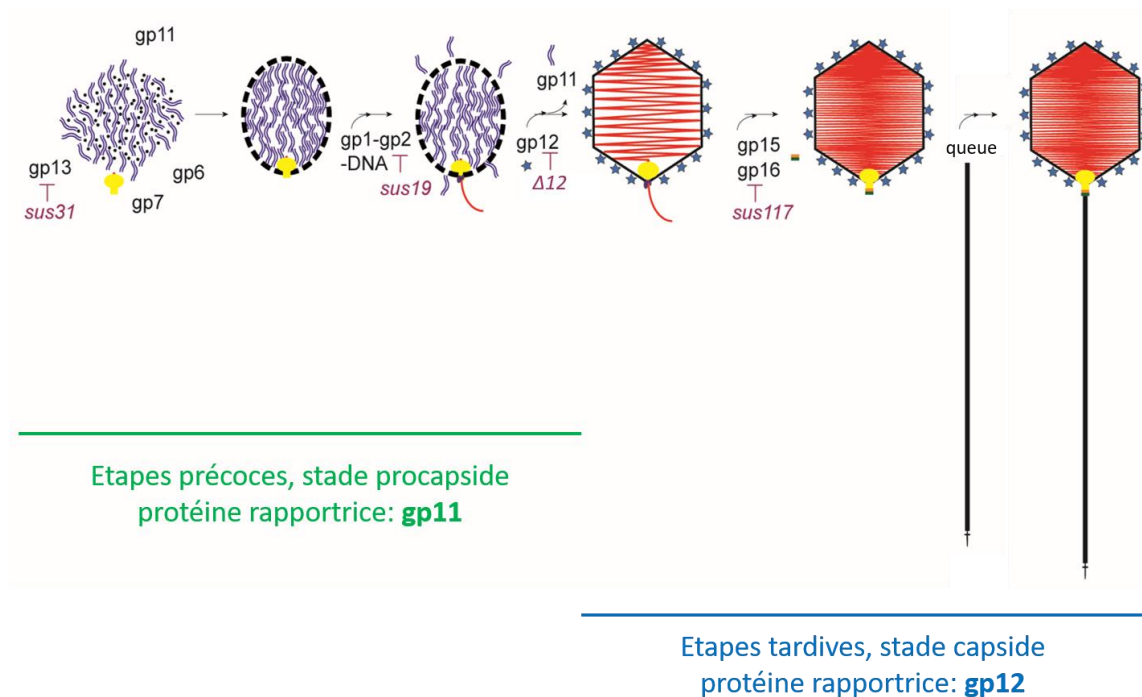


Figure 56 : Voie d'assemblage de la particule virale de SPP1. Les différentes protéines de la capside de SPP1 engagées dans le processus sont identifiées. Les mutants *sus* de SPP1 qui bloquent les différentes étapes de la voie d'assemblage sont indiqués. SPP1 Δ 12 a le gène 12 délété.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au stade tardif de l'assemblage de la particule virale. L'étude de cet état final est important pour connaître la distribution des particules virales dans la cellule infectée lors du déroulement normal du cycle infectieux. Pour cela, nous avons suivi la localisation de gp12 dans la cellule pendant l'infection (**Figure 56**).

III.2.1. Etude de l'état nucléocapside de la particule virale

Gp12, aussi appelée protéine auxiliaire de la capside, est un trimère (6,6 kDa chaque sous-unité) qui se fixe au centre des hexamères de la capside créés suite à son expansion (Zairi *et al*, 2014 ; White *et al*, 2012). Le gène 12 a été fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente mCitrine. Cette fusion

a été clonée sous le contrôle du promoteur *spac* et insérée dans le chromosome de *B. subtilis* au locus *sacA* (souche GSY10024). Gp12-mCitrine est produite après induction à l'IPTG (**Figure 57A**).

Pour utiliser la protéine gp12-mCitrine comme marqueur du stade capside, nous avons tout d'abord vérifié sa production et sa présence dans les structures formées à différentes étapes de l'assemblage de la particule virale. Pour cela, des extraits totaux de cellules GSY10024 infectées et des structures purifiées sur gradient de glycérol ont été analysés par Western Blot pour déterminer les proportions de gp12 et gp12-mCitrine retrouvées dans les extraits et dans les structures assemblées (**Figure 57**).

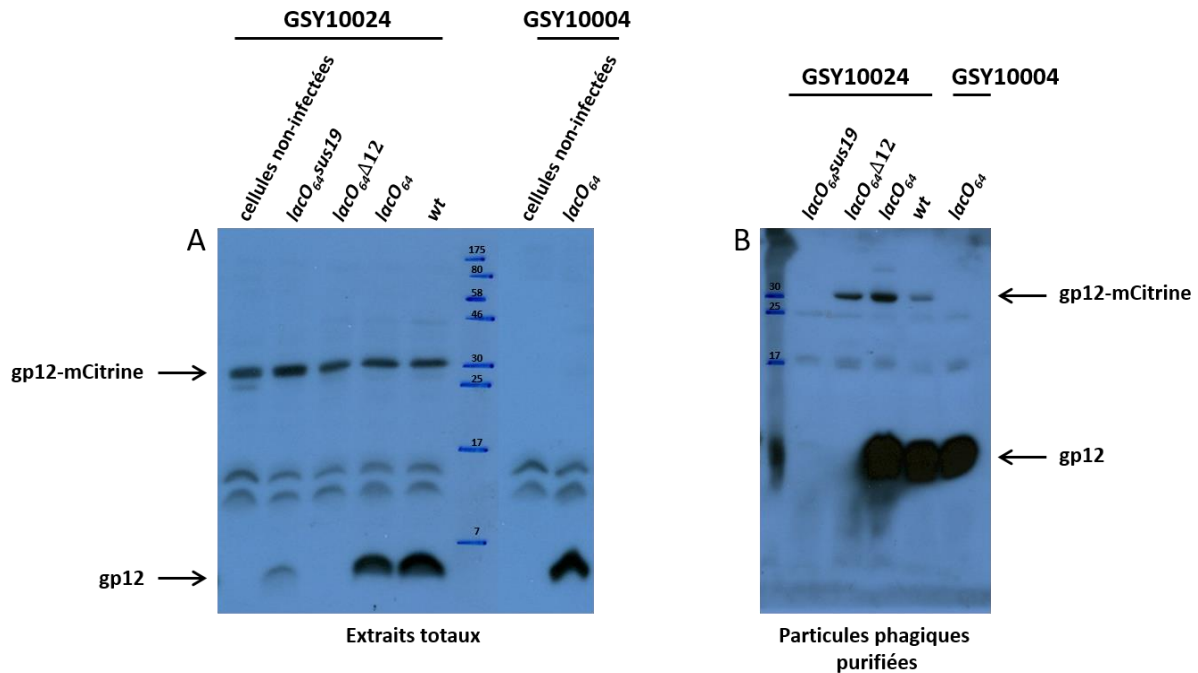


Figure 57 : Production de gp12 et de gp12-mCitrine et leur présence dans les structures virales. (A) Western blot d'extraits totaux de cellules GSY10004 et GSY10024 (produisant gp12-mCitrine) non-infectées et infectées par les phages SPP1*delX110lacO₆₄Sus19* (gp2⁻), SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* (gp12⁻), SPP1*delX110lacO₆₄* et SPP1*wild-type* (wt). **(B)** Western blot de procapsides (infection avec SPP1*delX110lacO₆₄Sus19*) ou de particules virales partiellement purifiées (infections avec SPP1*delX110lacO₆₄Δ12*, SPP1*delX110lacO₆₄* ou SPP1wt). Les western blot ont été révélés avec un anticorps polyclonal anti-gp12. Les positions de migration de gp12 et de gp12-mCitrine sont indiquées.

Le Western Blot des extraits totaux de bactéries GYS10024 infectées avec des phages qui assemblent des particules infectieuses (SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* et SPP1*delX110lacO₆₄*) montre que la protéine sauvage gp12 est beaucoup plus produite que gp12-mCitrine (**Figure 57A**). Étonnamment, gp12 sauvage est très peu produite dans les cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄Sus19* (**Figure 57A**), un mutant qui n'encapside pas l'ADN (**Figure 40**). En effet, en absence d'encapsidation, gp12 ne peut donc pas se fixer à la procapside ce qui pourrait la rendre moins stable sous forme libre dans le cytoplasme et sujette à la dégradation (Zairi *et al*, 2014). Ceci n'est pas le cas pour la protéine gp12-mCitrine qui est produite de manière comparable dans tous les extraits. Les capsides assemblées en présence de gp12 et de gp12-mCitrine fixent très majoritairement la protéine gp12 sauvage. Cette

préférence est confirmée par l'observation du ratio gp12/gp12-mCitrine retrouvé significativement supérieur dans les capsides virales (**Figure 57B**) par rapport à celui des extraits bactériens (**Figure 57A**). Seules quelques copies de la protéine gp12-mCitrine sont détectées dans les capsides de SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* qui ne produit pas de gp12 sauvage (**Figure 57B**). Cela peut s'expliquer par la présence de quantités modérées de la protéine gp12-mCitrine disponibles dans la cellule et par son association moins efficace à la capside.

Après avoir confirmé que la fusion gp12-mCitrine permettait de marquer les capsides, la localisation de ces structures a été suivie dans la bactérie infectée (**Figure 58**).

En absence d'infection, gp12-mCitrine reste homogène dans le cytoplasme de la bactérie. C'est aussi le cas quand la formation de la procapside est bloquée dans l'infection par SPP1*delX110lacO₆₄Sus31*. Par contre, lorsque la capside du phage est assemblée après infection par le phage SPP1*delX110lacO₆₄*, gp12-mCitrine se localise de part et d'autre du foyer de réplication (**Figure 58**). La localisation de gp12 dans un foyer défini dépend donc de son interaction avec la capside. A des temps précoces post-infection, on retrouve plusieurs petits foyers de gp12 dans les régions du cytoplasme sans ADN phagique. Ceux-ci vont évoluer, probablement en s'associant, vers un nombre plus réduit de foyers de capsides qui vont augmenter en taille et en intensité à des temps tardifs. On note que ces foyers de gp12-mCitrine sont fortement exclus du foyer de réplication de l'ADN. Quand les bactéries sont infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄Δ12*, on observe que les capsides marquées par gp12-mCitrine sont exclues du foyer de réplication mais également que leur localisation est concentrée dans deux foyers de particules virales très fluorescents positionnés de part et d'autre du foyer de réplication. Pendant cette infection, l'absence de gp12 peut faciliter l'association des capsides assemblées sans gp12 à leur surface pour former des foyers plus compacts. Elle augmente aussi la disponibilité de sites pour la fixation de gp12-mCitrine à la capside sans compétition par gp12. Ces deux effets peuvent contribuer à la formation de deux foyers de capsides bien individualisés et intenses dès les temps précoces post-infection (**Figure 58**). Gp12 n'étant pas essentielle pour le phage, son absence ne change ni la stabilité de la capside ni sa forme (White *et al*, 2012).

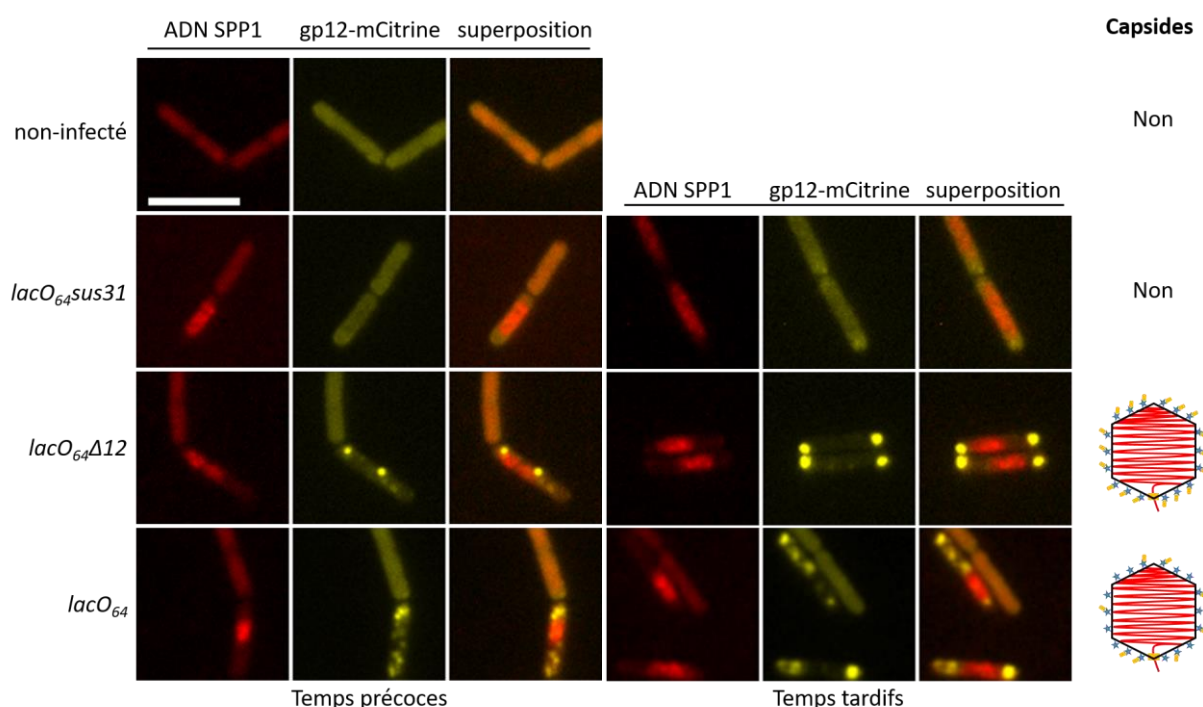


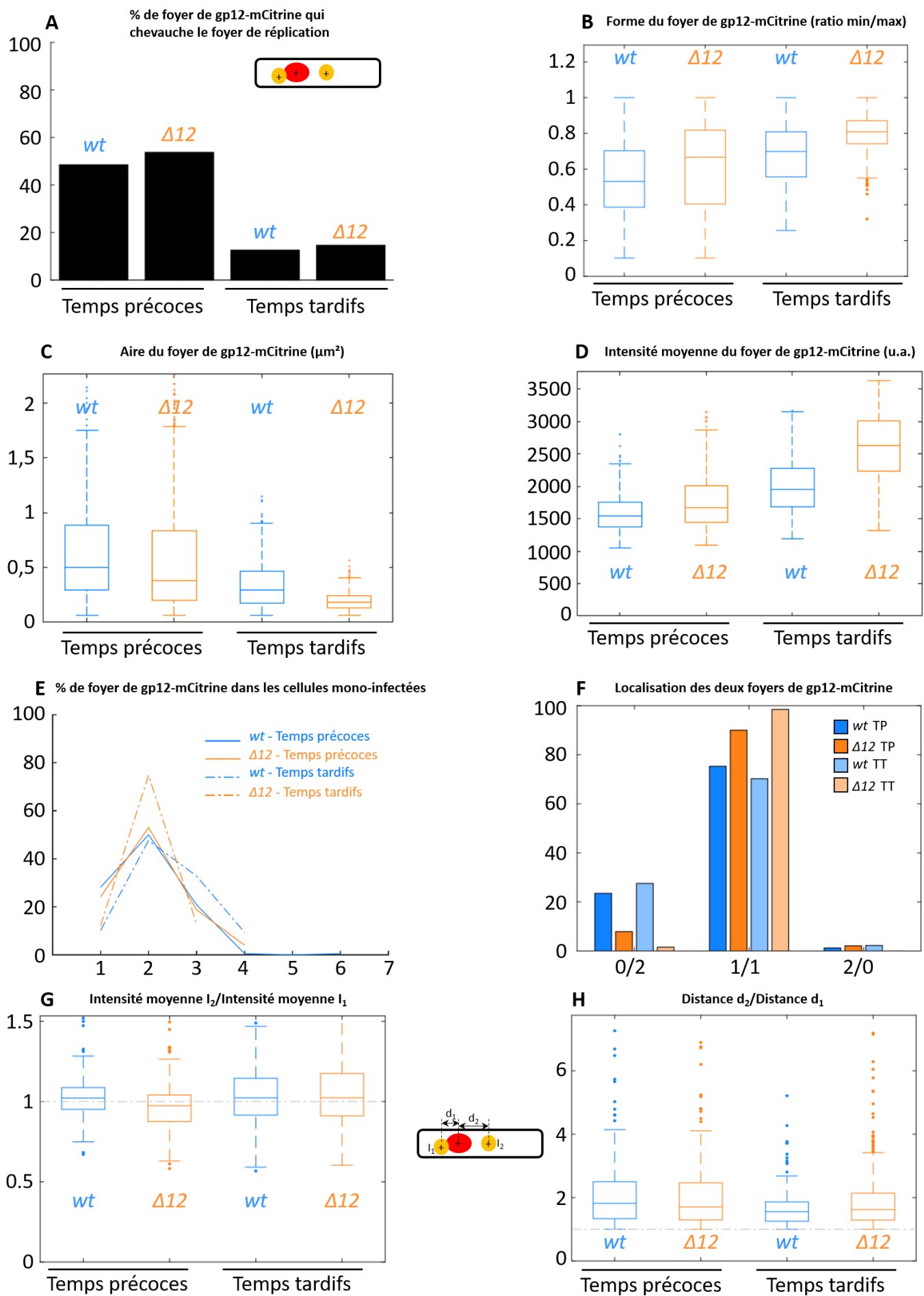
Figure 58 : Localisation de la protéine gp12-mCitrine dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et après infection avec les phages SPP1*delX110lacO₆₄sus31* (gp13⁻), SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* (gp12⁻) ou SPP1*delX110lacO₆₄*. Les infections ont été faites avec une multiplicité d'infection de 2 et les observations au microscope ont été effectuées à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection). Le schéma de droite indique si des capsides virales sont assemblées dans les cellules. L'échelle représente 5 μ m.

La position relative des foyers de particules virales et de réplication ainsi que leur forme et leur intensité ont été quantifiées à partir des images de cellules GSY10024 infectées par les phages SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* ou SPP1*delX110lacO₆₄*. Pour cette analyse, seules les cellules mono-infectées ont été considérées (cellules avec un seul foyer de réplication).

A des temps précoces, le spot de fluorescence de gp12 le plus proche du foyer de réplication colocalise avec celui-ci dans 50 % des cas (**Figure 59A**). Ce pourcentage diminue à 10-15 % à des temps tardifs montrant qu'il y a bien une ségrégation des capsides et de la région de réplication de l'ADN phagique (**Figure 59A**). Le même profil est observé avec les deux phages à des périodes de temps comparables. De plus, les foyers de gp12-mCitrine qui sont allongés et larges à des temps précoces (**Figures 59B et 59C**) vont réduire leur aire (**Figure 59C**) et prendre une forme plus circulaire à des temps tardifs (**Figure 59B**). Cette évolution corrèle avec une augmentation de l'intensité moyenne de la fluorescence dans les foyers au cours du temps (**Figure 59D**). Les effets décrits sont particulièrement accentués dans les cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* qui ne produisent que la protéine gp12-mCitrine (**Figures 59B, 59C et 59D**) conduisant à une forte agglomération des capsides entre elles et à un marquage plus intense. Cette caractéristique sera utile pour observer des événements rares dans la formation des capsides.

Dans la majorité des bactéries mono-infectées, il y a deux foyers de capsides qui flanquent le foyer de réplication unique (**Figures 58 et 59E**). En ne tenant compte que de ces cellules, on observe que dans plus de 80 % des cas, les foyers de gp12-mCitrine se situent de part et d'autre du foyer de réplication (**Figure 59F**). De plus, ces foyers ont des intensités semblables indiquant qu'il n'y a pas de différence dans l'enrichissement de l'un ou de l'autre des foyers avec des capsides fluorescences (**Figure 59G**). Cependant, la distance de ces deux foyers vis-à-vis du foyer de réplication est différente (**Figure 59H**). Le foyer de réplication ne se localisant pas au centre de la bactérie, cette différence peut être liée à l'espace cytoplasmique restant disponible dans la cellule.

Figure 59 : Quantification de la localisation des foyers de gp12-mCitrine vis-à-vis du foyer de réplication. Les cellules GSY10024 ont été infectées par les phages SPP1delX110lacO₆₄ (abrégé *wt*, en bleu) ou SPP1delX110lacO₆₄Δ12 (abrégé Δ12, en orange) avec une multiplicité d'infection de 2. Les quantifications ont été faites uniquement sur des cellules ne présentant qu'un seul foyer de réplication (mono-infectées) à des temps précoces (TP: 20-30 minutes post-infection) et tardifs (TT: 40-50 minutes post-infection). Une moyenne de 600 bactéries mono-infectées pour chaque condition a été analysée et les quantifications correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **(A)** Pourcentage de bactéries dont le foyer de gp12-mCitrine le plus proche du foyer de réplication chevauche celui-ci. Le schéma en haut à droite de la figure illustre ce cas. Les symboles "+" dans le schéma indiquent les centres de masse des foyers. **(B)** Forme du foyer de gp12-mCitrine le plus proche du foyer de réplication (ratio : diamètre min/max). **(C)** Aire du foyer de gp12-mCitrine le plus proche du foyer de réplication (en μm^2). **(D)** Intensité moyenne du foyer de gp12-mCitrine le plus proche du foyer de réplication (u.a. : unité arbitraire). **(E)** Nombre de foyers de gp12-mCitrine retrouvé dans les cellules mono-infectées. **(F)** Localisation des foyers de gp12-mCitrine vis-à-vis du foyer de réplication uniquement dans le cas de 2 foyers de gp12-mCitrine + 1 foyer de réplication. **(G)** Rapport d'intensité de fluorescence du foyer de gp12-mCitrine le plus éloigné sur celui le plus proche dans la sous-population analysée en **(F)**. **(H)** Rapport de distance du foyer de gp12-mCitrine le plus éloigné sur celui le plus proche dans la sous-population analysée en **(F)**. Le schéma entre **G** et **H** illustre respectivement les intensités et les distances mesurées en **G** et **H**.



Les foyers de capsides virales ont un positionnement bien spécifique dans la cellule, clairement séparés du foyer de réplication et proches des pôles de la cellule (**Figure 58**). Cette localisation correspond-elle à une agglomération de ces structures due à un espace cytoplasmique restreint, à une localisation polaire des capsides ou à un simple mécanisme d'exclusion des capsides du foyer de réplication ? Compte-tenu de la taille de la bactérie, il est difficile de discriminer entre ces trois hypothèses. Pour répondre à la question, les bactéries ont été cultivées en condition de filamentation en inhibant la formation du septum bactérien avec la drogue PC190723 qui bloque l'activité de la protéine FtsZ (Haydon *et al*, 2008). Les bactéries ainsi obtenues ont une longueur non définie (**Figure 60**).

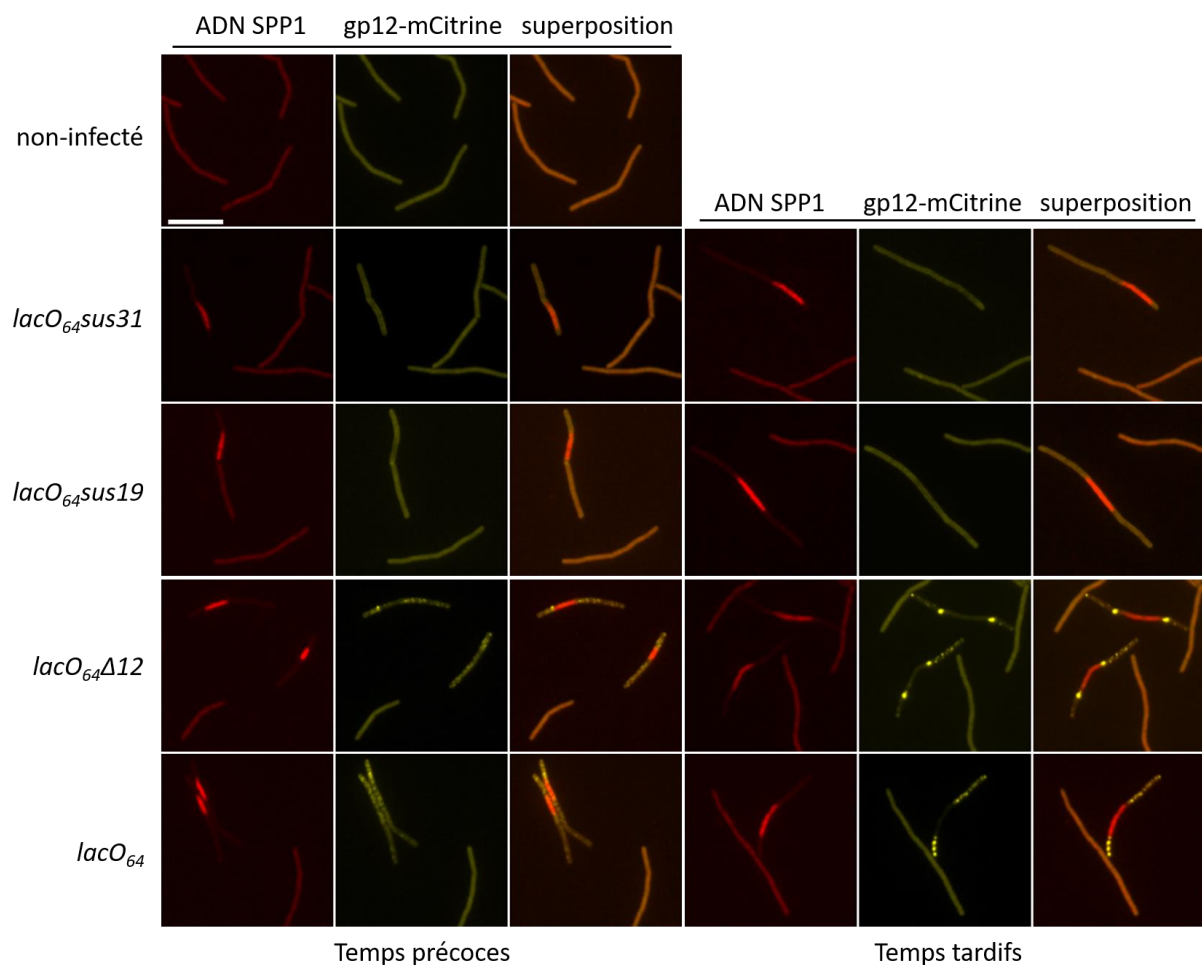


Figure 60 : Localisation de la protéine gp12 dans le cytoplasme de cellules GSY10024 filamentées. Les bactéries non-infectées ou infectées avec une multiplicité d'infection de 0,1 avec les phages SPP1~~delX110~~*lacO₆₄sus31* (gp13⁻), SPP1~~delX110~~*lacO₆₄sus19* (gp2⁻), SPP1~~delX110~~*lacO₆₄Δ12* (gp12⁻) ou SPP1~~delX110~~*lacO₆₄* ont été observées par microscopie de fluorescence à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection). L'échelle représente 5 μm.

En absence d'infection, la fluorescence de gp12-mCitrine reste homogène dans le cytoplasme de la bactérie. Par contre, après infection de ces bactéries par le phage SPP1~~delX110~~*lacO₆₄Δ12* (gp12⁻), on observe que les lieux de stockage des particules virales ségrègent complètement du foyer de réplication mais restent toujours à proximité du foyer de réplication (**Figure 60**). Ceci révèle une

"communication" entre les partenaires impliqués dans la formation de la particule virale quel que soit l'espace disponible dans la bactérie. Dans l'infection par *SPP1delX110lacO₆₄*, la ségrégation de gp12-mCitrine du foyer de réplication est moins évidente à des temps précoces pour laquelle on aperçoit une colocalisation partielle et punctiforme de gp12-mCitrine avec l'ADN de SPP1 (**Figure 60**). Ces foyers ségrégent à des temps tardifs. On note que plusieurs foyers intenses de gp12-mCitrine sont retrouvés de chaque côté du foyer de réplication par contraste avec l'infection par *SPP1delX110lacO₆₄Δ12*. Dans toutes les cellules infectées, on observe que les foyers de réplication sont bien plus gros que ceux de cellules non filamentées. Cet effet est particulièrement évident dans l'infection avec *SPP1delX110lacO₆₄sus19* où il n'y a pas d'encapsidation de l'ADN (**Figure 60**). Il est possible qu'il y ait plus d'ADN viral synthétisé dans ces cellules ou que l'espace disponible fasse que l'ADN viral est moins restreint dans les foyers de réplication.

Les voies d'assemblage de la capside et de la queue étant différentes, cette localisation spécifique de stockage des capsides dans la cellule est-elle dépendante de la fixation de la queue ? Pour cela, des infections avec le mutant *SPP1delX110lacO₆₄sus9* ont été faites. Ce mutant, déficient pour le gène 9, n'assemble pas de queues. Les premiers résultats montrent que l'absence de cette protéine n'empêche pas la ségrégation des capsides du foyer de réplication (résultats non montrés).

Les images de microscopie présentées jusqu'ici sont issues de "snap-shots" de l'infection faits sur des pads d'agarose dans lesquels les conditions ne sont pas optimales pour la multiplication du virus (section III.1.3). Pour l'observation en temps réel de la formation et de la dynamique des foyers viraux dans la bactérie, nous avons entrepris des expériences d'imagerie de bactéries immobilisées dans un système de microfluidique CellASIC. Ce système présente l'avantage de pouvoir contrôler de nombreux paramètres tels que la température, l'oxygénation et l'injection de différents milieux pendant tout le temps de l'expérience (section II.2.5.2) (**Figure 37**).

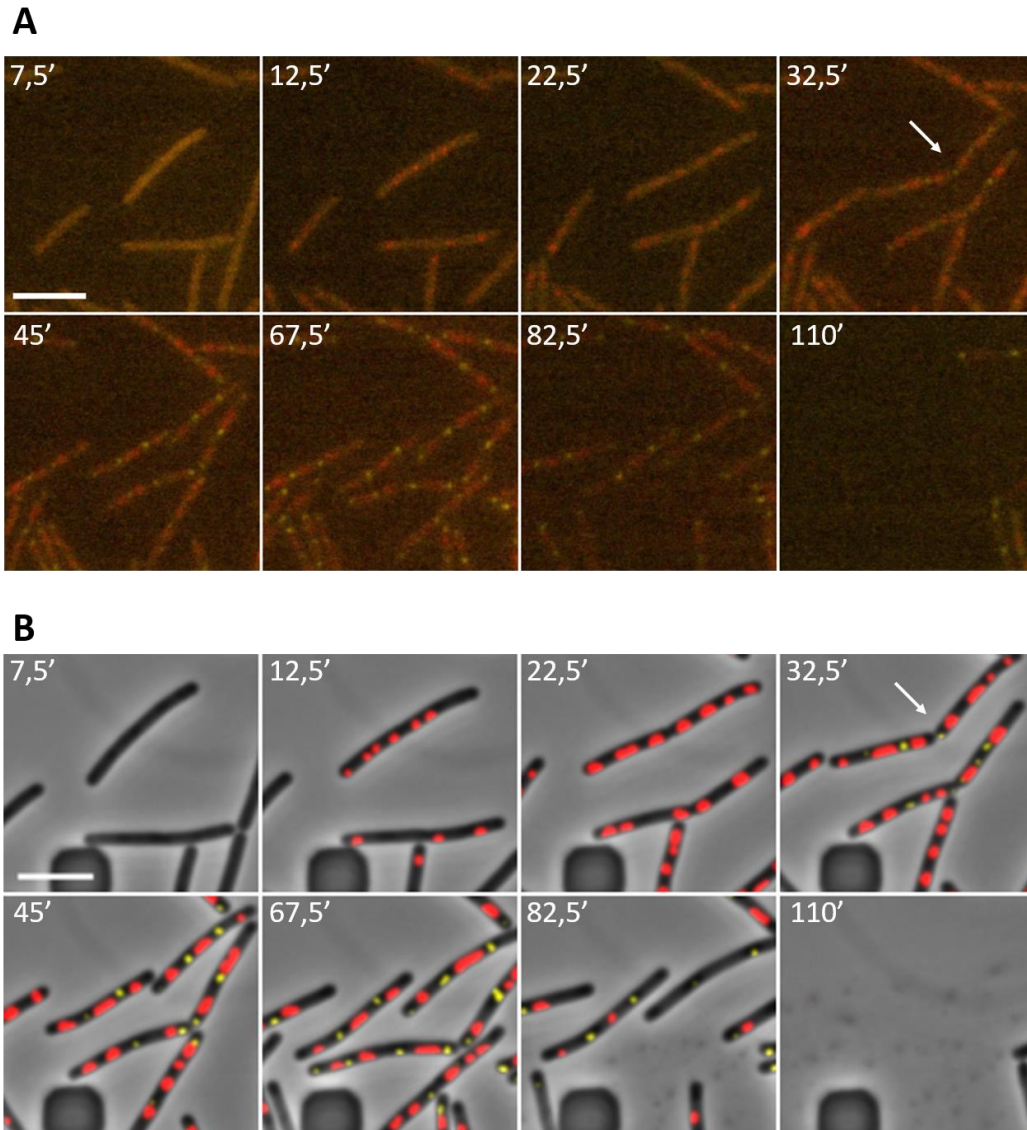


Figure 61 : Cinétique de formation des foyers de réplication de l'ADN de SPP1 et de capsides dans des cellules GSY10024 infectées par le phage SPP1~~delX110lacO₆₄Δ12~~ jusqu'à la lyse cellulaire. Les bactéries ont été immobilisées, infectées et observées en temps réel dans un système microfluidique CellASIC. Une image a été prise toutes les 2,5 minutes. Seuls quelques points de la cinétique ont été sélectionnés pour illustrer les différentes étapes du cycle viral. Les bactéries sont multi-infectées (plus d'un foyer de réplication par cellule). Les données brutes (**A**) et celles après traitement d'images (**B**) sont présentées. La flèche indique la septation d'une bactérie infectée en cours de division. L'échelle représente 5 μ m.

La cinétique d'infection de *B. subtilis* GSY10024 par SPP1~~delX110lacO₆₄Δ12~~ montre que le foyer de réplication de l'ADN viral se forme en premier et qu'il va être confiné à des points bien précis de la cellule (**Figure 61**). Puis, vers 25 minutes post-infection dans le système de microfluidique, les foyers de capsides vont apparaître et se localiser de manière distinctes du foyer de réplication, préférentiellement de part et d'autre de celui-ci (**Figure 61**). A partir de 60 minutes, les premières bactéries commencent à lyser jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus aucune, 2 heures post-infection. Durant cette cinétique, les bactéries continuent de s'allonger et de se diviser malgré l'infection. Elles ne semblent pas affectées par la présence d'ADN phagique et de virus en cours de formation dans leur

cytoplasme. Ceci peut s'expliquer par le fait que les processus cellulaires bactériens initiés avant l'infection peuvent se poursuivre, même si on observe un ralentissement de la croissance bactérienne pendant l'infection de SPP1 (**Figure 43**). Cependant, il est fort probable que ce ne sera pas le cas pour les générations suivantes qui seront complètement déplétées des protéines essentielles nécessaires aux mécanismes cellulaires. Dans le cas du modèle *B. subtilis*-SPP1, le temps de génération de la bactérie et le temps de multiplication du virus étant proches, il ne nous est pas possible de voir l'impact de l'infection sur la cellule à long terme dans ces conditions. On pourrait envisager d'avoir un phage mutant qui ne serait pas capable de lyser la bactérie. On verrait ainsi sur combien de générations la cellule est capable de se diviser, si son temps de génération et sa morphologie sont affectés et si la structuration et la localisation des foyers induits par le virus dans le cytoplasme de la bactérie sont conservées.

Après avoir étudié la localisation des capsides au cours du cycle viral et observé qu'il y avait des changements majeurs de localisation pendant l'infection, nous avons choisi de travailler sur les intermédiaires aboutissant à la formation de la capside avec l'idée de comprendre où avait lieu l'encapsidation de l'ADN viral.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à la protéine virale gp11 qui marque un état intermédiaire, le stade procapside dans le cycle viral. Les procapsides se forment-elles en dehors du foyer de réplication où l'ADN va être recruté pour y être encapsidé ou les procapsides vont-elles colocaliser avec le foyer d'ADN viral, subir l'encapsidation puis ségréger ?

III.2.2. Etude de l'état procapside pendant l'assemblage viral

Après avoir étudié la distribution dans la cellule des capsides au cours du cycle viral de SPP1 et observé leur localisation dans des foyers indépendants du foyer de réplication, nous avons choisi de travailler sur les intermédiaires aboutissant à la formation de la capside (**Figure 56**). Nous visions à comprendre si les foyers des capsides sont les lieux d'assemblage *ab initio* des particules virales ou si des intermédiaires du processus migrent vers ces foyers à une étape précise de l'assemblage. L'objectif était aussi de savoir où les procapsides virales encapsident l'ADN de SPP1 qui est synthétisé dans le foyer de réplication.

Nous avons utilisé la protéine d'échafaudage gp11 comme marqueur de la procapside, un état intermédiaire dans l'assemblage de la capside virale. Gp11 est présente à l'intérieur de la procapside mais elle quitte la structure avant l'encapsidation de l'ADN (**Figure 56**). Le gène 11 a été fusionné avec le gène codant pour la protéine mCitrine. Le gène codant la fusion mCitrine-gp11 a été cloné sous le

contrôle du promoteur *spac* (inductible avec 1 mM IPTG) et inséré dans le chromosome de *B. subtilis* dans le locus *sacA*. Cette souche, GSY10025, a été utilisée dans tout le travail qui suit en lien avec gp11. Gp11 est un dimère avec une structure allongée (Poh *et al*, 2008) qui lui permet de sortir de la procapside par des pores présents dans cette structure avant l'expansion et l'encapsidation de l'ADN (Ignatiou *et al*, en révision). Cependant, la présence de la protéine fluorescence lui apporte un domaine en tonneau qui peut la piéger à l'intérieur de la procapside. Cette possible contrainte doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

De manière comparable à la protéine gp12, des extraits totaux de cellules GSY10025 infectées et des structures virales partiellement purifiées ont été analysés par Western Blot pour déterminer les proportions de gp11 et mCitrine-gp11 retrouvées dans les bactéries infectées et dans les structures assemblées (**Figure 62**).

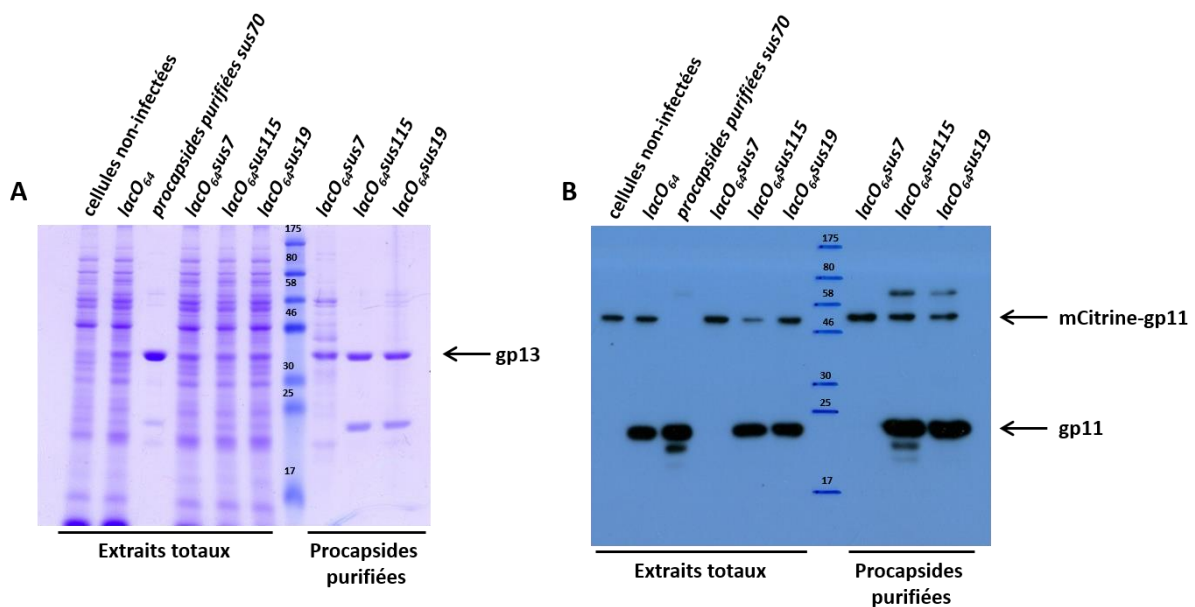


Figure 62 : Présence de gp11 et mCitrine-gp11 dans des extraits de bactéries infectées et dans des structures virales. Les extraits totaux de cellules GSY10025 non-infectées et infectées par les phages SPP1delX110lacO₆₄, SPP1delX110lacO₆₄sus7 (gp11⁻), SPP1delX110lacO₆₄sus115 (gp6⁻) et SPP1delX110lacO₆₄sus19 (gp2⁻) ainsi que les structures phagiques partiellement purifiées sur gradient de glycérol des bactéries infectées par les phages SPP1sus70 (gp1⁻), SPP1delX110lacO₆₄sus7, SPP1delX110lacO₆₄sus115 et SPP1delX110lacO₆₄sus19 ont été analysés par coloration au Coomassie Bleu (**A**) et par western blot avec un anticorps anti-gp11 (**B**). Les positions de migration de la protéine majoritaire de la capsid gp13 et des deux formes de gp11 sont respectivement indiquées en (**A**) et (**B**).

Lorsque les cellules GSY10025 sont infectées par les phages SPP1delX110lacO₆₄, SPP1delX110lacO₆₄sus115 et SPP1delX110lacO₆₄sus19, la protéine gp11 apportée par le phage est bien plus produite que la protéine mCitrine-gp11 dont le gène a été inséré dans le chromosome bactérien. Tous ces phages accumulent des procapsides pendant l'infection (Dröge *et al*, 2000 ; Isidro *et al*, 2004a). Le ratio gp11/mCitrine-gp11 est supérieur dans les procapsides purifiées à celui retrouvé dans

les extraits de cellules infectées indiquant un recrutement préférentiel de gp11. Cependant, toutes ces structures incorporent aussi de la mCitrine-gp11 avec des ratio gp11/mCitrine-gp11 similaires dans les procapsides, indépendamment de la présence ou pas de la protéine portale gp6 (**Figure 62B**). Les cellules GSY10025 infectées par le phage déficient pour la protéine gp11 sauvage (*SPP1delX110lacO₆₄sus7*) ne produisent que la forme mCitrine-gp11. Les structures formées par la protéine majoritaire de la capside dans ces infections ont très peu de mCitrine-gp11 (**Figure 62B**) et ont une distribution éparpillée dans le gradient de glycérol indiquant une hétérogénéité structurale (résultats non montrés). La protéine mCitrine-gp11 ne semble donc pas compétente pour l'assemblage de procapsides ce qui est en accord avec son incapacité à compléter *SPP1delX110lacO₆₄sus7*. Cependant, lorsqu'elle est co-produite avec gp11 codée par les phages qui infectent GSY10025, les deux formes de gp11 sont incorporées dans les procapsides (**Figure 62B**) et le nombre de copies de mCitrine-gp11 présent permet leur visualisation par microscopie de fluorescence (**Figure 63**).

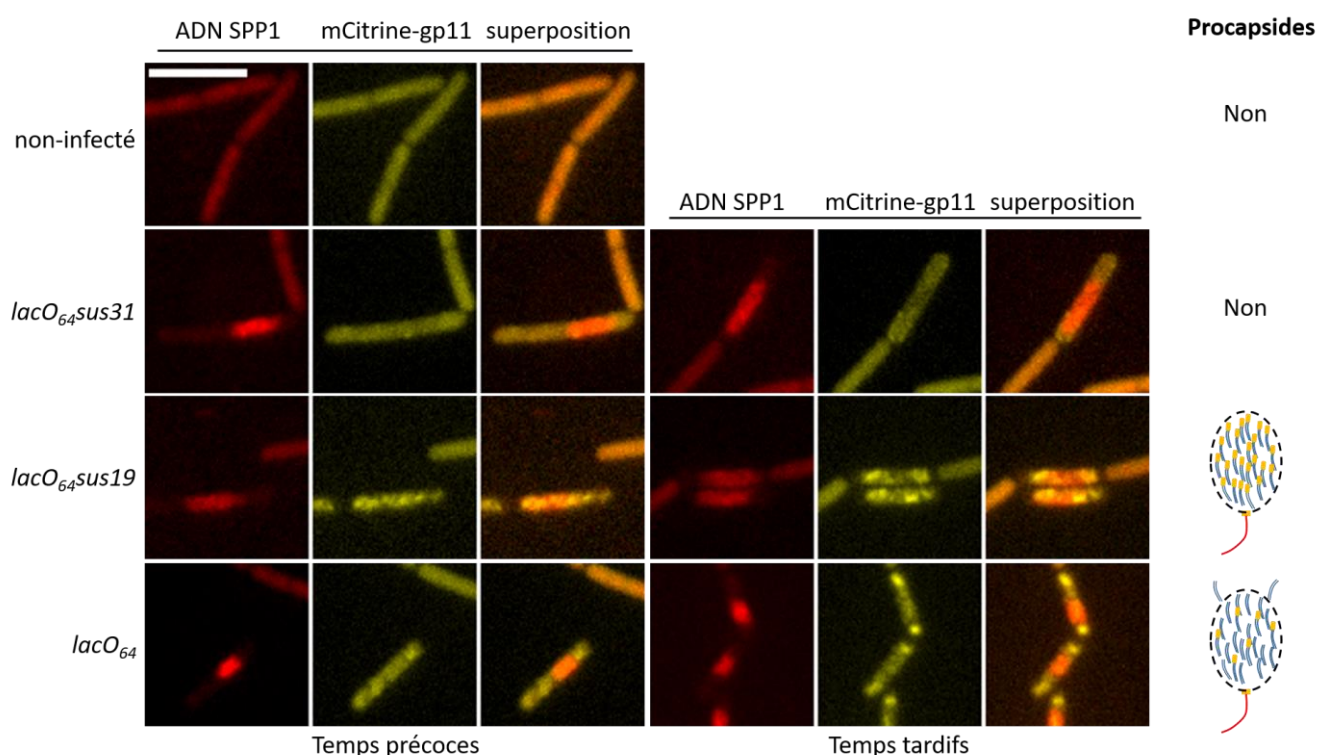


Figure 63 : Localisation de la protéine mCitrine-gp11 dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et après infection avec les phages *SPP1delX110lacO₆₄sus31* (gp13⁻), *SPP1delX110lacO₆₄sus19* (gp2⁻) ou *SPP1delX110lacO₆₄* avec une multiplicité d'infection de 2 à des temps précoces (20-30 minutes post-infection) et tardifs (40-50 minutes post-infection). Le schéma à droite indique si des procapsides virales sont assemblées dans les cellules. La gp11 en bleu sortant de la procapside de *SPP1delX110lacO₆₄* indique que lors de cette infection, la procapside va relâcher gp11 pour subir l'expansion et encapsider de l'ADN. L'échelle représente 5 μ m.

En absence d'infection, la fluorescence de la protéine mCitrine-gp11 est homogène dans le cytoplasme de la bactérie (**Figure 63**). C'est aussi le cas dans des bactéries infectées avec *SPP1delX110lacO₆₄sus31*

qui est déficient dans l'assemblage de la procapside. Après infection par le phage SPP1*delX110lacO₆₄*, la fluorescence de mCitrine-gp11 devient punctiforme et on observe une colocalisation partielle avec le foyer de réplication à des temps précoces. A des temps tardifs, les structures avec mCitrine-gp11 vont ségréger du foyer de réplication pour se localiser de part et d'autre du foyer de réplication (**Figure 63**). Cette situation rappelle la distribution des foyers de capsides à des temps tardifs d'infection (**Figure 58**). On suspecte qu'au moins une partie des structures avec mCitrine-gp11 a encapsidé de l'ADN, la protéine ayant été piégée à l'intérieur de la capside à cause de sa forme en tonneau, empêchant son relargage à l'extérieur de la procapside. Le faible nombre de mCitrine-gp11 présent à l'intérieur de la capside laisserait suffisamment d'espace pour l'encapsidation du génome. Pour localiser spécifiquement les procapsides virales, nous avons infecté les cellules GSY10025 avec le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* déficient pour la protéine gp2, le moteur moléculaire d'encapsidation de l'ADN dans la procapside. Des procapsides sont accumulées dans le cytoplasme lors de cette infection. On observe une colocalisation partielle des deux marqueurs fluorescents dans un premier temps. Puis, avec le temps, il va y avoir une ségrégation de la protéine fluorescente mais celle-ci va rester présente proche des bords du foyer de réplication. Ces résultats suggèrent que les procapsides vont s'accumuler au niveau du foyer de réplication dans un premier temps puis se déplacer vers les pôles du foyer dans l'attente d'encapsidation. Cependant, elles ne vont pas ségréger pour former des foyers de mCitrine-gp11 spatialement séparés du foyer de réplication, à la différence de ce qui est observé pendant l'infection par SPP1*delX110lacO₆₄* dans laquelle il y a de l'encapsidation de l'ADN.

La distribution des foyers de réplication du génome et des particules virales a été quantifiée dans les cellules GSY10025 infectées par les phages SPP1*delX110lacO₆₄* et SPP1*delX110lacO₆₄sus19* à des temps précoces et tardifs (**Figure 64**).

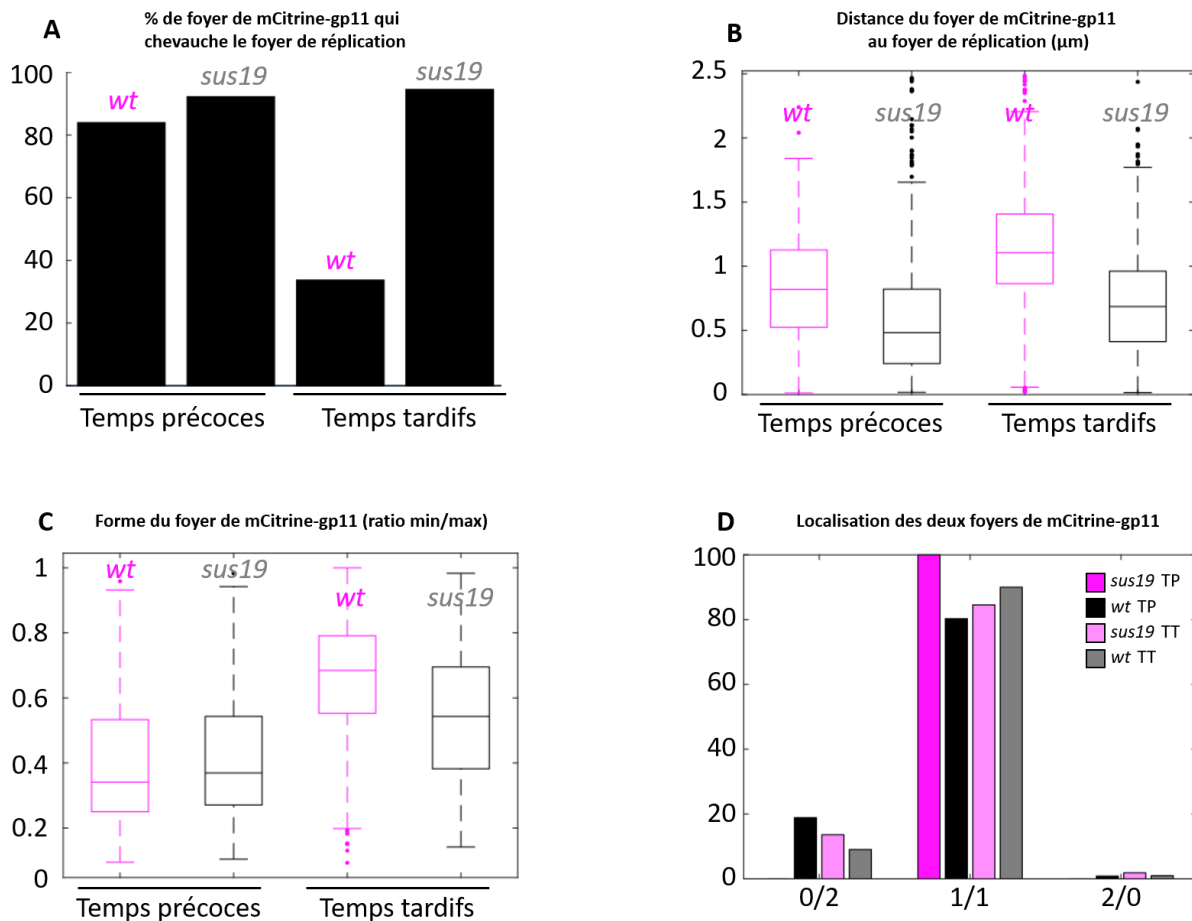


Figure 64 : Quantification de la localisation des foyers de mCitrine-gp11 vis-à-vis du foyer de réplication. Les cellules GSY10025 ont été infectées par les phages SPP1delX110lacO₆₄ (abrégé wt) ou SPP1delX110lacO₆₄sus19 (gp2⁻) (abrégé sus19) avec une multiplicité d'infection de 2. Les quantifications ont été faites uniquement sur des cellules ne présentant qu'un seul foyer de réplication (mono-infection) à des temps précoces (TP: 20-30 minutes post-infection) et tardifs (TT: 40-50 minutes post-infection). Une moyenne de 600 bactéries mono-infectées pour chaque condition a été analysée et les quantifications représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. **(A)** Pourcentage de bactéries dont le foyer de mCitrine-gp11 le plus proche du foyer de réplication chevauche celui-ci. **(B)** Distance du centre du foyer de mCitrine-gp11 le plus proche au centre du foyer de réplication (en μm). **(C)** Forme du foyer de mCitrine-gp11 le plus proche du foyer de réplication (ratio : min/max). **(D)** Localisation des foyers de mCitrine-gp11 vis-à-vis du foyer de réplication uniquement dans les bactéries infectées qui ont 2 foyers de mCitrine-gp11 + 1 foyer de réplication.

Ces résultats mettent en évidence que les foyers de mCitrine-gp11 dans l'infection par le phage SPP1delX110lacO₆₄ colocalisent majoritairement dans un premier temps avec le foyer de réplication, probablement pour faciliter l'encapsidation de l'ADN viral. Puis ils vont ségréger du foyer de réplication à des temps tardifs pour former des foyers de structures phagiques indépendants (**Figure 64A**). Par contre, en absence d'encapsidation, les foyers de procapsides restent majoritairement en interaction avec l'ADN viral avec un pourcentage de colocalisation autour de 80 % (**Figure 64A**). La distance entre le centre de masse du foyer de mCitrine-gp11 et celui de l'ADN viral est significativement plus grande dans l'infection sauvage que dans le cas du mutant qui n'encapside pas d'ADN (**Figure 64B**). Cette ségrégation corrèle aussi avec une organisation plus compacte des foyers de structures virales

(**Figure 64C**). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que les capsides ayant encapsidé de l'ADN viral lors de l'infection par SPP1*delX110lacO₆₄* vont davantage s'éloigner du foyer de réplication pour conclure leur processus d'assemblage. Enfin, on observe que les foyers de mCitrine-gp11 se localisent préférentiellement de part et d'autre de l'ADN viral ce qui correspond à 80 % des cas dans les bactéries mono-infectées avec deux foyers de mCitrine-gp11 (**Figure 64D**).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'évolution temporelle des procapsides, incapables d'encapsider de l'ADN viral, quand l'espace cytoplasmique n'est plus contraint par la taille de la bactérie. Des cellules GSY10025 ont été traitées avec la drogue PC190723 pour inhiber la septation de la bactérie puis elles ont été infectées avec le phage mutant SPP1*delX110lacO₆₄sus19*. La cinétique de l'infection montre que l'ADN viral se réplique pendant tout le cycle viral (**Figure 65**). En effet, le foyer de réplication ne cesse de grandir. Les procapsides vont rapidement colocaliser avec ce foyer. Puis, avec le temps, une sous-population ségrège pour former des foyers de procapsides indépendants vers les extrémités de la cellule tandis qu'une autre sous-population se localise aux deux extrémités du foyer de réplication (**Figure 65**). Une hypothèse qui pourrait expliquer cette migration des procapsides est que la dynamique du foyer de réplication, résultant de la synthèse d'ADN et éventuellement d'autres processus comme la transcription, va pousser les procapsides vers la périphérie du foyer de réplication où elles peuvent se retrouver dans des zones moins denses en ADN. Le relargage d'une partie de ces procapsides du foyer de réplication conduirait à leur association dans des foyers proches des pôles de la cellule. On note que lors de la lyse de la bactérie, les foyers de procapsides maintiennent leur intégrité montrant une association stable, y compris pour ceux qui colocalisent avec le foyer de réplication (cf. 85 minutes post-infection dans la **Figure 65**). En contraste, la fluorescence du foyer de réplication est complètement perdue suggérant que la structuration de l'ADN viral est fortement liée à l'intégrité de la bactérie.

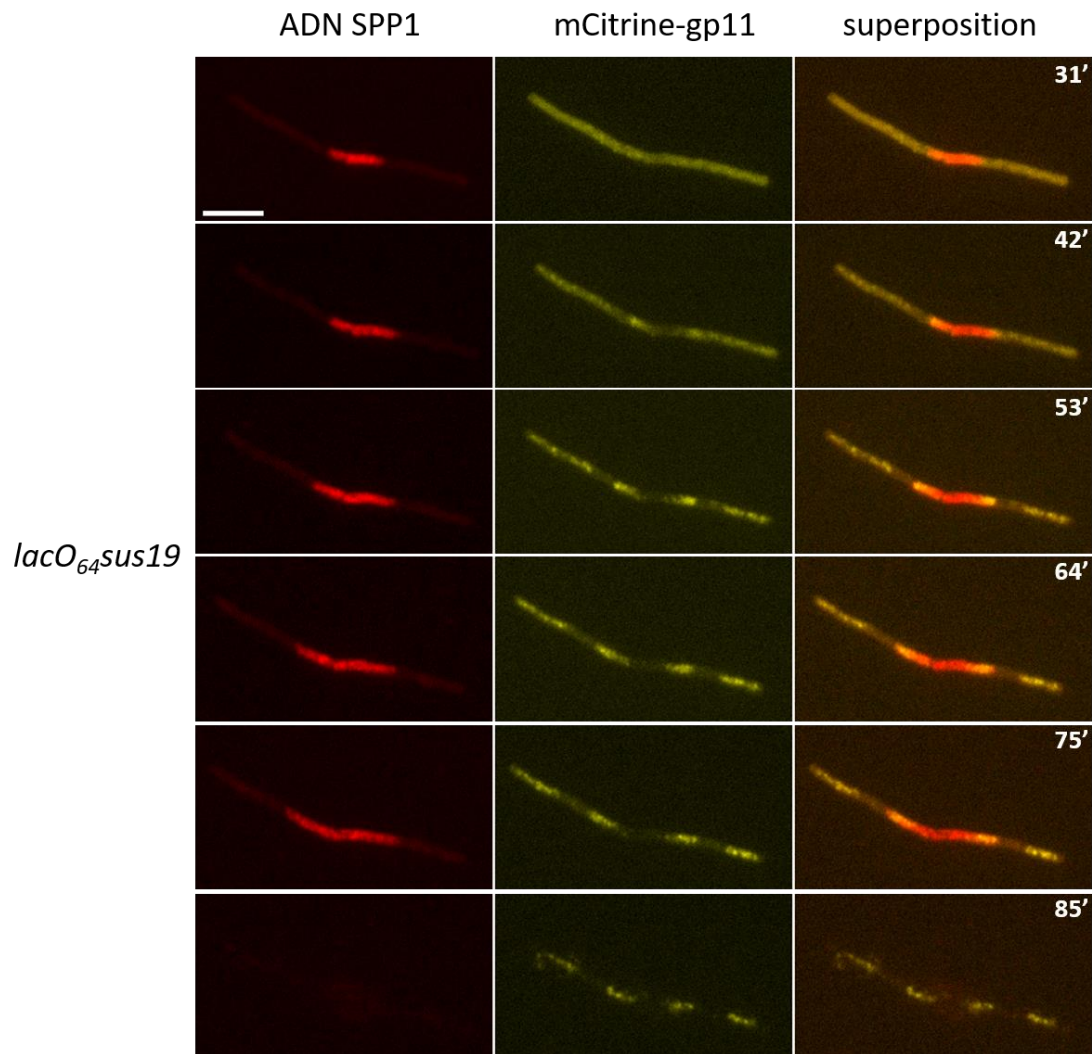


Figure 65 : Suivi dans le temps de la protéine mCitrine-gp11 dans une cellule filamenteuse GSY10025 infectée par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19*. Les cellules GSY10025 ont été incubées avec un inhibiteur de la septation pendant 1 heure puis infectées à une multiplicité d'infection de 0,1 avec le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* pendant 20 minutes à 37°C. Une image a été prise toutes les 10 minutes après le montage sur pad d'agarose. L'échelle représente 5 µm.

Des expériences en microfluidique ont été réalisées pour suivre en temps réel la totalité du cycle infectieux du phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19* dans la souche GSY10025. Cette cinétique corrèle bien avec les données obtenues en fluorescence et les quantifications réalisées. Après infection, les foyers de réplication de l'ADN apparaissent dans la cellule. Ils sont petits et augmentent en taille avec le temps. Après 22 minutes d'infection, les foyers de procapsides se forment et colocalisent majoritairement avec les foyers de réplication. Ils se localisent préférentiellement aux pôles de l'ADN de SPP1. Après apparition des procapsides, les foyers de réplication continuent à grossir indiquant que, malgré l'absence d'encapsidation, la réplication de l'ADN viral continue.

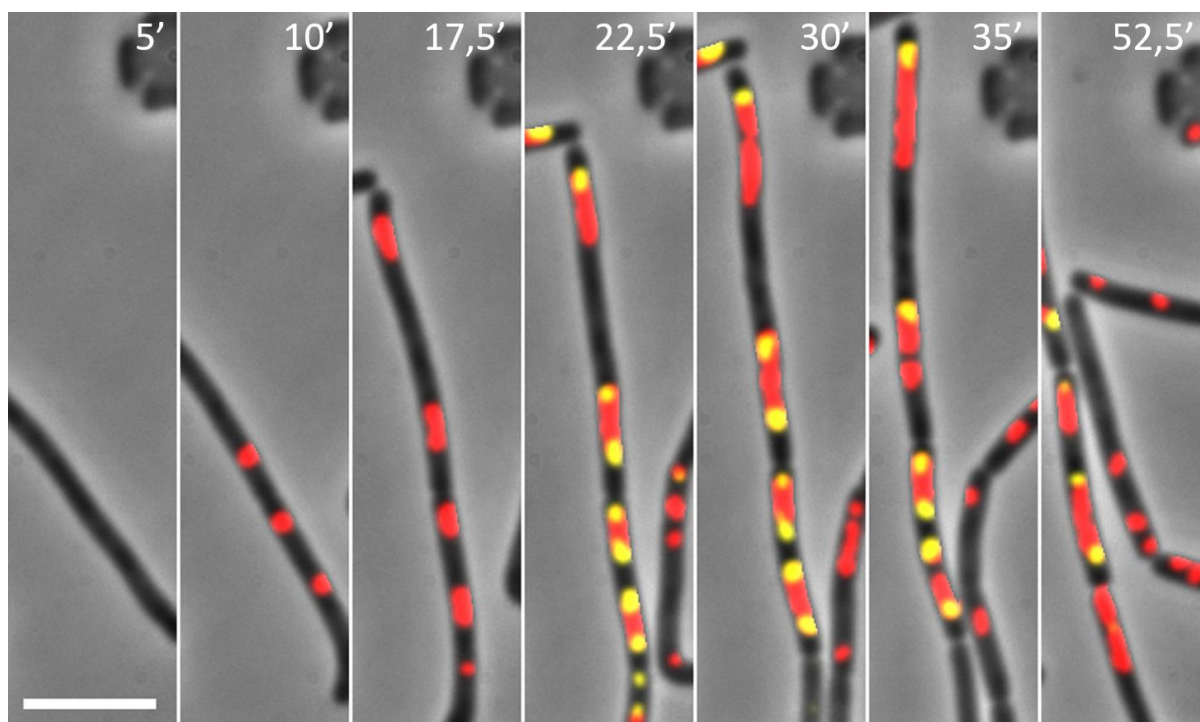


Figure 66 : Cinétique de formation des foyers de procapsides dans des cellules GSY10025 infectées par le phage SPP1delX110lacO₆₄sus19. Une image a été prise toutes les 2,5 minutes. Seuls quelques points de la cinétique ont été sélectionnés pour ne montrer que les étapes importantes du cycle viral. Les bactéries ont été immobilisées, infectées et observées en temps réel dans un système microfluidique CellASIC. Les bactéries sont multi-infectées. Les images ont été traitées pour augmenter le signal sur bruit. L'échelle représente 5 µm.

Les signaux de mCitrine-gp11 dans les infections dans lesquelles le phage assemble des particules infectieuses suggèrent que cette protéine serait présente dans des capsides ayant encapsidé de l'ADN et recrutée dans les foyers de virions (voir ci-dessus; **Figure 63**).

Pour visualiser simultanément l'ADN viral, les particules contenant mCitrine-gp11 et les virions, nous avons fusionné le gène 12 à celui de la protéine fluorescente mCFP et nous l'avons inséré dans la souche GSY10025. Dans la souche infectée par le phage SPP1delX110lacO₆₄sus19, on observe que les procapsides se forment et se localisent aux extrémités du foyer de réplication tandis que la fluorescence de la protéine gp12-mCFP reste homogène dans la cellule signifiant qu'aucune capside pleine d'ADN n'est assemblée (**Figure 67**). Dans le cas des infections avec les phages SPP1delX110lacO₆₄ et SPP1delX110lacO₆₄Δ12, tous deux conduisant à l'assemblage de particules virales, on peut voir qu'il y a une sous-population importante de procapsides (signal mCitrine-gp11) qui localisent avec le foyer de réplication. Une autre sous-population plus faible de particules contenant mCitrine-gp11 a ségrégué du foyer de réplication et leur fluorescence colocalise avec celle de gp12-mCFP. Ces particules ont donc très probablement subi l'expansion, encapsidé de l'ADN et sont devenues des capsides avec quelques molécules de mCitrine-gp11 à l'intérieur.

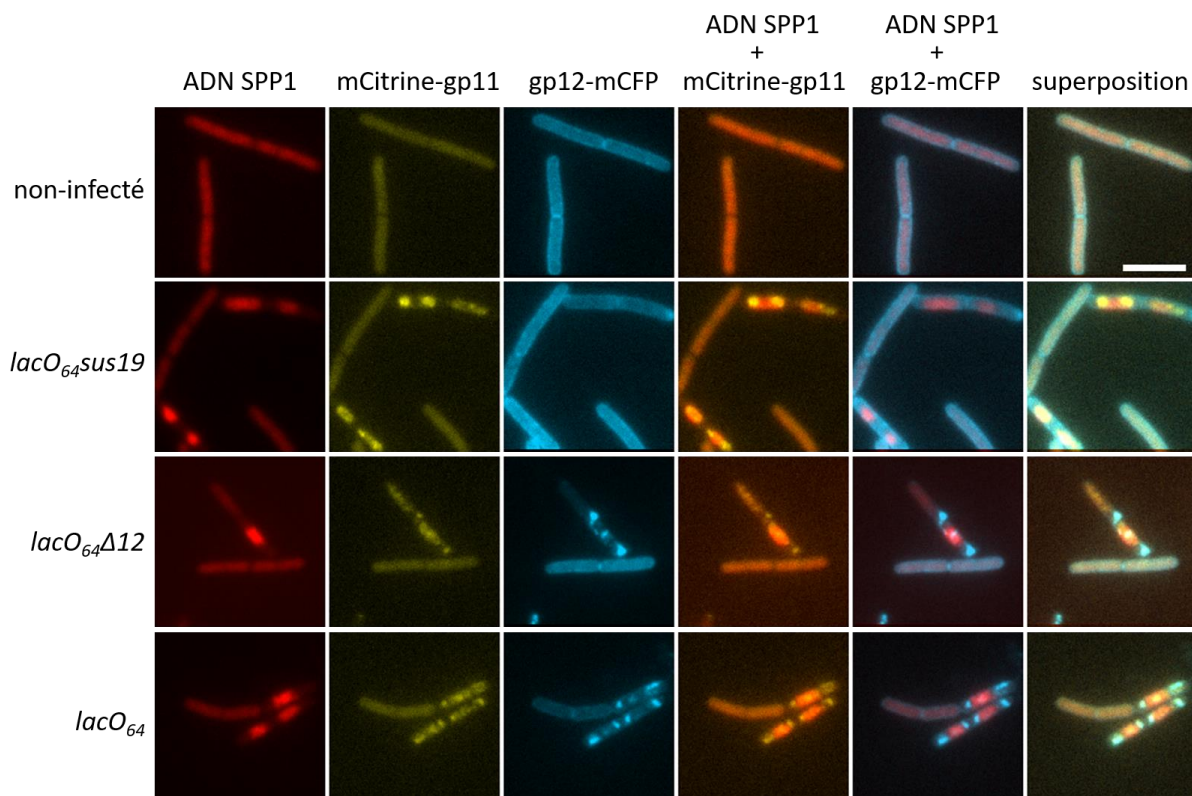


Figure 67 : Localisation des protéines mCitrine-gp11 et gp12-mCFP dans le cytoplasme de bactéries non-infectées et infectées avec les phages SPP1*delX110lacO₆₄sus19* (gp2⁻), SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* (gp12⁻) ou SPP1*delX110lacO₆₄* avec une multiplicité d'infection de 2 à des temps tardifs (40-50 minutes post-infection). L'échelle représente 5 μm.

III.2.3. Organisation ultra-structurale de la bactérie infectée

Après avoir mis en évidence la compartimentation des étapes de synthèse de l'ADN viral et de stockage des particules virales par microscopie de fluorescence, nous avons entrepris de visualiser ces usines virales par microscopie électronique. Pour cela, nous avons fixé des cellules YB886 non-infectées et infectées par les phages SPP1*delX110lacO₆₄sus19*, SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* ou SPP1*delX110lacO₆₄*. Elles ont ensuite été incluses dans de la gélatine pour effectuer des cryo-coupes de 90 nm d'épaisseur. Les coupes ont subi un traitement à la benzonase (digérant l'ADN), à la trypsine (digérant les protéines mais pas les particules virales) (Zairi *et al*, 2014) ou aucun traitement enzymatique. Puis des immunomarquages ont été effectués avec un anticorps anti-ADNdb (marquant tout l'ADNdb: viral et bactérien) et un anticorps anti-sus70 (marquant les protéines virales gp11 et gp13 libres ou assemblées dans les procapsides ou les capsides) (**Figure 68**).

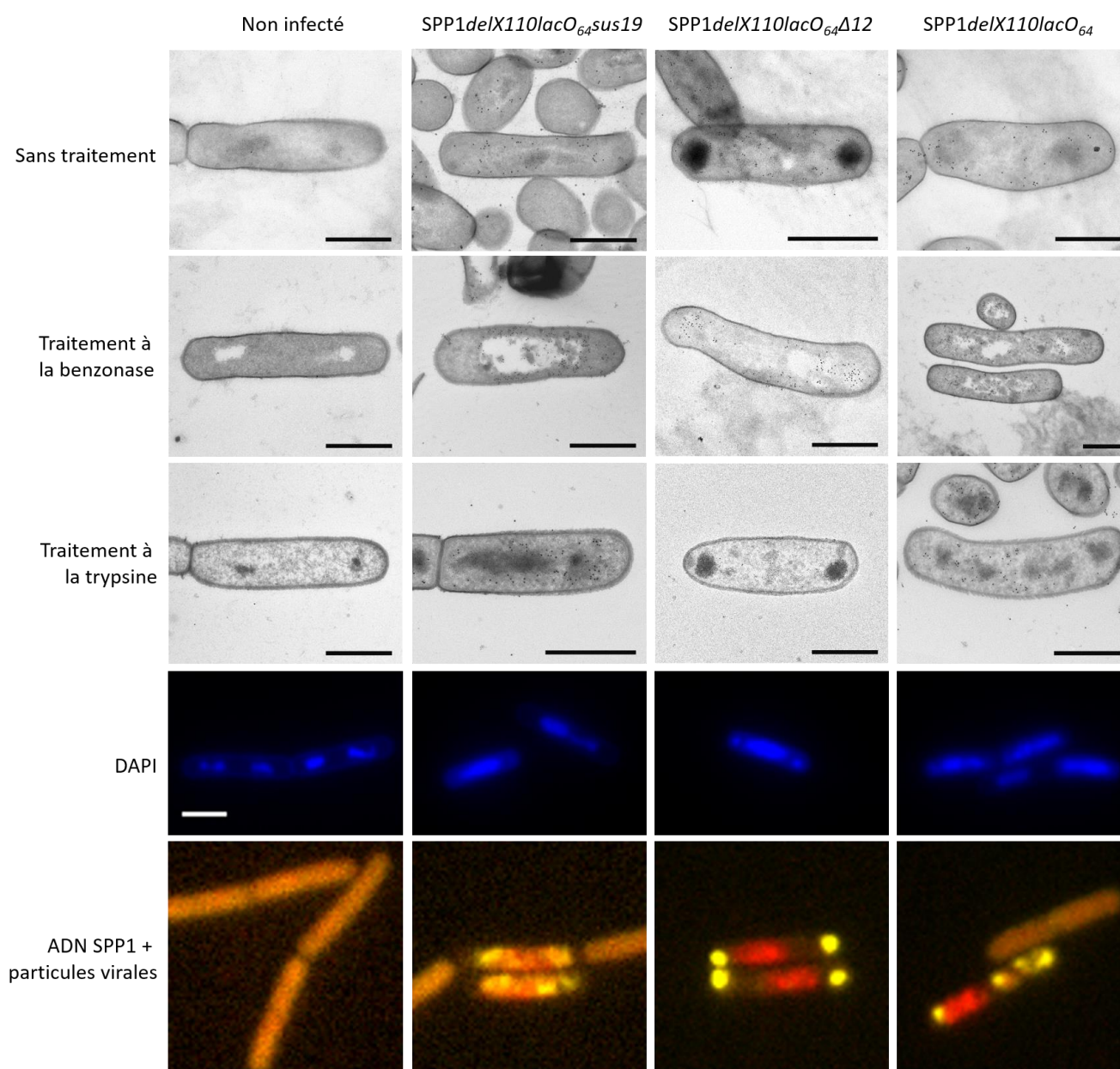


Figure 68 : Images de microscopie électronique de cellules non-infectées et infectées et leurs équivalents en microscopie de fluorescence. Les cellules *B. subtilis* YB886 ont été infectées par les phages SPP1delX110lacO₆₄sus19, SPP1delX110lacO₆₄Δ12 ou SPP1delX110lacO₆₄ pendant 35 minutes avec une multiplicité d'infection de 10 puis fixées. Des cryo-coupes de 90 nm sans traitement (première ligne) ou traitées soit à la benzonase (deuxième ligne), soit à la trypsine (troisième ligne) ont été marquées par la suite avec un anticorps monoclonal de souris anti-ADNdb et un anticorps polyclonal de lapin anti-sus70. Les anticorps secondaires couplés à l'or colloïdal ont respectivement des diamètres de 5 et 15 nm. Les cellules après fixation ont aussi été observées par microscopie de fluorescence avec un marquage DAPI (quatrième ligne). La cinquième ligne présente la microscopie de fluorescence de bactéries produisant LacI-mCherry et mCitrine-gp11 (les deux colonnes de gauche, **Figure 63**) ou LacI-mCherry et gp12-mCitrine (les deux colonnes de droite, **Figure 58**) et infectées par les mêmes phages. L'échelle représente 1 μm pour la microscopie électronique et 2 μm pour les marquages DAPI.

Dans les cellules non-infectées, en absence de traitement et avec le traitement à la trypsine (qui permet d'avoir un meilleur marquage de l'ADN), on observe deux petites zones électrodenses

marquées par l'anticorps anti-ADNdb. Ces zones correspondent aux deux nucléoïdes bactériens que l'on observe clairement dans le marquage DAPI. Lorsque ces cellules sont traitées à la benzonase, l'ADN est alors dégradé et laisse apparaître dans la cellule deux petites zones sans matériel qui se positionnent de manière comparable aux nucléoïdes retrouvés dans la condition sans traitement (**Figure 68**).

Pour les cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19*, dans le traitement à la trypsine, il apparaît une grande zone marquée par l'anticorps anti-ADNdb qui s'étend sur tout le centre de la cellule. Cette zone beaucoup plus large que le nucléoïde bactérien et ayant une localisation différente est interprétée comme étant le foyer de réplication de l'ADN de SPP1 (**Figure 68**). Le marquage anti-sus70 marque ici les procapsides qui se localisent essentiellement en périphérie ou à proximité du foyer d'ADN viral. Cette observation est confirmée avec le traitement à la benzonase de ces cellules. L'ADN du phage s'accumulant dans la cellule en absence d'encapsidation, il apparaît une très grande zone sans matériel autour de laquelle les procapsides vont se localiser (**Figure 68**). Ces images correspondent bien aux observations faites en microscopie de fluorescence. Malgré de nombreux efforts avec différentes techniques de fixation et de coupe de bactéries, nous ne sommes pas arrivés à observer des procapsides ou des virions dans les cellules infectées. L'intégrité de ces structures est fort probablement détruite par les étapes de fixation mais nous avons pu aboutir à leur localisation par immuno-marquage.

Les cellules infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* présentent plusieurs zones très denses en ADN. La plus centrale présente un peu moins d'ADN et pourrait être le foyer de réplication montrant un peu moins de marquage anti-sus70 aux alentours que dans l'infection par SPP1*delX110lacO₆₄sus19*. Les foyers d'ADN plus proches des pôles de la cellule présentent davantage de marquage anti-sus70 (particulièrement après traitement à la benzonase) et pourraient être les foyers de particules virales. La présence d'ADN dans les foyers proches des pôles peut s'expliquer par la coupe des phages accumulés à cet endroit-là exposant l'ADN encapsidé. Les foyers, à proximité des pôles, sont considérablement plus électrodenses dans l'infection avec SPP1*delX110lacO₆₄Δ12*. Cette observation confirme l'hypothèse émise car les foyers de particules virales dans les cellules infectées par ce phage apparaissent très compacts en microscopie de fluorescence (**Figures 59C et 68**).

III.3. La déstructuration du chromosome bactérien pendant l'infection virale

L'infection de SPP1 monopolise massivement les ressources bactériennes de réplication de l'ADN (**Figure 46** et **Tableau 11**) et restructure l'espace cytoplasmique (**Figure 68**). Nous avons donc voulu comprendre le devenir de l'ADN bactérien au cours du processus infectieux. Pendant l'infection virale, le nombre de copies du chromosome bactérien reste relativement constant (résultats non montrés) suggérant qu'il n'y a pas de dégradation du génome bactérien. Ainsi, pour observer si l'organisation du nucléoïde était affectée, des cellules non-infectées et infectées ont été observées avec un marquage DAPI (**Figures 68** et **69**).

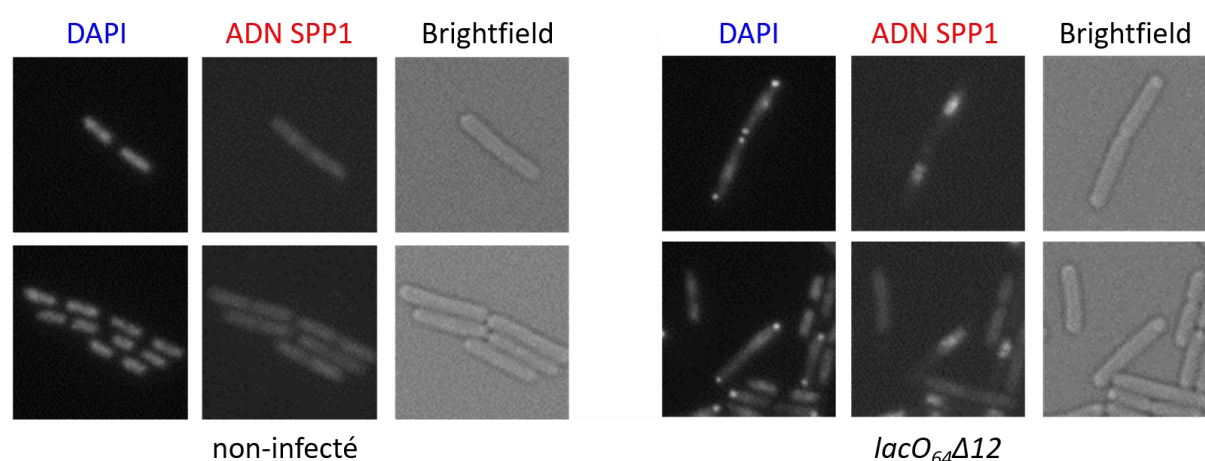


Figure 69 : Déstructuration du chromosome bactérien lors de l'infection virale. Des cellules GSY10004 ont été infectées avec le phage SPP1*delX110lacO₆₄Δ12* à une multiplicité d'infection de 2, marquées avec du DAPI pendant 3 minutes à température ambiante et observées avec les filtres DAPI (bleu) et DsRed (rouge).

On observe que lorsque l'on marque l'ADN avec du DAPI dans une bactérie non-infectée ayant poussé en milieu riche, on peut dénombrer deux nucléoïdes bien structurés par cellule. Par contre, lorsque la bactérie est infectée par le phage, le marquage DAPI va s'intercaler aussi bien dans l'ADN chromosomique que dans l'ADN viral. Par soustraction du marquage DAPI correspondant à l'ADN viral libre qui est marqué par la protéine LacI-mCherry, on observe que le marquage de l'ADN chromosomique dans les cellules infectées est différent de celui des cellules non-infectées (**Figure 69**). Il apparaît décondensé. Ce qui a conduit à la question de savoir si des protéines responsables de la structuration du chromosome bactérien sont ciblées par SPP1 et si elles jouent un rôle dans l'infection. Nous nous sommes intéressés à la protéine HBSu, responsable de la compaction du génome de *B. subtilis* (Köhler & Marahiel, 1997) et aux protéines SMC, impliquées dans la structuration du chromosome bactérien (Kleine Borgmann *et al*, 2013) (section I.5.3).

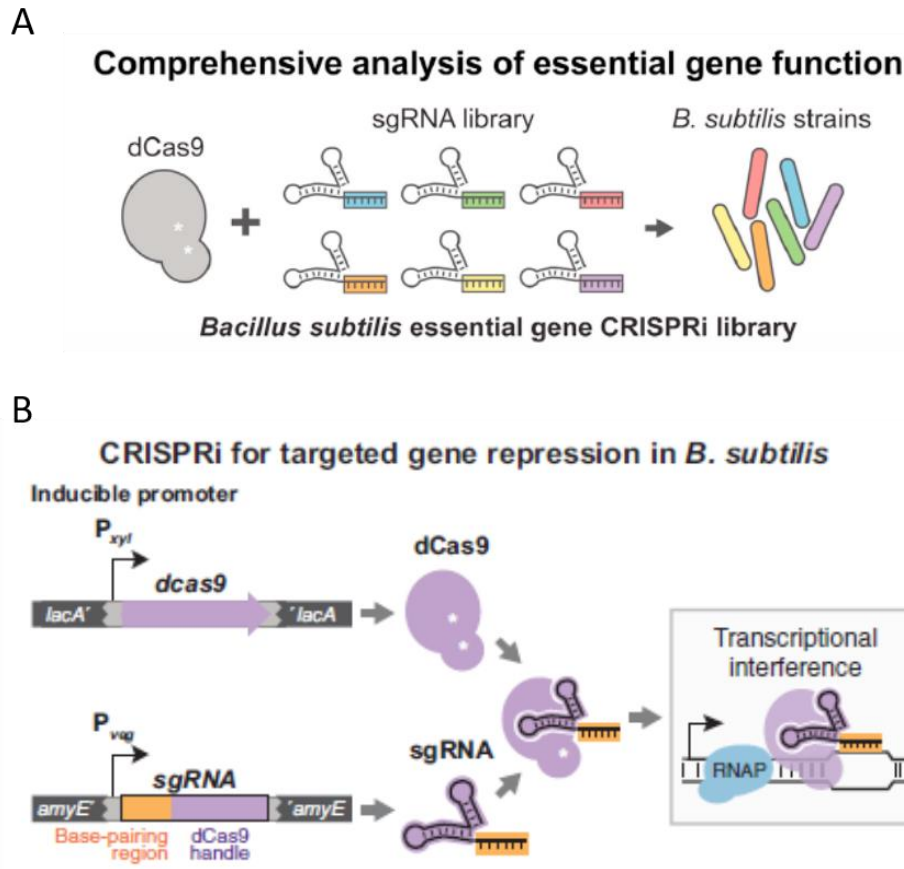


Figure 70 : Système CRISPRi-dCas9 pour l'interférence transcriptionnelle. (A) Une collection de souches codant chacune un ARN guide ("sgRNA") qui cible un gène essentiel de *B. subtilis* a été construite par Peters *et al* (2016). **(B)** La nucléase dCas9 de *Streptococcus pyogenes*, inactivée dans son site catalytique (Qi *et al*, 2013), a été placée sous de contrôle d'un promoteur inducible au xylose. Elle est dirigée contre des cibles d'ADN spécifiques *via* l'expression constitutive de l'ARN guide, ce qui va réprimer la transcription. dCas9 a été intégrée de manière stable dans le chromosome de la bactérie dans le locus *lacA* et les ARN guides dans le locus *amyE* (Peters *et al*, 2016).

Des souches isogéniques de YB886 ont été construites, utilisant le système CRISPR-dCas9 qui bloquent de façon réversible l'expression des gènes *hbs* et *smc*. Ce système est basé sur l'utilisation d'un ARN guide ("sgRNA") qui dirige la protéine dCas9, sous contrôle d'un promoteur inducible au xylose, vers la région 5' du gène ciblé. La liaison de dCas9 à l'ADN va bloquer l'expression par interférence avec la transcription du gène (**Figure 70**) (Peters *et al*, 2016).

Nous avons ensuite quantifié la synthèse d'ADN et le taux d'encapsidation de ces souches infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* en présence de 1 % de xylose pour bloquer l'expression de *hbs* et *smc*. A 25 minutes post-infection, le nombre de copies total d'ADN synthétisé est similaire pour les souches YB886, GSY10066 (contrôle dCas9) et GSY10088 (*hbs*-sgRNA+dCas9). Par contre, il est 2 fois moins important pour la souche GSY10089 (*smc*-sgRNA+dCas9) qui interfère avec la transcription de *smc* (**Figure 72A**). On note aussi qu'il y a aussi une réduction du pourcentage d'ADN encapsidé. En effet, dans cette souche, le taux d'encapsidation de l'ADN n'est que de 9 % alors qu'il approche les 20 % dans les autres souches (**Figure 72B**). Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Soit la disponibilité/quantité d'ADN viral dans la cellule est un déclencheur du processus d'encapsidation, soit la protéine SMC a un rôle inconnu dans l'encapsidation de l'ADN ou dans l'assemblage de la capside de SPP1, une hypothèse moins probable. Compte tenu du fait que l'on n'ait pas détecté d'effet de la déplétion de HBSu dans l'infection par SPP1, seule l'étude de la protéine SMC a été poursuivie.

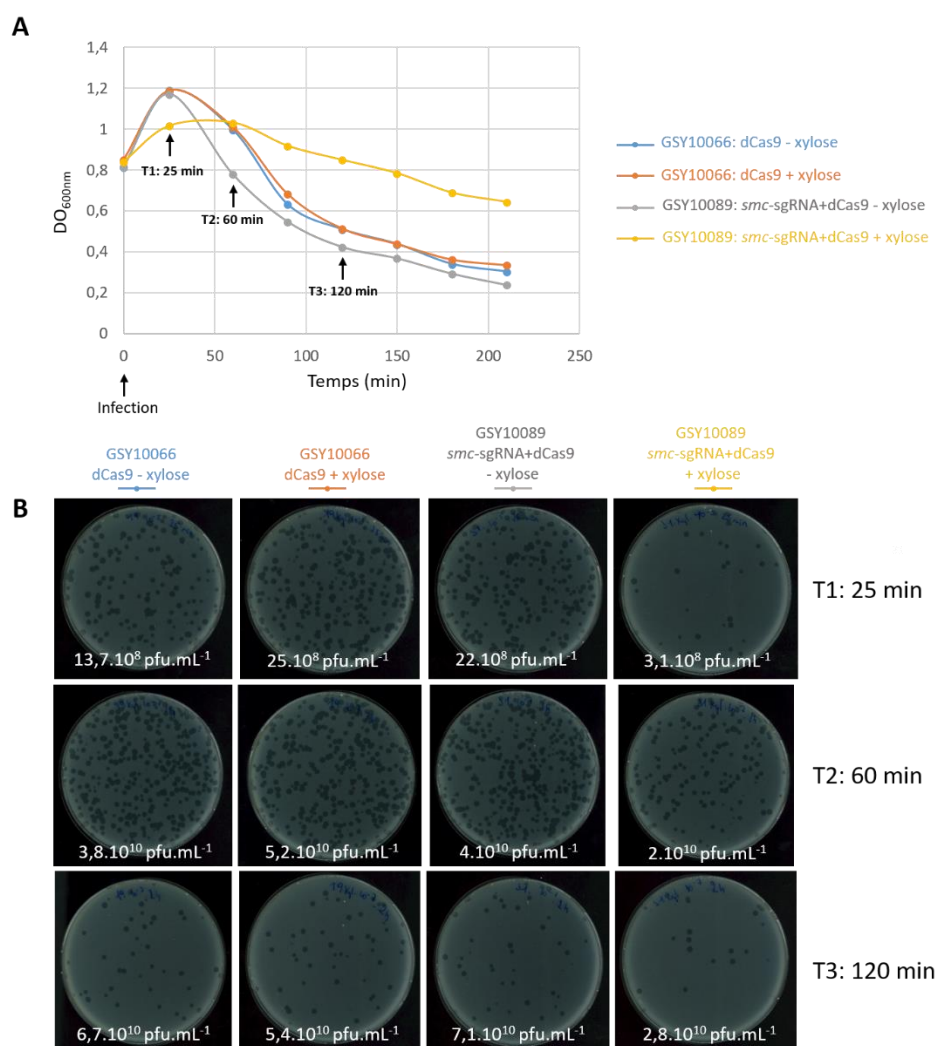


Figure 73 : **(A)** Courbes de lyse des souches GSY10066 et GSY10089 en absence et en présence de 1 % de xylose infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* avec une multiplicité d'infection de 5. **(B)** Titrations des phages totaux des souches infectées en **(A)** à 25, 60 et 120 minutes post-infection. Cette expérience a été répétée deux fois.

La dynamique de l'infection de la souche GSY10089 a été comparée avec celle de la souche contrôle GSY10066. Dans les deux souches en absence de xylose et dans la souche contrôle en présence de xylose (**Figure 73A**), l'infection conduit à une production de virions identique quel que soit le temps écoulé après l'infection. Par contre, dans la souche GSY10089 en présence de xylose, le titre des phages produits après 25 minutes d'infection est 7 fois inférieur à celui retrouvé pour GSY10089 en absence de xylose (**Figure 73B**). Cette différence se réduit à un facteur de 2-3 fois à des temps tardifs d'infection (60 et 120 minutes post-infection). La courbe de lyse de GSY10089 induite est aussi différente. La souche s'arrête de pousser rapidement après l'infection et sa densité optique diminue lentement suggérant une lyse inefficace. Ceci pourrait être le résultat d'une production de virions retardée qui impacterait la lyse des cellules infectées. Les souches non-induites et le contrôle induit ont le même comportement avec une densité optique diminuant de façon identique au cours du temps du fait de la lyse des cellules infectées.

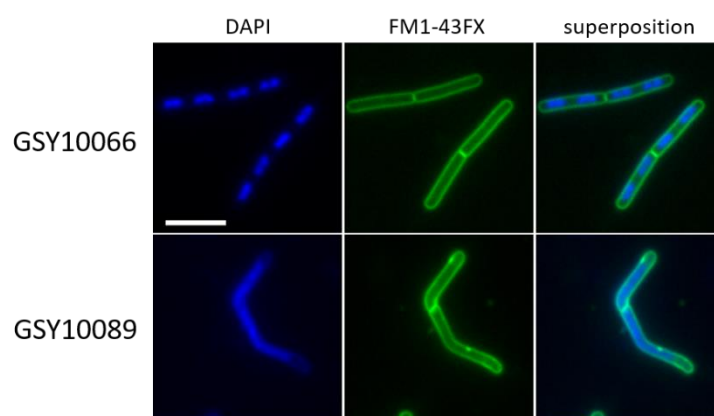


Figure 74 : Observation au microscope des souches GSY10066 et GSY10089 en présence de 1 % de xylose en absence d'infection virale. L'ADN a été marqué avec le DAPI et le contour cellulaire avec le marqueur membranaire FM1-43FX. L'échelle représente 5 μ m.

Nous avons ensuite observé au microscope l'effet de l'absence de SMC sur le phénotype de la cellule et ses conséquences lors de l'infection par SPP1. Tout d'abord, nous avons étudié l'organisation de l'ADN bactérien et le phénotype des cellules dans les souches GSY10066 et GSY10089 en absence d'infection avec un marqueur de l'ADN, le DAPI, et un marqueur du contour cellulaire, le FM1-43FX. Dans la souche GSY10066, les deux nucléoïdes bactériens sont distincts et bien séparés. Dans la souche GSY10089, l'ADN est désorganisé et les nucléoïdes ne sont plus identifiables (**Figure 74**), un phénotype décrit pour les mutants *smc* (Ireton *et al*, 1994). On observe également, dans certaines cellules, des divisions asymétriques avec des bactéries dépourvues d'ADN (résultats non montrés). L'absence de la protéine SMC inhibe bien la compaction et la ségrégation du chromosome bactérien. Cette souche a le phénotype attendu.

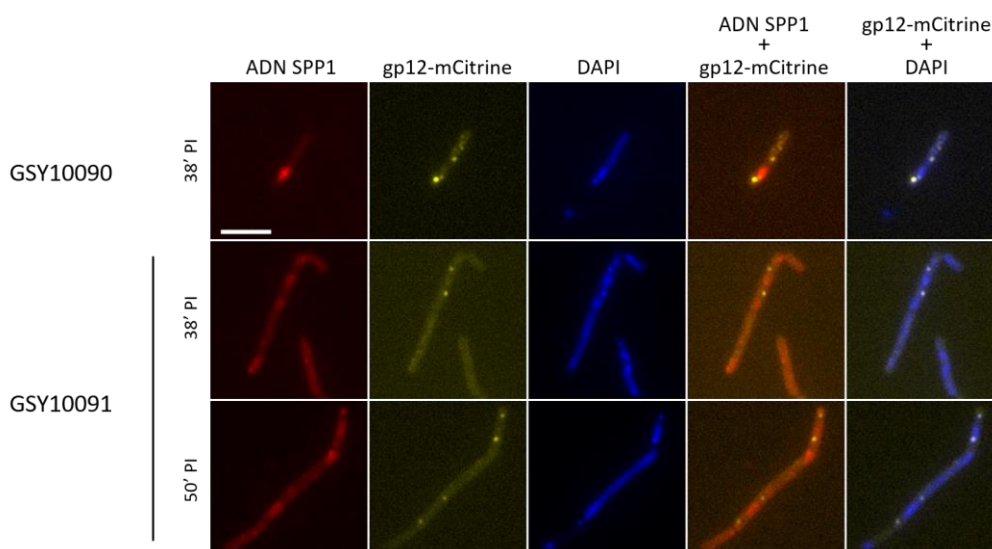


Figure 75 : Observation au microscope des souches GSY10090 et GSY10091 en présence de 1 % de xylose pendant d'infection virale. Les souches GSY10090 (dCas9+LacI-mCherry+gp12-mCitrine) et GSY10091 (*smc*-sgRNA+dCas9+LacI-mCherry+gp12-mCitrine) en présence de 1 % de xylose ont été infectées avec le phage SPP1~~*delX110lacO₆₄*~~ avec une multiplicité d'infection de 5 pendant 23 minutes à 37°C. L'échelle représente 5 µm.

Par la suite, nous avons fait des observations en conditions d'infection avec le phage SPP1~~*delX110lacO₆₄*~~. Pour cela, la fusion gène *12-mCitrine* a été insérée dans le locus *sacA* des souches GSY10066 et GSY10089 pour l'étude de la formation de particules virales dans les cellules. On note que la souche déficiente pour le gène *smc* (GSY10091) semble filamenter. Dans les deux souches, l'infection par le phage SPP1~~*delX110lacO₆₄*~~ nous permet de visualiser le foyer de réplication de SPP1 (**Figure 75**). Ces foyers sont plus petits et moins intenses dans la souche GSY10091 que dans la souche contrôle GSY10090 à un temps comparable (38 minutes post-infection). En ce qui concerne les foyers de particules virales marquées par gp12-mCitrine, à l'inverse de la souche contrôle GSY10090 dans laquelle ces foyers se localisent bien de part et d'autre du foyer de réplication, ils sont peu visibles voir même absents aux mêmes temps post-infection dans la souche GSY10091 (**Figure 75**). Cela semble indiquer un retard aussi bien dans la réplication que dans l'assemblage des particules virales.

Bien que les protéines HBSu et SMC soient toutes deux connues pour conduire à la décondensation du chromosome bactérien, seule l'absence de la protéine SMC semble avoir un effet sur l'infection par SPP1. En effet, la réplication de l'ADN du phage et son encapsidation sont réduits dans l'infection du mutant *smc*. Dans le futur, il serait intéressant de comprendre précisément comment SMC interfère avec l'infection. Cependant, on doit prendre en considération que le ralentissement du cycle viral peut s'expliquer par des effets pléiotropiques résultant de fonctions cellulaires affectées par l'absence de SMC. Il sera néanmoins important de comprendre les raisons de la décondensation du chromosome bactérien et si le foyer de réplication viral est structuré par des protéines du type "histone-like" ou des condensines (section I.4.3) pendant l'infection phagique.

Discussion

IV. Discussion

IV.1. Facture énergétique de l'infection phagique

L'infection virale monopolise les ressources cellulaires aussi bien en terme de machines moléculaires, de précurseurs de biosynthèse que d'énergie. Pour exemple, lorsque le phage T4 infecte la bactérie *E. coli*, 30 % de l'énergie de la cellule est utilisée pour la production de 200 virus (Mahmoudabadi *et al*, 2017). De plus, la descendance virale et la consommation énergétique sont positivement corrélées avec la croissance bactérienne. En effet, lorsque T4 infecte une bactérie dont le temps de doublement est de 21 heures, la descendance obtenue est seulement d'un phage par bactérie au lieu de 100-200 phages dans des conditions optimales de croissance de la cellule hôte (Golec *et al*, 2014). Ceci souligne le fait que le rendement de la multiplication virale dépend fortement des ressources cellulaires et de l'état physiologique de l'hôte. D'un point de vue populationnel, lorsque les bactéries sont en forte croissance, l'infection phagique produit rapidement un nombre important de phages qui vont attaquer d'autres bactéries hôtes réduisant leur population tandis que les bactéries métaboliquement peu actives rendent l'infection virale inefficace. Cette relation hôte-pathogène conduit à un contrôle mutuel des populations bactériennes et phagiques.

Dans le cas de SPP1, les calculs d'énergie monopolisée par l'infection ont été faits en considérant que l'infection de *B. subtilis* menait à la formation de 150 virions par cycle infectieux (**Figure 44**). Ce chiffre est une sous-estimation. Il considère exclusivement le coût des composants et de l'assemblage de ces particules ($1,65 \cdot 10^9$ ATP; **Tableau 10**) ce qui correspond à 1,8 % de l'énergie totale calculée pour une bactérie de $3 \mu\text{m}^3$ suivant la méthodologie de Mahmoudabadi *et al* (2017). Le rendement de particules virales a été obtenu avec une souche produisant la fusion LacI-mCherry infectée par le phage SPP1 *delX110lacO₆₄*. Dans cette souche, on observe que la descendance phagique est réduite de 2,5 fois par rapport à une infection sauvage avec le phage SPP1_{wt} (**Figure 42A**). De plus, seul 30 % de l'ADN de SPP1 synthétisé est utilisé pour la formation des 150 particules virales infectieuses (**Figure 44A**). L'accumulation de procapsides virales assemblées pendant l'infection de SPP1 sauvage a aussi été observée mais non quantifiée. Elle augmente ainsi aussi la facture énergétique (Isidro *et al*, 2004b).

IV.2. Les usines de répllication du génome de SPP1

La répllication est un processus consommateur en énergie mais aussi en ressources cellulaires. Pour SPP1, elle recrute de manière massive le réplisome bactérien pour synthétiser de nouvelles copies d'ADN viral. Deux modes de répllication sont utilisés par le bactériophage. La première (mode theta) permet d'accumuler des copies de l'ADN sous forme circulaire. Ces cercles servent par la suite de matrice pour le "switch" qui conduit à la répllication de type sigma. Ainsi, plusieurs fourches de répllication évoluent en parallèle sur des molécules d'ADN indépendantes menant à l'amplification

exponentielle du génome sous forme de concatémères dans la cellule. Ces concatémères de SPP1 sont ensuite transloqués dans la capsidie selon un mécanisme de tête pleine. L'étude de ces deux modes de réplication est importante pour comprendre l'évolution de la réplication pendant le cycle viral. En effet, le foyer de réplication change en forme et en taille pendant l'infection. Dans les premières étapes de la réplication, il est petit et semble de forme sphérique. Avec le temps et dans des conditions d'infection sauvage, il va augmenter en taille et s'allonger dans la cellule. La forme allongée peut s'expliquer par des contraintes spatiales (la membrane) qui forcerait le foyer à grandir en largeur. A des temps tardifs, dans une infection avec le mutant *SPP1delX110lacO₆₄Sus19*, qui n'encapside pas d'ADN, ce foyer devient très large et occupe un volume important dans la bactérie (**Figure 45F**). La quantification par qPCR du nombre de copies d'ADN viral total de ce mutant qui n'encapside pas l'ADN, révèle que la synthèse de copies de génome viral est 40 % inférieure à celle d'une infection par le phage de référence *SPP1delX110lacO₆₄* (**Figure 41**). Pour comprendre pourquoi ce nombre est réduit dans le mutant, il serait intéressant de suivre l'évolution du nombre de copies d'ADN phagique dans une cinétique d'infection de 0 à 30 minutes en le quantifiant à différents points post-infection. Ceci permettrait de déterminer si, dans ce mutant, la réplication est plus lente mais continue au cours du temps ou si elle a la même cinétique que le phage sauvage à des temps précoces mais qu'elle est ralentie voir stoppée par l'absence d'encapsidation du génome dans la procapsidie. Dans ce deuxième cas, cela suggérerait qu'il existe un couplage entre réplication et encapsidation dans lequel le transfert de l'ADN vers l'intérieur de la procapsidie stimulerait la production de nouvelles copies de génome viral.

En parallèle de l'étude de l'évolution du foyer de réplication, les protéines du réplisome bactérien et du phage ont été observées. En conditions d'infection, les protéines virales gp34.1 et gp40 et la majorité des protéines bactériennes du réplisome sont recrutées au sein des foyers de réplication. Cependant, leur localisation n'est pas figée et elle évolue avec le temps. A des temps précoces de l'infection, les protéines virales et cellulaires colocalisent de manière homogène avec l'ADN de SPP1. Avec le temps, pour les protéines gp40 (**Figure 48**), DnaX (**Figure 49**), DnaG et PolC (données non montrées), des régions plus intenses apparaissent au sein du foyer de réplication qui correspondent probablement aux fourches de réplication de l'ADN viral. Ces observations sont aussi valables pour gp34.1 (**Figure 52**). A 30 minutes post-infection, ce recrutement massif de la machinerie cellulaire mène à la synthèse d'une quantité d'ADN viral équivalente à 5 génomes de *B. subtilis* présente dans la cellule.

Lors de la réplication, la globalité du réplisome bactérien semble être mobilisée au sein du foyer de réplication phagique que les protéines soient essentielles ou non à la réplication du phage. Parmi elles, DnaB, pourtant pas essentielle à la réplication de l'ADN de SPP1, est retrouvée dans les foyers de

réplication (**Figure 47** et **Tableau 11**) bien qu'elle soit connue pour être associée à la membrane dans un contexte non-infectieux (Hoshino *et al*, 2006 ; Rokop *et al*, 2004). De cette observation, on peut en déduire deux hypothèses : soit que la réplication de SPP1 a lieu proche de la membrane soit que la protéine DnaB se décroche de la membrane pendant le recrutement du réplisome au foyer de réplication de SPP1. Des expériences de TIRF ("Total Internal Reflection Fluorescence microscopy") ont été entreprises. Cette technique permet de voir par microscopie de fluorescence les événements qui ont lieu proches de la membrane. Ces travaux n'ont pas montré de localisation de l'ADN viral à proximité de la membrane (résultats non montrés). Il semble donc que le foyer de réplication de SPP1 ne soit pas associé à la membrane et se situerait au centre de la bactérie, là où DnaB est recrutée.

Pour comprendre la dynamique de l'ADN phagique dans le foyer de réplication, des expériences de microscopie combinées avec un module FRAP ont été initiées. Elles montrent que lorsque la fluorescence de la protéine LacI-mNeonGreen, rapportrice de l'ADN de SPP1, est éteinte dans une zone du foyer, la fluorescence dans la zone photoblanchie redevient rapidement homogène montrant une dynamique importante dans le foyer de réplication (**Figure 54**). Cette récupération de la fluorescence peut s'expliquer de différentes manières. Pendant le cycle viral, de nouvelles molécules d'ADN sont synthétisées qui viennent enrichir le nombre de copies d'ADN dans le foyer de réplication et elles sont marquées par la protéine LacI-mNeonGreen au fur et à mesure de leur production. Une autre possibilité pourrait être que les molécules LacI-mNeonGreen éteintes dans la région de réplication sont enlevées lors du passage des fourches de réplication et redistribuées sur de nouveaux sites libres pendant la réplication de l'ADN du phage. La dynamique dans le foyer, imposée par la réplication, par la transcription et d'autres processus actifs, conduirait à des mouvements de l'ADN qui le redistribuerait dans le foyer. Enfin, il pourrait exister de l'appariement-désappariement spontané du couple LacI-*lacO*. Pour cette dernière hypothèse, l'affinité de ce couple est tellement forte que l'on pourra considérer négligeable cet effet (Riggs *et al*, 1970 ; Lewis, 2005). Pour distinguer ces hypothèses, les mêmes expériences de FRAP ont été réalisées en présence d'un inhibiteur de la polymérase PolC et l'infection a été faite avec un mutant d'encapsidation permettant à toutes les copies d'ADN viral d'être libres dans la bactérie. L'ajout de cet inhibiteur a pour conséquence de bloquer la réplication des ADN phagiques et bactériens. Dans ces conditions, après photoblanchiment, la zone éteinte va peu ou pas récupérer de fluorescence (**Figure 55**) suggérant que la réplication est un acteur majeur de la dynamique de l'ADN dans le foyer.

L'ensemble de nos données montre que le foyer de réplication de SPP1 est une usine virale. Elle définit un compartiment qui assure l'activité de biosynthèse de l'ADN viral, concentre les protéines virales et cellulaires nécessaires à l'amplification du génome du phage et a une dynamique qui lui est propre.

IV.3. Structuration du nucléoïde bactérien

Dans l'idée de comprendre la structuration de l'usine de réplication de l'ADN de SPP1, l'impact des protéines impliquées dans la compaction du génome bactérien (HBSu et SMC) a été analysé dans des cellules infectées. Deux raisons ont conduit au choix de ces protéines cellulaires. Tout d'abord, nous avons observé par un marquage au DAPI que le nucléoïde bactérien est moins condensé dans des cellules infectées. Le phage affecte donc la structure du chromosome de la bactérie. De plus, le phage présente un foyer de réplication homogène et structuré suggérant la présence de facteurs pour le maintenir sous cette forme. Nous nous sommes donc intéressés à des protéines cellulaires pouvant jouer un rôle dans la condensation de l'ADN. L'absence de la protéine HBSu ne semble pas affecter la formation de l'usine de réplication de SPP1 mais conduit cependant à la décondensation du chromosome de *B. subtilis*. Par contre, l'absence de la protéine SMC a un réel impact sur la réplication de l'ADN viral. En effet, elle diminue de 2 fois le nombre de copies d'ADN à 25 minutes post-infection (**Figure 72**). Il est important de tenir compte que ces expériences ont été faites avec des mutants CRISPR dont les gènes sont essentiels pour *B. subtilis* (Peters *et al*, 2016). Ainsi, dans ces mutants, l'expression des gènes est bloquée mais les protéines, selon leur temps de demi-vie dans la cellule, pourraient toujours être présentes. Une fusion de la protéine SMC avec une protéine fluorescente mCitrine a été construite et ne semble pas être recrutée au sein du foyer de réplication de SPP1 pendant l'infection virale (résultats non montrés). Cette absence de colocalisation peut être attribuée à plusieurs facteurs : soit la protéine n'est pas du tout recrutée, soit la protéine est trop faiblement recrutée, soit la protéine native est préférée à la protéine de fusion. Pour savoir quelle hypothèse est vraie, il est envisageable de dégénérer la séquence nucléotidique de la fusion *smc-mcitrine* correspondant à la partie reconnue par le sgRNA tout en conservant intacte la séquence protéique. Cela permettrait, lors de l'induction de la protéine dCas9 dans le mutant CRISPR, de n'inhiber que la synthèse de la protéine native et de suivre la localisation de la protéine SMC-mCitrine lors de l'infection virale.

IV.4. Programme spatial d'assemblage de la particule virale de SPP1

La particule virale de SPP1 s'assemble selon un mécanisme bien défini (**Figure 56**). L'ADN de SPP1 sous forme concatémérique est encapsidé dans des procapsides préformées pour constituer la nucléocapside virale. Deux protéines de cette voie d'assemblage ont été suivies. La protéine gp11, qui est retrouvée dans la procapside, permet de marquer le stade précoce de la voie. La protéine gp12, qui est une protéine auxiliaire de la capsid, est présente uniquement quand la capsid a subi l'expansion et que l'encapsidation a eu lieu. Ainsi, ces deux protéines marquent des étapes différentes de la voie d'assemblage de la particule virale.

L'étude de la protéine gp11 permet le suivi des procapsides pendant le cycle viral. Cette protéine part de l'intérieur de la procapside avant l'encapsidation. Cependant, comme mCitrine-gp11 ne sort probablement pas de la procapside due à l'encombrement apporté par le tonneau de mCitrine, cette fusion s'avère être un bon marqueur pour le suivi des particules virales pour lesquelles l'encapsidation a eu lieu mais dans lesquelles quelques copies de mCitrine-gp11 sont restées emprisonnées (**Figure 62**). Cette propriété a été exploitée et a permis son utilisation pour décortiquer les étapes intermédiaires de l'assemblage de la capsid.

Lorsque les cellules sont infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄sus19*, les procapsides s'accumulent dans le cytoplasme de la bactérie et colocalisent partiellement avec l'usine de réplication. Puis avec le temps, les procapsides migrent vers les pôles du foyer de réplication tout en restant en contact avec celui-ci (**Figures 63 et 68**). Ainsi, en absence d'encapsidation, les procapsides sont associées aux usines de réplication. Dans le cas de cellules dont la septation a été inhibée, cette localisation reste liée aux pôles du foyer de réplication au fur et à mesure de son allongement (**Figure 65**).

Lorsque les cellules sont infectées par le phage SPP1*delX110lacO₆₄*, les procapsides ont le même comportement à des temps précoces que celles du mutant. Par contre, à des temps tardifs, une sous-population des particules avec mCitrine-gp11 ségrège du foyer de l'ADN viral pour former des foyers spatialement distincts. Ceux-ci colocalisent avec les foyers de particules virales (**Figure 67**). Ce comportement a été observé en microscopie de fluorescence, en microfluidique et en microscopie électronique. D'après ces données, les procapsides sont concentrées dans l'usine de réplication où elles évoluent vers des régions périphériques de l'usine en attente de l'encapsidation de l'ADN. Lorsque ce processus est conclu, il y a une exclusion complète des nucléocapsides qui vont former des foyers différents dans le cytoplasme. Cette observation met en évidence une nouvelle fonction de l'usine virale, l'encapsidation du génome, qui permet de faire le lien direct entre l'ADN du phage et la structure virale.

Le suivi de la protéine gp12 identifie la localisation des capsides dans le cycle infectieux du phage. Elle apporte des informations sur l'état final de l'assemblage. Lorsque les cellules sont infectées par les phages SPP1*delX110lacO₆₄sus19* (données non montrées), la protéine gp12-mCitrine reste homogène dans le cytoplasme car l'encapsidation n'a pas lieu. Par contre, lors de l'infection par le phage SPP1*delX110lacO₆₄* ou SPP1*delX110lacO₆₄Δ12*, les nucléocapsides vont se concentrer dans des foyers indépendants de l'usine de réplication (**Figure 58**). Leurs foyers grossissent au fur et à mesure de l'infection. Ils sont retrouvés plus concentrés et intenses dans le mutant déficient pour gp12 (**Figures 59B et 59D**). Ce comportement est probablement dû aux propriétés de surface différentes de la nucléocapside virale contenant gp12 ou non. En absence de gp12, les nucléocapsides s'associeraient

en une forme plus compacte. Ceci confirme qu'une fois l'ADN encapsidé au niveau de l'usine de réplication, les capsides ségrègent vers des foyers indépendants. Ceux-ci sont le plus fréquemment deux, un de chaque côté de l'usine virale, et ont une intensité similaire, montrant qu'ils sont alimentés en nouvelles nucléocapsides de façon équitable (**Figure 59**). Dans ce cas précis, on parle de foyers de stockage plutôt que d'usines virales car il ne semble pas qu'il y ait d'assemblage ou de synthèse de constituants nécessaires au virion. Cependant, n'ayant pas de bons marqueurs permettant de suivre l'assemblage de la queue dans le cytoplasme bactérien, il n'est pas complètement exclu que la queue soit ajoutée à la capside dans cette région (Tzipilevich *et al*, 2017). Ce foyer réside à cette position jusqu'à la lyse. Cette localisation est identique dans un mutant qui ne permet pas la fixation de la queue à la capside (données non montrées).

Ces lieux de stockage sont observés spatialement distincts du foyer de réplication et prennent une place importante dans l'espace qui n'est pas dédié à la réplication de l'ADN viral. Pour comprendre si cette localisation est polaire dans la bactérie, des cellules ont été mises en condition de filamentation et infectées. Dans ce cas, les foyers de stockage se localisent toujours de manière indépendante du foyer de réplication mais restent à proximité de l'ADN viral. Ceci suggère qu'il existe une communication entre ces deux compartiments viraux (**Figure 60**). Le phage SPP1 met donc aussi en place des usines virales pour concentrer les partenaires cellulaires au sein de régions bien précises de la bactérie.

IV.5. Comparaison de l'architecture des usines virales

Comme les virus qui infectent les cellules eucaryotes, SPP1 forme une usine virale de réplication et d'encapsidation de son génome ainsi que des foyers de stockage de particules virales. La bactérie n'ayant pas de membrane cellulaire interne, on peut s'interroger sur la nature et la structure de ces compartiments viraux retrouvés dans l'infection par SPP1. Dans cette section, je vais comparer les usines virales décrites dans la littérature avec celle de SPP1 pour discuter de quelle structure ils se rapprochent.

IV.5.1. Les virus qui utilisent les membranes présentes chez leur hôte

Il a été observé que les virus à ADN détournent et utilisent des structures membranaires préexistantes dans la cellule et les remodelent pour y installer des usines virales (Novoa *et al*, 2005). Dans le cas de SPP1, l'utilisation d'un marqueur membranaire ne montre aucune structure de type membranaire autour de son usine virale ou des foyers de stockage des particules virales.

IV.5.2. Les virus qui isolent physiquement la réplication de l'assemblage de la particule virale

Le phage 201Φ2-1 qui infecte *P. chlororaphis* forme une cage protéique autour de l'ADN viral séparant physiquement le génome du phage du cytoplasme où sont localisées les particules virales (Chaikeeratisak *et al*, 2017). Dans le cas de SPP1, on observe que lorsque l'on utilise un mutant qui bloque l'encapsidation de l'ADN dans la particule virale, d'une part, le foyer de réplication continue d'évoluer en taille et en forme et, d'autre part, les procapsides colocalisent avec le foyer de réplication. Lors de la maturation de la procapside vers l'état de nucléocapside, cette dernière structure ségrège de l'usine vers les foyers de stockage. Ce comportement indique qu'aucune barrière ne semble restreindre l'ADN viral dans la cellule. De plus, dans des expériences de microfluidique, on peut voir que, dans quelques cellules, la division cellulaire peut couper en deux le foyer de réplication (résultats non montrés). L'hypothèse de la présence d'une structure protéique autour de l'ADN viral de SPP1 n'est donc pas susceptible d'être.

IV.5.3. Les virus dont le génome est linéaire et qui dépendent des protéines du cytosquelette de l'hôte

Pour les phages Φ29 et PRD1 qui ont un génome linéaire lié de façon covalente à une protéine TP, des études ont montré que leur ADN était associé à la membrane (Munoz-Espin *et al*, 2009). En effet, leur réplication dépendrait de protéines du cytosquelette de la bactérie (MreB). Pour SPP1, des cinétiques de lyse de cellules infectées et des expériences de PCR quantitative (identiques à celles faites en **Figure 5A**) ont été réalisées dans un mutant pour le gène *mreB*. Les résultats montrent que la réplication est très peu affectée. De même, une ancienne étude suggérerait que la synthèse de l'ADN viral de SPP1 aurait lieu aussi au niveau de la membrane cellulaire (Burger, 1980). Cette hypothèse pourrait être plausible puisque l'on sait que la protéine DnaB facilite le recrutement de l'hélicase DnaC et son co-facteur DnaI sur l'ADN bactérien (Smits *et al*, 2010). Cependant, aucune de nos études, y compris les expériences de TIRF (section IV.2), n'indique une association à la membrane de l'usine de réplication du génome de SPP1.

IV.5.4. Les virus qui forment des structures aux propriétés d'organelles liquides

Enfin, comme pour les virus à ARN de polarité négative (Nikolic *et al*, 2017), le phage forme-t-il des usines virales de type organelles liquides ? Ces organelles ont la propriété d'être sphériques, sans membrane, elles concentrent certains composants et en excluent d'autres, sont sensibles au choc osmotique et peuvent présenter des événements de fusion et de fission (Banani *et al*, 2017). Les données de FRAP sont compatibles avec la possibilité que les usines de réplication de SPP1 pourraient avoir ces propriétés. On observe que le retour de la fluorescence est rapide et homogène dans la zone

photoblanchie. De plus, la septation possible du foyer de réplication pendant la division de la cellule indique qu'une fission de l'usine de réplication est possible (section IV.5.2). D'un autre côté, l'usine de SPP1 est le plus fréquemment une seule structure ne subissant normalement pas d'évènement de fission. De plus, les procapsides virales sont poussées vers la périphérie de l'usine plutôt que de présenter une distribution homogène, malgré la forte dynamique de l'ADN viral. Pour en savoir davantage, on pourrait envisager de construire un double système rapporteur de l'ADN du phage. Il permettrait, dans le cas d'une multi-infection, de suivre le devenir de l'ADN de différents phages dans la cellule. Les événements de fusion, de fission et de localisation dans les foyers de réplication pourraient être analysés. Enfin, si ces événements existent, on pourrait les exploiter avec des mutants bloquant la réplication à différentes étapes du cycle viral dans une cellule dans laquelle les fonctions de recombinaison cellulaire sont inhibées. Des expériences de FRAP permettraient une analyse dynamique de l'interaction entre les usines des différents réplicons phagiques. Ces expériences aideraient à comprendre si l'usine de SPP1 est compartimentée par une séparation de phase ou par un autre mécanisme résultant des propriétés biophysiques de l'association de l'ADN avec les protéines du réplisome. Une compartimentation similaire est probablement retrouvée dans d'autres phages avec un génome de taille similaire à SPP1 comme λ (Edgar *et al*, 2008) et possiblement chez les Herpèsvirus (McSwiggen *et al*, 2019).

IV.6. Impact de la quantité d'ADN viral sur la lyse cellulaire

A la fin du cycle viral, la lyse de la bactérie a lieu et elle est dépendante de protéines virales. Afin que le déclenchement de la lyse soit corrélé avec une production suffisante de virions, une de ces 3 protéines de SPP1 est produite à des temps tardifs d'infection (Fernandes & São-José, 2017). Cela permet au bactériophage d'initier le mécanisme de lyse uniquement dans les dernières étapes du cycle viral. D'autres facteurs biologiques pourraient aider à la lyse de la bactérie. Comme décrit précédemment, l'infection virale génère un grand nombre de copies d'ADN. Elles vont occuper l'espace dans la cellule mais aussi augmenter la pression de turgescence dans la bactérie car la charge négative de leurs groupes phosphate va être compensée par l'entrée de molécules additionnelles d'eau et de cations dans la cellule pour neutraliser ces charges. Pour résister à la pression osmotique, la cellule va synthétiser de nouvelles molécules de peptidoglycane (Lopez-Garrido *et al*, 2018) pour adapter son volume à la présence de cette masse d'ADN viral (Wang *et al*, 2012). L'infection pourrait donc mener à une augmentation notable de la pression osmotique dans la cellule. Celle-ci pourra être synergique avec le système holine-endolysine de SPP1 pour assurer la lyse cellulaire. Lorsque la holine perce la membrane et l'endolysine commence à digérer le peptidoglycane (section I.4.2), une forte pression osmotique interne favoriserait l'éclatement de l'enveloppe de *B. subtilis*.

Pour répondre à cette question, l'inactivation des protéines virales impliquées dans la lyse de la protéine serait utile pour voir l'effet de l'accumulation de l'ADN viral dans la cellule. Des cinétiques d'infection de cellules pourraient être réalisées pour corréler la quantité d'ADN avec le déclenchement de la lyse et une probable augmentation du volume bactérien.

Pour conclure, y-a-t-il un besoin d'augmenter l'espace bactérien pour héberger les compartiments de réplication et de stockage de particules virales de SPP1? Ceci ne semble pas être le cas car l'espace qu'occupe le chromosome bactérien, l'ADN viral libre et les virions (après 30 minutes d'infection) ne représente que 1,3 % du volume du cytoplasme. Ceci suggère que la descendance de l'infection par SPP1 est indépendante de l'espace disponible dans la cellule mais probablement davantage liée aux ressources énergétiques disponibles dans la cellule.

Conclusions et perspectives

V. Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a mis en évidence que le bactériophage met en place une stratégie efficace pour répliquer l'ADN viral et assembler des virons dans un laps de temps de 30 à 60 minutes en conditions optimales de croissance. Pour optimiser les étapes essentielles de son cycle viral, il forme des compartiments dans des régions distinctes du cytoplasme bactérien. La première étape est l'établissement d'une usine virale dédiée à la réplication de l'ADN qui permet l'amplification exponentielle du nombre de copies du génome du phage. Puis, les procapsides assemblées viennent se positionner sur ce foyer de réplication pour encapsider l'ADN viral. Une fois remplie de matériel génétique du phage, les capsides migrent vers des régions du cytoplasme, distribuées de part et d'autre du foyer de réplication, dans lesquelles elles s'accumulent en attente de la lyse cellulaire. Ces deux espaces physiquement distincts communiquent probablement entre eux pour assurer la synchronisation de ces deux mécanismes. Leur structuration tant spatiale que temporelle conduit à une multiplication rapide et optimale du phage. Cependant, elle n'est pas sans conséquence pour l'hôte infecté dont les ressources énergétiques et cellulaires et l'espace cytoplasmique sont détournés et utilisés au profit du virus.

Ces résultats apportent des informations essentielles quant à la compréhension des mécanismes cellulaires employés par les bactériophages.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Par la suite, je m'intéresserai plus particulièrement à deux aspects.

V.1. La transition de réplication theta-sigma

La transition du mode de réplication theta vers sigma reste un mécanisme mal compris. L'étude à l'échelle cellulaire des protéines virales impliquées dans cette transition est nécessaire pour comprendre leur action dans cette transition. Les protéines gp34.1 et gp35 sont des acteurs majeurs de ce mécanisme. Leur action dans cette transition, leur temporalité de recrutement et leur abondance dans cette étape-clé de la réplication du phage seront décortiquées à l'échelle cellulaire. Pour comprendre comment elles agissent et se parlent entre elles, il serait utile d'avoir un double mutant *SPP1delX110lacO₆₄sus34.1sus35* pour étudier la séquence de leur intervention lors du passage de la réplication du mode theta au mode sigma. De plus, gp35 étant essentielle, nos premières études ont montré que son absence lors de l'infection affectait la forme du foyer de réplication de l'ADN viral. En effet, dans un mutant gp35⁻, le foyer de réplication a tendance à être dédoublé sans que l'on en connaisse la raison.

V.2. La structure du chromosome bactérien lors de l'infection virale

Nos études ont montré que lors de l'infection par le bactériophage SPP1, l'ADN du chromosome bactérien se trouvait décondensé. Des études de capture de conformation du chromosome ont été entreprises et les premiers résultats montrent que le chromosome de *B. subtilis* en condition d'infection avec le phage SPP1~~de~~*X110lacO₆₄* était ouvert. Des études avec différents mutants affectant soit la réplication de l'ADN du phage soit l'assemblage de la particule virale seront testés avec la même méthode pour comprendre la temporalité de cet événement et analyser quel est le mécanisme responsable de cette déstructuration. Les régions impactées par la décondensation seront aussi analysées pour comprendre si la structure de l'ADN est globalement affectée ou uniquement de manière localisée. En effet, l'étude des régions relâchées apporteront des informations quant aux protéines qui s'y lient et quant à la fonction des protéines qui agissent sur elles. Leur identification aidera dans la recherche du facteur viral incriminé.

Bibliographie

- Abhayawardhane Y & Stewart GC (1995) *Bacillus subtilis* Possesses a Second Determinant with Extensive Sequence Similarity to the *Escherichia coli* mreB Morphogene. *J. Bacteriol.* **177**: 765–773
- Abrescia NGA, Bamford DH, Grimes JM & Stuart DI (2012) Structure Unifies the Viral Universe. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 795–822
- Ackermann HW (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* **154**: 245–251
- Ackermann HW & Prangishvili D (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch. Virol.* **157**: 1843–1849
- Alenquer M, Vale-Costa S, Etibor TA, Ferreira F, Sousa AL & Amorim MJ (2019) Influenza A virus ribonucleoproteins form liquid organelles at endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Commun.* **10**: 1629–1648
- Almpanis A, Swain M, Gatherer D & McEwan N (2018) Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. *Microb. Genomics* **4**: 1–8
- Alonso JC, Tavares P, Lurz R & Trautner TA (2006) Bacteriophage SPP1. *Cal. (ed.), Bacteriophages, 2nd edn.* **1**: 331–349
- Auzat I, Dröge A, Weise F, Lurz R & Tavares P (2008) Origin and function of the two major tail proteins of bacteriophage SPP1. *Mol. Microbiol.* **70**: 557–569
- Auzat I, Petitpas I, Lurz R, Weise F & Tavares P (2014) A touch of glue to complete bacteriophage assembly: The tail-to-head joining protein (THJP) family. *Mol. Microbiol.* **91**: 1164–1178
- Ayora S, Carrasco B, Cárdenas PP, César CE, Cañas C, Yadav T, Marchisone C & Alonso JC (2011) Double-strand break repair in bacteria: A view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 1055–1081
- Ayora S, Missich R, Mesa P, Lurz R, Yang S, Egelman EH & Alonso JC (2002) Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J. Biol. Chem.* **277**: 35969–35979
- Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**: 235–241
- Bamford DH, Ravantti JJ, Ronnholm G, Laurinavicius S, Kukkaro P, Dyll-Smith M, Somerharju P, Kalkkinen N & Bamford JKH (2005) Constituents of SH1, a Novel Lipid-Containing Virus Infecting the Halophilic Euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *J. Virol.* **79**: 9097–9107
- Baptista C, Santos MA & 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
- Beattie TR & Reyes-Lamothe R (2015) A replisome's journey through the bacterial chromosome. *Front. Microbiol.* **6**: 1–12
- Becker B, de la Fuente N, Gassel M, Günther D, Tavares P, Lurz R, Trautner TA & Alonso JC (1997) Head morphogenesis genes of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J. Mol. Biol.* **268**: 822–839
- Bergh Ø, Børsheim KY, Bratbak G & Høldal M (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467–468
- Bertozzi Silva J, Storms Z & Sauvageau D (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol. Rev.* **363**: 1–11
- Blanco L, Gutierrez J, Lazaro JM, Bernad A & Salas M (1986) Replication of phage Φ 29 DNA in vitro: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res.* **14**: 4923–4937
- Blanco L, Prieto I, Gutiérrez J, Bernad A, Lázaro JM, Hermoso JM & Salas M (1987) Effect of NH_4^+ Ions on Φ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J. Virol.* **61**: 3983–91
- Blanco L & Salas M (1984) Characterization and purification of a phage Φ 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 5325–5329

- Boylan RJ, Mendelson NH, Brooks D & Young FE (1972) Regulation of the Bacterial Cell Wall : Analysis of a Mutant of *Bacillus subtilis* Defective in Biosynthesis of Teichoic Acid. *J. Bacteriol.* **110**: 281–290
- Bradley DE (1967) Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230–314
- Bravo A & Salas M (1997) Initiation of Bacteriophage ϕ 29 DNA Replication in Vivo : Assembly of a Membrane-associated Multiprotein Complex. *J. Mol. Biol.* **269**: 102–112
- Burger KJ (1980) Membrane binding of bacteriophage SPP1 DNA. *Mol. Gen. Genet.* **179**: 373–6
- Burger KJ & Trautner TA (1978) Specific labelling of replicating SPP1 DNA - Analysis of viral DNA synthesis and identification of phage dna-genes. *Mol. Gen. Genet.* **166**: 277–285
- Bürmann F & Gruber S (2015) SMC condensin: Promoting cohesion of replicon arms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**: 653–655
- Campbell A (2006) General Aspects of Lysogeny. *Cal. (ed.), Bacteriophages, 2nd edn.* **1**: 66–73
- Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A & Bru H (2003) Prophage Genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 238–276
- Catalão MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, São-José C & Pimentel M (2013) Diversity in bacterial lysis systems: Bacteriophages Show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 554–571
- Chai S, Bravo A, Lüder G, Nedlin A, Trautner TA & Alonsos JC (1992) Molecular Analysis of the *Bacillus subtilis* Bacteriophage SPP1 Region Encompassing Genes 1 to 6 SPP1 - The Products of Gene 1 and Gene 2 are Required for pac Cleavage. *J. Mol. Biol.* **224**: 87–102
- Chai S, Lurz R & Alonso JC (1995) The small subunit of the terminase enzyme of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 forms a specialized nucleoprotein complex with the packaging initiation region. *J. Mol. Biol.* **252**: 386–398
- Chaikeeratisak V, Nguyen K, Khanna K, Brilot AF, Erb ML, Coker JKC, Vavilina A, Newton GL, Buschauer R, Pogliano K, Villa E, Agard DA & Pogliano J (2017) Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria. *Science* **355**: 194–197
- Christie GE & Calendar R (2016) Bacteriophage P2. *Cal. (ed.), Bacteriophages, 2nd edn.* **6**: 1–9
- D'Herelle F (1917) On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Res Microbiol.* **158**: 553-554
- Dervyn E, Suski C, Daniel R, Bruand C, Chapuis J, Errington J, Janni  re L & Ehrlich SD (2001) Two Essential DNA Polymerases at the Bacterial Replication Fork. *Science* **294**: 1716–1719
- Diebold-Durand ML, Lee H, Ruiz Avila LB, Noh H, Shin HC, Im H, Bock FP, Bürmann F, Durand A, Basfeld A, Ham S, Basquin J, Oh BH & Gruber S (2017) Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Mol. Cell* **67**: 334–347
- Doan T, Marquis KA & Rudner DZ (2005) Subcellular localization of a sporulation membrane protein is achieved through a network of interactions along and across the septum. *Mol. Microbiol.* **55**: 1767–1781
- Dröge A, Santos MA, Stiege AC, Alonso JC, Lurz R, Trautner TA & Tavares P (2000) Shape and DNA packaging activity of bacteriophage SPP1 procapsid: protein components and interactions during assembly. *J. Mol. Biol.* **296**: 117–132
- Duggin IG, Matthews JM, Dixon NE, Wake RG & Mackay JP (2005) A complex mechanism determines polarity of DNA replication fork arrest by the replication terminator complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **280**: 13105–13113
- Dupressoir A, Vernochet C, Bawa O, Harper F, Pierron G, Opolon P & Heidmann T (2009) Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 12127–12132

- Edgar R, Rokney A, Feeney M, Semsey S, Kessel M, Goldberg MB, Adhya S & Oppenheim AB (2008) Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol. Microbiol.* **68**: 1107–1116
- Fernandes S & São-José C (2017) Probing the function of the two holin-like proteins of bacteriophage SPP1. *Virology* **500**: 184–189
- Galkin VE, Yu X, Bielnicki J, Ndjonka D, Bell CE & Egelman EH (2010) Cleavage of Bacteriophage λ cI Repressor Involves the RecA C- terminal Domain. *Biochemistry* **385**: 779–787
- Ganesan AT, Andersen JJ, Luh J, Effron M (1976) DNA Metabolism in *Bacillus subtilis* and Its Phage SPP1. *Microbiology* **1**: 319–325
- Ghosh K, Pal A & Chattopadhyaya R (2004) pH-dependent autocleavage of λ repressor occurs in the operator-bound form: characterization of λ repressor autocleavage. *Biochem. J.* **379**: 325–330
- Godinho LM, El Sadek Fadel M, Monniot C, Jakutyte L, Auzat I, Labarde A, Djacem K, Oliveira L, Carballido-Lopez R, Ayora S & Tavares P (2018) The Revisited Genome of *Bacillus subtilis* Bacteriophage SPP1. *Viruses* **10**: 1–28
- Golec P, Karczewska-Golec J, Loś M & Wegrzyn G (2014) Bacteriophage T4 can produce progeny virions in extremely slowly growing *Escherichia coli* host: Comparison of a mathematical model with the experimental data. *FEMS Microbiol. Lett.* **351**: 156–161
- González-Huici V, Lázaro JM, Salas M & Hermoso JM (2000) Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J. Biol. Chem.* **275**: 14678–14683
- Gordon GS, Sitnikov D, Webb CD, Teleman A, Straight A, Losick R, Murray AW & Wright A (1997) Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: Visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* **90**: 1113–1121
- Goulet A, Lai-Kee-Him J, Veasler D, Auzat I, Robin G, Shepherd DA, Ashcroft AE, Richard E, Lichière J, Tavares P, Cambillau C & Bron P (2011) The opening of the SPP1 bacteriophage tail, a prevalent mechanism in Gram-positive-infecting siphophages. *J. Biol. Chem.* **286**: 25397–25405
- Grippo P & Richardson CC (1971) Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Bacteriophage. *J. Biol. Chem.* **246**: 6867–6873
- Gruber S & Errington J (2009) Recruitment of Condensin to Replication Origin Regions by ParB/SpoOJ Promotes Chromosome Segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685–696
- Grundling A, Manson MD & Young R (2002) Holins kill without warning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 9348–9352
- Haima P, Bron S & Venema G (1987) The effect of restriction on shotgun cloning and plasmid stability in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Microbiol* **209**: 335–342
- Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580
- Haydon DJ, Stokes NR, Ure R, Collins I, Errington J & Czaplewski LG (2008) An Inhibitor of FtsZ with Potent and Selective anti-Staphylococcal Activity. *Science* **321**: 1673–1676
- Heinrich BS, Maliga Z, Stein DA, Hyman AA & Whelan SPJ (2018) Phase Transitions Drive the Formation of Vesicular Stomatitis Virus Replication Compartments. *MBio* **9**: 1–10
- Heller RC & Marians KJ (2006) Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* **439**: 557–562
- Henner DJ (1990) Inducible Expression of Regulatory Genes in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **185**: 223–228
- Hill TM, Henson JM & Kuempel PL (1987) The terminus region of the *Escherichia coli* chromosome contains two separate loci that exhibit polar inhibition of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 1754–1758
- Holguera I, Ballesteros-Plaza D, Munoz-Espin D & Salas M (2012) Disclosing the in vivo organization of a viral histone-like protein in *Bacillus subtilis* mediated by its capacity to recognize the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5723–5728

- Holmes VF & Cozzarelli NR (2000) Closing the ring : Links between SMC proteins and chromosome partitioning , condensation , and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 1322–1324
- Hoshino T, McKenzie T, Schmidt S, Tanaka T & Sueoka N (2006) Nucleotide sequence of *Bacillus subtilis* dnaB: a gene essential for DNA replication initiation and membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 653–657
- Huet A, Conway JF, Letellier L & Boulanger P (2010) In Vitro Assembly of the T=13 Procapsid of Bacteriophage T5 with Its Scaffolding Domain. *J. Virol.* **84**: 9350–9358
- Ikeda H & Tomizawa J (1968) Prophage P1, and extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**: 791-798
- Ioannou C, Schaeffer PM, Dixon NE & Soutanas P (2006) Helicase binding to DnaI exposes a cryptic DNA-binding site during helicase loading in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **34**: 5247–5258
- Ireton K, Gunther IV NW & Grossman AD (1994) spoIJ is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 5320–5329
- Ishigo-Oka D, Ogasawara N & Moriya S (2001) DnaD Protein of *Bacillus subtilis* interacts with DnaA, the Initiator Protein of Replication. *J. Bacteriol.* **183**: 2148–2150
- Isidro A, Henriques AO & Tavares P (2004a) The portal protein plays essential roles at different steps of the SPP1 DNA packaging process. *Virology* **322**: 253–263
- Isidro A, Santos MA, Henriques AO & Tavares P (2004b) The high-resolution functional map of bacteriophage SPP1 portal protein. *Mol. Microbiol.* **51**: 949–962
- Jacob F, Brenner S, Cuzin F (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **28**: 329-348
- Jakutyte L, Baptista C, São-José C, Daugelavičius 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
- Jameson KH & Wilkinson AJ (2017) Control of Initiation of DNA Replication in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Genes (Basel)*. **8**: 1–32
- Jern P & Coffin JM (2008) Effects of Retroviruses on Host Genome Function. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 709–732
- de Jong RN, van der Vliet PC & Brenkman AB (2013) Adenovirus DNA Replication: Protein Priming, Jumping Back and the Role of the DNA Binding Protein DBP. *Curr. Opin. Microbiol.* **272**: 187–211
- Keen E & Dantas G (2018) Close Encounters of Three Kinds : Bacteriophages , Commensal Bacteria , and Host Immunity. *Trends Microbiol.* **1582**: 1–12
- Kleine Borgmann LAK, Hummel H, Ulbrich MH & Graumann PL (2013) SMC condensation centers in *Bacillus subtilis* are dynamic structures. *J. Bacteriol.* **195**: 2136–2145
- Köhler P & Marahiel MA (1997) Association of the histone-like protein HBSu with the nucleoid of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**: 2060–2064
- Kraemer JA, Erb ML, Waddling CA, Montabana EA, Zehr EA, Wang H, Nguyen K, Pham DSL, Agard DA & Pogliano J (2012) A phage tubulin assembles dynamic filaments by a novel mechanism to center viral DNA within the host cell. *Cell* **149**: 1488–1499
- Kreuzer KN (2000) DNA replication in phage T4. *Science* **4**: 626–631
- Krishnamurthy SR, Janowski AB, Zhao G, Barouch D & Wang D (2016) Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. *PLOS Biol.* **14**: 1–17
- Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW & Bamford DH (2011) Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses : Dynamics within the Genomics Prokaryotic Virosphere. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1**: 610–635
- Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y & Blondel D (2009) Functional Characterization of Negri

- Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *J. Virol.* **83**: 7948–7958
- Lawrence JG, Hatfull GF & Hendrix RW (2002) Imbroglis of Viral Taxonomy : Genetic Exchange and Failings of Phenetic Approaches. *J. Bacteriol.* **184**: 4891–4905
- Lemon KP & Grossman AD (1998) Localization of Bacterial DNA Polymerase: Evidence for a Factory Model of Replication. *Science* **282**: 1516–1519
- Lemon KP & Grossman AD (2000) Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol. Cell* **6**: 1321–1330
- Letellier L, Plançon L, Bonhivers M & Boulanger P (1999) Phage DNA transport across membranes. *Res. Microbiol.* **150**: 499–505
- Lewis M (2005) The Lac Repressor. *C. R. Biol.* **328**: 521–548
- Lewis PJ & Marston AL (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**: 101–109
- Lhuillier S, Gallopin M, Gilquin B, Brasiles S, Lancelot N, Letellier G, Gilles M, Dethan G, Orlova E V., Couprie J, Tavares P & Zinn-Justin S (2009) Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 8507–8512
- Lopez-Garrido J, Ojkic N, Khanna K, Wagner FR, Villa E, Endres RG & Pogliano K (2018) Chromosome Translocation Inflates *Bacillus* Forespores and Impacts Cellular Morphology. *Cell* **172**: 758–770
- Mahmoudabadi G, Milo R & Phillips R (2017) The Energetic Cost of Building a Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 1–10
- Mallardo M, Schleich S & Krijnse Locker J (2001) Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol. Biol. Cell* **12**: 3875–91
- Marbouty M, Le Gall A, Cattoni DI, Cournac A, Koh A, Fiche JB, Mozziconacci J, Murray H, Koszul R & Nollmann M (2015) Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging. *Mol. Cell* **59**: 588–602
- Martínez-Jiménez MI, Mesa P & Alonso JC (2002) *Bacillus subtilis* τ subunit of DNA polymerase III interacts with bacteriophage SPP1 replicative DNA helicase G40P. *Nucleic Acids Res.* **30**: 5056–5064
- Mascarenhas J, Soppa J, Strunnikov A V & Graumann PL (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J.* **21**: 3108–3118
- Mcintosh PK, Dunker R, Mulder C & Brown NC (1978) DNA of *Bacillus subtilis* Bacteriophage SPP1 : Physical Mapping and Localization of the Origin of Replication. *J. Virol.* **28**: 865–876
- Meijer WJJ, Horcujadas JA & Salas M (2001) Φ 29 Family of Phages. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 261–287
- Meile JC, Wu LJ, Ehrlich SD, Errington J & Noirot P (2006) Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: Identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics* **6**: 2135–2146
- Missich R, Weise F, Chai S, Lurz R & Alonso JC (1997) The Replisome Organizer (G38P) of *Bacillus subtilis* Bacteriophage SPP1 Forms Specialized Nucleoprotein Complexes with two Discrete Distant Regions of the SPP1 Genome. *J. Mol. Biol.* **15**: 50–64
- Morelli G, Fisseau C, Behrens B, Trautner TA, Luh J, Ratcliff SW, Allison DP & Ganesan AT (1979) The genome of *B. subtilis* phage SPP1: The Topology of DNA molecules. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 153–164
- Moriya S, Kawai Y, Kaji S, Smith A, Harry EJ & Errington J (2009) Effects of *oriC* relocation on control of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **155**: 3070–3082
- Munoz-Espin D, Daniel R, Kawai Y & Carballido-Lopez R (2009) The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral

- DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 13347–13352
- Muñoz-Espín D, Daniel R, Kawai Y, Carballido-López R, Castilla-Llorente V, Errington J, Meijer WJJ & Salas M (2009) The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 13347–13352
- Muñoz-Espín D, Holguera I, Ballesteros-Plaza D, Carballido-Lopez R & Salas M (2010) Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 16548–16553
- Murakami S, Inuzuka N, Yamaguchi M, Yamaguchi K & Yoshikawa H (1976) Initiation of D N A Replication in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **108**: 683–704
- Mutsafi Y, Zauberman N, Sabanay I & Minsky A (2010) Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 5978–5982
- Nadal M, Mas PJ, Blanco AG, Arnan C, Sola M, Hart DJ & Coll M (2010) Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 16078–16083
- Negri A (1903) Contributo allo studio dell' eziologia della rabia. *Bol Soc Med Chir Pavia* **2**: 88-114
- Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK & Brown JC (2002) The UL6 Gene Product Forms the Portal for Entry of DNA into the Herpes Simplex Virus Capsid. *J. Virol.* **75**: 10923–10932
- Nikolic J, Le Bars R, Lama Z, Scrima N, Lagaudrière-Gesbert C, Gaudin Y & Blondel D (2017) Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat. Commun.* **8**: 1–12
- Norman JM, A. HS, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Wang D, Parkes M & Virgin HW (2009) Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* **19**: 6218–6221
- Novoa RR, Calderita G, Fontana J, Granzow H & Risco C (2005) Virus factories : associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* **97**: 147–172
- Oey JL, Strätling W & Knippers R (1971) A DNA Polymerase Induced by Bacteriophage T7. *Eur. J. Biochem.* **23**: 497–504
- Oh B, Moyer CL, Hendrix RW & Duda RL (2014) The delta domain of the HK97 major capsid protein is essential for assembly. *Virology* **1**: 171–178
- Okubo S & Yanagida T (1968) Isolation of a suppressible mutant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **95**: 1187–1188
- Oliveira L, Alonso JC & Tavares P (2005) A Defined in Vitro System for DNA Packaging by the Bacteriophage SPP1 : Insights into the Headful Packaging Mechanism. *J. Mol. Biol.* **353**: 529–539
- Oliveira L, Tavares P & Alonso JC (2013) Headful DNA packaging: Bacteriophage SPP1 as a model system. *Virus Res.* **173**: 247–259
- Paul D & Bartenschlager R (2015) Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. *Annu. Rev. Virol.* **2**: 289–310
- Pedré X, Weise F, Chai S, Lüder G & Alonso JC (1994) Analysis of Cis and Trans acting elements required for the initiation of DNA replication in the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J. Mol. Biol.* **236**: 1324–1340
- Peng X, Basta T, Häring M, Garrett RA & Prangishvili D (2007) Genome of the Acidianus bottle-shaped virus and insights into the replication and packaging mechanisms. *Virology* **364**: 237–243
- Peters JM, Colavin A, Shi H, Czarny TL, Larson MH, Wong S, Hawkins JS, Lu CHS, Koo BM, Marta E, Shiver AL, Whitehead EH, Weissman JS, Brown ED, Qi LS, Huang KC & Gross CA (2016) A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell* **165**: 1493–1506
- Lo Piano A, Martínez-Jiménez MI, Zecchi L & Ayora S (2011) Recombination-dependent concatemeric viral DNA replication. *Virus Res.* **160**: 1–14
- Pietila M, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM & Bamford DH (2014) Archaeal viruses and bacteriophages :

- comparisons and contrasts. *Trends Microbiol.* **22**: 334–344
- Plisson C, White HE, Auzat I, Zafarani A, São-José C, Lhuillier S, Tavares P & Orlova E V (2007) Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J.* **26**: 3720–3728
- Poh SL, el Khadali F, Berrier C, Lurz R, Melki R & Tavares P (2008) Oligomerization of the SPP1 Scaffolding Protein. *J. Mol. Biol.* **378**: 551–564
- Prasad VB & Schmid MF (2012) Principles of Virus Structural Organization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **726**: 17–47
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP & Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**: 1173–1183
- Rannou O, Le Chatelier E, Larson MA, Nouri H, Dalmais B, Loughton C, Jannière L & Soultanas P (2013) Functional interplay of DnaE polymerase, DnaG primase and DnaC helicase within a ternary complex, and primase to polymerase hand-off during lagging strand DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **41**: 5303–5320
- Rao VB & Feiss M (2015) Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses. *Annu. Rev. Virol.* **20**: 163–178
- Rascovan N, Duraisamy R & Desnues C (2016) Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**: 125–141
- Richter Ł, Janczuk-Richter M, Niedziółka-Jönsson J, Paczesny J & Holyst R (2018) Recent advances in bacteriophage- based methods for bacteria detection. *Drug Discov. Today* **23**: 448–455
- Riggs, Arthur D, Suzuki H & Bourgeois S (1970) lac Repressor-Operator Interaction. *J. Mol. Biol.* **48**: 67–83
- Risco C, de Castro IF, Sanz-Sánchez L, Narayan K, Grandinetti G & Subramaniam S (2014) Three-Dimensional Imaging of Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* **1**: 453–473
- Risco C, Rodriguez JR, López-Iglesias C, Carrascosa JL, Esteban M & Rodriguez D (2002) Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment Membranes and Vimentin Filaments Participate in Vaccinia Virus Assembly. *J. Virol.* **76**: 1839–1855
- Riva S, Polsinelli M & Falaschi A (1968) A new phage of *Bacillus subtilis* with infectious DNA having separable strands. *J. Mol. Biol.* **35**: 347–356
- Robinson A, Causer RJ & Dixon NE (2012) Architecture and Conservation of the Bacterial DNA Replication Machinery, an Underexploited Drug Target. *Curr. Drug Targets* **13**: 352–372
- Rocha C & Danchin A (2002) Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet.* **18**: 291–294
- Rokop ME, Auchtung JM & Grossman AD (2004) Control of DNA replication initiation by recruitment of an essential initiation protein to the membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **52**: 1757–1767
- Salas M (1991) Protein-Priming of DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 39–71
- Sanders GM, Dallmann HG & McHenry CS (2010) Reconstitution of the *B. subtilis* Replisome with 13 Proteins Including Two Distinct Replicases. *Mol. Cell* **37**: 273–281
- São-José C, Baptista C & Santos MA (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 MA & 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
- São-José C, de Frutos M, Raspaud E, Santos MA & Tavares P (2007) Pressure built by DNA packing inside virions: enough to drive DNA ejection in vitro, largely insufficient for delivery into the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **374**: 346–355

- Schmid M, Speiseder T, Dobner T & Gonzalez A (2014) DNA Virus Replication Compartments. *J. Virol.* **88**: 1404–1420
- Scholefield G, Errington J & Murray H (2012) Soj / ParA stalls DNA replication by inhibiting helix formation of the initiator protein DnaA. *EMBO J.* **31**: 1542–1555
- Seco EM & Ayora S (2017) Bacillus subtilis DNA polymerases, PolC and DnaE, are required for both leading and lagging strand synthesis in SPP1 origin-dependent DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **45**: 8302–8313
- Seco EM, Zinder JC, Manhart CM, Piano A Lo, Mc Henry CS & Ayora S (2013) Bacteriophage SPP1 DNA replication strategies promote viral and disable host replication in vitro. *Nucleic Acids Res.* **41**: 1711–1721
- Serna-Rico A, Salas M & Meijer WJJ (2002) The Bacillus subtilis phage ϕ 29 protein p16.7, involved in ϕ 29 DNA replication, is a membrane-localized single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 6733–6742
- Serrano-Heras G, Salas M & Bravo A (2003) In Vivo Assembly of Phage ϕ 29 Replication Protein p1 into Membrane-associated Multimeric Structures. *J. Biol. Chem.* **278**: 40771–40777
- Silhavy T, Kahne D & Walker S (2010) The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: 1–16
- Six EW & Klug CAC (1973) Bacteriophage P4: a satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* **51**: 327–344
- Smits WK, Goranov AI & Grossman AD (2010) Ordered association of helicase loader proteins with the Bacillus subtilis origin of replication in vivo. *Mol. Microbiol.* **75**: 452–461
- Soh YM, Bürmann F, Shin HC, Oda T, Jin KS, Toseland CP, Kim C, Lee H, Kim SJ, Kong MS, Durand-Diebold ML, Kim YG, Kim HM, Lee NK, Sato M, Oh BH & Gruber S (2015) Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Mol. Cell* **57**: 290–303
- Sullivan NL, Marquis KA & Rudner DZ (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS Organizes the Origin Region and Promotes Efficient Chromosome Segregation. *Cell* **137**: 697–707
- Suttle CA (2007) Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 801–812
- Tal A, Arbel-Goren R, Costantino N, Court DL & Stavans J (2014) Location of the unique integration site on an Escherichia coli chromosome by bacteriophage λ DNA in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 7308–7312
- Tavares P, Lurz R, Stiege A, Rückert B & Trautner TA (1996) Sequential headful packaging and fate of the cleaved DNA ends in bacteriophage SPP1. *J. Mol. Biol.* **264**: 954–67
- Tavares P, Santos MA, Lurz R, Morelli G, De Lencastre H & Trautner TA (1992) Identification of a gene in Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 determining the amount of packaged DNA. *J. Mol. Biol.* **225**: 81–92
- Thomas JA, Rolando MR, Carroll CA, Shen PS, David M, Weintraub ST, Serwer P & Hardies SC (2009) Characterization of Pseudomonas chlororaphis myovirus 201 ϕ 2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology* **376**: 330–338
- Timinskas & Balvoc M (2014) Comprehensive analysis of DNA polymerase III α subunits and their homologs in bacterial genomes. **42**: 1393–1413
- Trugnan G, Fontanges P, Delautier D & Ait-slimane T (2004) FRAP , FLIP , FRET , PRIM ... De nouvelles la vie en couleur ! *Med. Sci.* **20**: 1027–1034
- Twort FW (1914) An investigation on the Nature of the ultra-microscopic viruses. *Lancet* **1**: 1241–1243
- Tzipilevich E, Habusha M & Ben-Yehuda S (2017) Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell* **168**: 186–199
- Valero-Rello A, López-Sanz M, Quevedo-Olmos A, Sorokin A & Ayora S (2017) Molecular mechanisms that contribute to horizontal transfer of plasmids by the bacteriophage SPP1. *Front. Microbiol.* **8**: 1–13
- Velten M, McGovern S, Ehrlich SD, Noirot P & Polard P (2003) A Two-Protein Strategy for the Functional Loading of a Cellular Replicative DNA Helicase. *Mol. Cell* **11**: 1009–1020

- Vinga I, Baptista C, Auzat I, Petipas I, Lurz R, Tavares P, Santos MA & São-José C (2012) Role of bacteriophage SPP1 tail spike protein gp21 on host cell receptor binding and trigger of phage DNA ejection. *Mol. Microbiol.* **83**: 289–303
- Vinga I, Dröge A, Stiege AC, Lurz R, Santos MA, Daugelavičius R & Tavares P (2006) The minor capsid protein gp7 of bacteriophage SPP1 is required for efficient infection of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1609–1621
- Waldor MK & Mekalanos JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910–1914
- Wang G, Klein MG, Tokonzaba E, Zhang Y, Holden LG & Chen XS (2007) The structure of a DnaB-family replicative helicase and its interactions with primase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 94–100
- Wang JD, Rokop ME, Barker MM, Hanson NR & Grossman AD (2004) Multicopy plasmids affect replisome positioning in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**: 7084–7090
- Wang S, Furchtgott L, Huang KC & Shaevitz JW (2012) Helical insertion of peptidoglycan produces chiral ordering of the bacterial cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 595–604
- Watabe K & Junetsu I (1983) A novel DNA polymerase induced by *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *Nucleic Acids Res.* **11**: 8333–8342
- White HE, Sherman MB, Brasiles S, Jacquet E, Seavers P, Tavares P & Orlova E V (2012) Capsid Structure and Its Stability at the Late Stages of Bacteriophage SPP1 Assembly. *J. Virol.* **86**: 6768–6777
- Whitman WB, Coleman DC & Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6578–6583
- Yang C, Huang C, Li C, Tsay Y, Lee S & Chen CW (2002) The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replicating priming proteins. *Mol. Microbiol.* **43**: 297–305
- Yao S, Helinski DR & Toukdarian A (2007) Localization of the naturally occurring plasmid ColE1 at the cell pole. *J. Bacteriol.* **189**: 1946–1953
- Yasbin RE & Ledbetter M (1978) Isolation of a *Bacillus subtilis* 168 derivative sensitive to defective bacteriophage PBSX. *J. Virol.* **25**: 703–704
- Young R (2013) Phage lysis: Do we have the hole story yet? *Curr. Opin. Microbiol.* **16**: 379–390
- Yuan Y & Gao M (2017) Jumbo bacteriophages: An overview. *Front. Microbiol.* **8**: 1–9
- Yuen KC & Gerton JL (2018) Taking cohesin and condensin in context. *PLoS Genet.* **14**: 1–14
- Zairi M, Stiege AC, Nhiri N, Jacquet E & Tavares P (2014) The Collagen-like Protein gp12 is a Temperature-dependent Reversible Binder of SPP1 Viral Capsids. *J. Biol. Chem.* **289**: 27169–27181

Livre :

Cell Biology by the Numbers : Première édition. Ron Milo & Rob Phillips illustré par Nigel Orme. Edité par Garland Science Taylor & Francis Group

Title : Compartmentalization of bacteriophage SPP1 replication and assembly in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*

Key words : viral factories, compartmentalization, DNA replication, particle assembly, dynamics, video-microscopy

During the co-evolution of viruses and cells, viruses exploited numerous ways to hijack cell machineries for their optimal multiplication and dissemination. Phage infection is a major challenge to bacteria, exploiting extensively cellular biosynthetic resources and possibly re-organizing the cytoplasm space. The work in this thesis investigated the cellular impact of infection by SPP1, a well-characterized model tailed bacteriophage that infects the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

Viral DNA replication is initiated by early phage proteins whose activity culminates in loading of the SPP1 helicase gp40 at the melted phage origin of replication. The bacterial replisome is then massively recruited to the phage replication factory that is localized at a defined position of the cytoplasm. The interaction of gp40 with its two cellular partners DnaX and DnaG mediates most likely the hijacking of the *B. subtilis* replication machinery. More than 500 copies of the viral genome are synthesized within 30 minutes after initiation of infection, which is roughly the equivalent to five *B. subtilis* genomes. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) experiments showed that the viral DNA factory is highly dynamic, a behavior that depends on active DNA replication.

The concatemers resulting from DNA replication are the substrate for encapsidation of the SPP1 genome into preformed procapsids. Maturation of procapsids to infectious viral particles follows a defined pathway. The SPP1 scaffolding protein gp11, that occupies the interior of the procapsid before DNA packaging, and gp12, that binds to capsids during DNA packaging, were followed to dissect the steps of this process. Procapsids partially co-localize with DNA replication factories. After packaging the DNA-filled capsids fully segregate to spatially distinct warehouses where viral particles accumulate. Recruitment of SPP1 proteins to these compartments recapitulates the sequential order of their assembly to build the viral particle. The replication factory is most frequently flanked by two warehouses. Such pattern is also observed in very elongated cells where the viral compartments remain localized nearby each others and far from the bacterial poles. Immuno-electron microscopy of cryo-sections from infected cells highlights a complete remodelling of the bacterial cytoplasm dedicated to virus multiplication.

The assembly and dynamics of the SPP1 replication factory and virions warehouses were visualized during the complete phage infection cycle in microfluidics experiments. The viral compartments are well individualized in the cytoplasm both in terms of space and time. Although bacterial growth is retarded, cells continue to elongate and to divide during SPP1 infection. Structuration of viral factories appears as a very efficient way for SPP1 to exploit bacterial resources and cytoplasmic space to optimize its multiplication. This strategy might be widely used by phages for remodelling the bacterial cell.

Titre : Compartimentation du cycle viral du bactériophage SPP1 dans le cytoplasme de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis*.

Mots clés : usines virales, compartimentation du cycle viral, réplication de l'ADN, assemblage de la particule virale, dynamique, vidéo-microscopie

Les virus bactériens (bactériophages), durant leur co-évolution avec les bactéries, ont su trouver de nombreuses voies pour détourner les machineries cellulaires dans le but de se multiplier efficacement. L'infection par le phage dès son entrée dans le cytoplasme est un bouleversement pour la bactérie en termes de ressources monopolisées à ses dépens et probablement de restructuration de l'espace cytoplasmique. Dans ce travail de thèse, l'impact de l'infection de la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis* par le bactériophage SPP1 a été étudié.

La réplication de l'ADN est initiée par des protéines précoces virales. Elle mène au chargement de l'hélicase virale gp40 sur l'origine de réplication de SPP1 dont les brins d'ADN ont été ouverts par la protéine de liaison à l'origine, gp38. Le réplisome bactérien est ensuite recruté de manière massive au sein de l'usine de réplication formant un foyer défini dans le cytoplasme bactérien. L'interaction de gp40 avec les protéines cellulaires DnaX et DnaG assure fort probablement le recrutement du complexe cellulaire au foyer de réplication. La quantité d'ADN viral synthétisée représente presque 500 copies d'ADN viral par bactérie après 30 minutes d'infection, ce qui est équivalent à la taille de 5 génomes de *B. subtilis*. Des études de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) montrent que l'usine de réplication est très dynamique. Ce comportement est inhibé par la présence de HPUra montrant qu'il dépend de la présence d'un réplisome actif.

Les concatémères résultant de la réplication de l'ADN viral sont le substrat pour l'encapsidation du génome de SPP1 dans des procapsides préformées. La maturation de ces procapsides en particules virales infectieuses suit une voie d'assemblage spécifique. Deux protéines rapportrices de différentes étapes de cette voie ont été suivies : la protéine d'échafaudage gp11, présente à l'intérieur de la procapside avant encapsidation de l'ADN, et la protéine auxiliaire gp12, qui se fixe à la surface de la capsid pendant l'encapsidation. Les procapsides colocalisent partiellement avec l'usine de réplication du génome viral. Après encapsidation de l'ADN, les capsides vont s'accumuler dans des foyers de stockage qui ont une localisation indépendante du foyer de réplication. Cette organisation est également observée dans des bactéries très allongées où deux régions de stockage sont retrouvées situées de part et d'autre de l'usine de réplication mais éloignées des pôles cellulaires. La microscopie électronique combinée à des immuno-marquages révèlent que cette compartimentation corrèle avec une réorganisation majeure de l'ultrastructure du cytoplasme bactérien.

L'assemblage et la dynamique des foyers viraux dans la bactérie ont été suivis pendant toute la durée du cycle viral dans un système de microfluidique. Elle montre que les étapes de réplication de l'ADN viral et la formation de la particule du phage sont des processus compartimentés dans le cytoplasme de la bactérie tant spatialement que temporellement. Bien que la croissance cellulaire soit retardée, les bactéries continuent de s'allonger et de se diviser pendant l'infection par SPP1. Le virus exploite donc de manière efficace les machineries cellulaires et l'architecture de la bactérie pour une multiplication optimale. Ces stratégies sont probablement utilisées par de nombreux phages pour remodeler la cellule bactérienne à leur avantage.