



HAL
open science

Etude de l'établissement de novo de l'organisation cellulaire chez *Vibrio cholerae*

Anthony Goudin

► **To cite this version:**

Anthony Goudin. Etude de l'établissement de novo de l'organisation cellulaire chez *Vibrio cholerae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL008 . tel-04099402

HAL Id: tel-04099402

<https://theses.hal.science/tel-04099402>

Submitted on 16 May 2023

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

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

Etude de l'établissement *de novo*
de l'organisation cellulaire
chez *Vibrio cholerae*

Study of the *de novo* cellular organisation of *Vibrio cholerae*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire

Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institut de Biologie Intégrative**

de la Cellule (Université Paris-Saclay, CNRS, CEA) sous la direction de

François-Xavier BARRE, DR, le co-encadrement de **Elisa GALLI**, CR

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 22 février 2023, par

Anthony GOUDIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Stéphanie BURY-MONE

Professeure, HDR, Université Paris-Saclay

Présidente

Marie-Eve KENNEDY-VAL

CR, HDR, Institut Pasteur

Rapportrice & Examinatrice

Romain MERCIER

CR, HDR, LCB, CNRS, Université Aix-Marseille

Rapporteur & Examineur

Philippe BOULOC

DR, HDR, I2BC, Université Paris-Saclay

Examineur

Titre : Etude de l'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire chez *Vibrio cholerae*

Mots clés : Organisation cellulaire, paroi bactérienne, sphéroplaste

Résumé : *Vibrio cholerae* est un bacille à Gram négatif. C'est l'agent pathogène du choléra. Il est responsable de plus de 100 000 morts par an, ce qui a motivé son étude. Les premières observations de *V. cholerae* ont montré qu'il avait la forme de bâtonnet incurvée avec un flagelle à une extrémité. Il a par la suite montré que le positionnement du flagelle à une seule extrémité était lié à la polarisation de l'organisation cellulaire du vibrion. Les études de facteurs impliqués dans cette polarisation suggèrent que l'organisation cellulaire des bactéries nouvellement formées découle de celle de leur « mère ». L'objectif de ma thèse était de comprendre si et comment l'organisation cellulaire du vibrion peut être établie *de novo* chez *V. cholerae*. Pour cela, il me fallait dans un premier temps trouver des situations dans lesquelles l'organisation cellulaire était perdue. Deux états non prolifératifs réversibles sont décrits chez *V. cholerae* : le premier est la phase stationnaire dans laquelle la bactérie entre lorsqu'elle manque de nutriments. Le second état non prolifératif intervient lorsque la bactérie est soumise à certains stress comme le traitement aux antibiotiques ou l'exposition à des températures froides. Ce second état est associé à une perte de la forme en bâtonnet et de la paroi cellulaire : les bactéries adoptent une forme sphérique. On parle de sphéroplast. J'ai établi l'organisation cellulaire de ces deux états via des techniques de séquençage massif et de microscopie à fluorescence et j'ai étudié le profil répliatif des cellules, la localisation précise de facteurs impliqués dans la polarité, la ségrégation des chromosomes ainsi que la division cellulaire. J'ai observé une modification notable de l'organisation cellulaire des sphéroplast. Ces cellules présentent un plus grand nombre de copie du génome, un désassemblage de la machinerie de division ainsi qu'une inactivité de certains acteurs de la polarité et de la ségrégation. J'ai profité pour mes études de la découverte que la présence du L-arabinose (L-ara) dans le milieu de culture induit la transformation des cellules de *V. cholerae* en sphéroplast. Un avantage de cette méthode est que les cellules repartent facilement en prolifération quand le L-ara est enlevé, ce qui nous a permis d'étudier le rétablissement *de novo* de l'organisation cellulaire par vidéo microscopie. J'ai observé que ce rétablissement suit invariablement différentes étapes de manière chronologique. Mes observations m'ont permis de décrire la dynamique de facteurs organisationnels aux différentes étapes du processus. Ainsi, j'ai observé que la réplication reprend dès les premières étapes, accompagnée par une forte activité des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne. Puis la cellule commence une transition morphologique, la sphère s'allonge et forme des branches dans lesquelles les génomes sont présents. On peut noter durant ces étapes l'activité de la protéine de polarité HubP, responsable de la bonne localisation des chromosomes. Enfin ces branches subissent des événements de division permettant le retour de la forme en bâtonnet initiale de la bactérie. Une fois la chronologie des acteurs établie, une stratégie systématique basée sur la comparaison du contenu d'une banque de mutant avant et après retour n'a pas permis de mettre en évidence des candidats essentiels au retour. Finalement, les candidats essentiels comme la protéine de division FtsZ ou encore des acteurs impliqués dans la synthèse de la paroi (PBPs, MreB) ont pu être testés en utilisant des inhibiteurs spécifiques ou via des allèles thermosensibles. Seule l'altération du bon fonctionnement et positionnement des machineries de synthèse de la paroi est en mesure d'empêcher le retour à une forme proliférative, montrant l'importance capitale de cette structure pour le rétablissement *de novo* de la forme en bâtonnet et de l'organisation cellulaire de *V. cholerae*.

Summary

Title : Study of the *de novo* cellular organisation of *Vibrio cholerae*

Keywords : Cellular organisation, cell wall, spheroplast

Abstract : *Vibrio cholerae* is a gram-negative bacillus. It is the pathogenic agent of cholera and responsible for more than 100,000 deaths per year, which motivated its study. The first observations of *V. cholerae* showed that it had a curved rod shape with a flagellum at one end. It was later showed that the positioning of the flagellum at one end was related to the polarization of the intracellular organisation of the vibrio cell. Studies of factors involved in this polarization suggest that the intracellular organisation of newly formed bacteria is derived from their mother. The objective of my thesis was to understand if and how the intracellular organization of the vibrio cell can be established *de novo* in *V. cholerae*. To do this, I first had to find situations in which cellular organisation was lost. Two reversible non-proliferative states are described in *V. cholerae*: the first is the stationary phase in which the bacterium enters when it lacks nutrients. The second non-proliferative state occurs when the bacterium is subjected to certain stresses such as treatment with antibiotics or exposure to cold temperatures. This second state is associated with a loss of the rod shape and the cell wall: the bacteria adopt a spherical shape. We speak of spheroplasts. I established the cellular organisation of these two states via massive sequencing and fluorescence microscopy techniques, and studied the replicative profile of the cells, the precise localization of factors involved in polarity, chromosome segregation and cell division. The cells in stationary phase were found to retain the organisation of growing cells, despite the absence of division. On the contrary, I observed a notable modification of the cellular organisation of the spheroplasts. These cells show an increased number of genome copies, a disassembly of the division machinery and an inactivity of some polarity and segregation actors.

I took advantage of the discovery that the presence of L-arabinose (L-ara) in the culture medium induces the transformation of *V. cholerae* cells into spheroplasts. An advantage of this method is that cells readily resume proliferation when L-ara is removed, allowing us to study the *de novo* recovery of cellular organisation by video microscopy. I observed that this recovery invariably follows different steps in a chronological manner. My observations allowed me to describe the dynamics of organisational factors at different stages of the process. Thus, I observed that replication resumes from the first steps, accompanied by a strong activity of proteins involved in the synthesis of the bacterial cell wall. Then the cell begins a morphological transition, the sphere lengthens and forms branches in which the genomes are present. During these stages, the activity of the polarity protein HubP, responsible for the correct localization of the chromosomes, can be noted. Finally, these branches undergo division events allowing the return of the initial rod shape of the bacterium.

Once the chronology of the actors was established, we tried to determine if genetic modifications could alter this process. No mutations for various known non-essential candidates involved in maintaining cell organisation, such as the HubP protein, prevented successful recovery. A more systematic strategy based on comparing the contents of a mutant library before and after return also failed to reveal any new candidates. Finally, essential candidates such as the division protein FtsZ or actors involved in wall synthesis (PBPs, MreB) could be tested using specific inhibitors or via heat-sensitive alleles. Only the alteration of the proper functioning and positioning of the wall synthesis machinery is able to prevent the return to a proliferative form, showing the crucial importance of this structure for the *de novo* re-establishment of the rod shape and the intracellular organization of *V. cholerae*.

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier François-Xavier Barre qui m'a permis de rejoindre son équipe pour mon stage de M2, puis de poursuivre vers ma thèse qui représente beaucoup pour moi.

Elisa je tenais à te remercier d'être venue donner cette présentation à l'INRA, je sais que notre promo a vraiment été stupide de ne pas sauter sur le projet d'Elena ! Mais finalement cette situation m'a permis de travailler avec toi sur ton projet qui m'a fait littéralement tourner en rond ! Ce fut vraiment un plaisir avec toi, finalement je n'aurai pas appris l'italien.... J'espère que cette expérience avec ton premier thésard ne t'aura pas dégouté ... tu verras tu regretteras mes blagues !

Christophe.... Que dis-je MESSIRE ! Ta présence et ton soutien ont été plus qu'essentiel au bon déroulement de ma thèse. Je n'oublierai jamais tout ce que nous avons partagé ensemble, des discussions sérieuses sur mon projet, à nous deux sur une scène en train de jouer de la guitare devant un publique nous demandant « PUTIN mais quesqu'on fou la !!!!!???? ». Et crois-moi ce n'est pas fini !

Merci à tous les membres présents et passés de l'équipe, Evelyne pour tous tes conseils à la fois techniques mais aussi ta sagesse de vie en général. Jihane, j'ai eu la chance de ne pas être seul durant ce périple, merci d'avoir été un soutien moral, d'avoir été la en toute circonstance, nos pauses thé me manque.... Sol channnnnnn, Elena, Yoshi, James, merci pour votre patience et surtout nos discussions j'ai tellement appris grâce à vous.

Je tenais enfin à remercier tous mes amis d'avoir et d'être toujours là pour moi, de me suivre dans mes conneries toujours plus stupides ! Ru depuis 15 ans maintenant.... Caro deb le lycée me paraît si loin et si proche à la fois. Flo Je n'aurai jamais cru pouvoir faire une rencontre comme la notre à la fac, on ne s'est pas lâché depuis ce jour devant l'amphi henry cartan ! c'était le début de jackson, merci pour tout frangin n'oublie pas ... Pour la thèse ! Gab j'ai toujours été impressionné par ta force de caractère et que tu saches où tu veux aller en toutes circonstances, et 8 ans plus tard tu n'as pas changé ! Vivement le centre de Viro aux states ! Adri merci pour tout tes conseils au hand, et pour ce que l'on partage aujourd'hui. Merci au briseur de côte que je n'oublierai jamais ! Nico FUGOOOOO

Enfin je tenais à ne pas remercier mon microscope qui s'est battu et qui à tout fais pour me pourrir la vie, mais après de nombreuses galères et nuit blanches.... J'ai gagné.

Table des matières

Préambule	8
Introduction	9
1. Le cycle de vie bactérien	9
1.1 La diversité bactérienne.....	9
1.1.1 Diversité morphologique.....	9
1.1.2 Classification.....	10
1.2 Bactéries et environnement.....	11
1.3 Vivre et survivre.....	13
1.3.1 Conditions favorables.....	13
1.3.2 En absence de nutriments.....	18
2. L'organisation intracellulaire de la phase exponentielle	20
2.1 Organisation du génome et réplication.....	20
2.2 Ségrégation des génomes chez <i>V. cholerae</i>	22
2.3. Membrane, paroi et élongasome.....	25
2.3.1 Bactéries Gram positives et Gram négatives.....	25
2.3.2 Le Peptidoglycane chez les bactéries Gram négatives.....	26
2.3.3 Synthèse du PG : Renouvellement/Elongation/Division.....	28
3. Adaptation et stratégie de survie	36
3.1 Le biofilm.....	36
3.2. Persistance, VBNC et dormance.....	38
3.2.1 Persistance.....	38
3.2.2 Un état viable mais non cultivable (VBNC).....	39
3.2.3 Dormance et sporulation.....	41
3.3. Résistance par perte de la paroi.....	44
3.3.1 Sphéroplastes.....	45
3.3.2 L-formes.....	46
Résultats	48
Chapitre 1 : Le L-Arabinose induit la sphéroplastisation réversible de <i>V. cholerae</i> due à un catabolisme illégitime toxique	48
1.1. Le L-Ara provoque l'arrêt de la prolifération et la perte de la forme de <i>V. cholerae</i>	
1.1.1 Effet du L-Ara sur la croissance et la forme de <i>V. cholerae</i>	48
1.1.2 Effet d'autres sucres sur la croissance de <i>V. cholerae</i>	51
1.1.3 Effet du L-Ara sur la croissance d'autres souches de <i>V. cholerae</i>	52
1.2 Cinétique de la transition morphologique de <i>V. cholerae</i> provoquée par le L-Ara & viabilité des cellules sphériques.....	52
1.3 La transition morphologique induite par le L-Ara est causée par une dégradation du peptidoglycane : Sphéroplastisation.....	56
1.4 <i>V. cholerae</i> semble cataboliser le L-Ara par une voie illégitime toxique.....	58

1.5 Le L-Ara provoque la modification du transcriptome dont la répression de <i>glmS</i> , essentiel à la synthèse du peptidoglycane.....	65
1.5.1 Modification du transcriptome.....	65
1.5.2 L'absence de <i>glmS</i> conduit à la sphéroplastisation mais pas à l'arrêt de la croissance.....	71

Chapitre 2 : Organisation cellulaire des sphéroplastes induits par le L-Ara....73

2.1 Contenu génétique des cellules non prolifératives : sphéroplaste et phase stationnaire.....	75
2.2. Caractérisation de l'organisation intracellulaire des cellules non prolifératives : sphéroplaste et phase stationnaire.....	78
2.2.1 Perte de l'intégrité de la paroi.....	78
2.2.2 Organisation du génome.....	80
2.2.3 Machinerie de division.....	81

Chapitre 3 : Etablissement *de novo* de la forme proliférative après sphéroplastisation induite au L-Ara.....84

3.1 Le processus de rétablissement prolifératif suit une succession d'étapes.....	85
3.2. Chorégraphie au cours de la réversion des éléments-clefs connus pour le maintien de l'organisation.....	86
3.2.1 Contenu génomique au cours du rétablissement prolifératif.....	87
3.2.2 Gestion du périplasme durant le processus.....	87
3.2.3 Localisation du nucléoïde.....	87
3.2.4 CrvA, périplasme et forme incurvée.....	89
3.2.5 Polarité et ségrégation des chromosomes.....	89
3.2.6 Division.....	91
3.2.7 Paroi cellulaire.....	92

Chapitre 4 : Recherche des acteurs de l'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire (acteurs « *de novo* »).....94

4.1 Recherche systématique des acteurs « <i>de novo</i> » par analyse Tn-Seq post L-Ara : composition d'une banque de mutants transpositionnels après rétablissement post-traitement L-Ara.....	94
4.2. Approche par gènes candidats : Impact sur l'établissement « <i>de novo</i> » de l'inactivation d'acteurs de la maintenance de l'organisation cellulaire.....	96
4.2.1 Acteurs de l'élongation.....	97
4.2.2 Acteurs du maintien de la forme en bâtonnet.....	99
4.2.3 Acteurs de la division.....	102

Discussion et Perspectives.....106

Matériel et Méthodes.....111

Annexes.....117

Bibliographie.....155

Index

M9-MM = M9 milieu minimum

LB = Luria-Bertani

rpm = rotations par minutes

DMSO = Diméthylsulfoxyde

L-Ara = L-Arabinose

Phase Stat = phase stationnaire

Phase Exp = phase exponentielle

FROS = Fluorescence Repressor Operator System

CAA = Casamino Acids

MFA = Analyse des Fréquences de Marqueurs

CFU = Colony Forming Unit

VBNC = Viable mais non cultivable

Peptidoglycane = PG

Préambule

Au laboratoire, nous sommes intéressés par l'organisation cellulaire bactérienne, ce qui a mené l'équipe à travailler avec la bactérie *V. cholerae*. Un constat est que l'organisation cellulaire est héritée de la cellule mère. Cependant, différents stress qui peuvent être rencontrés dans la nature provoquent la perte de cette organisation de manière transitoire permettant alors la survie. Nous nous sommes demandé comment est établi *de novo* l'organisation cellulaire. Pour le savoir, il fallait tout d'abord avoir un système expérimental efficace pour observer ce rétablissement prolifératif.

J'ai donc analysé l'effet toxique réversible du L-Ara sur *V. cholerae* (Chapitre 1). En analysant la modification de la localisation d'éléments organisationnels diagnostiques, j'ai pu affirmer que le L-Ara conduit à une perte très sévère de l'organisation cellulaire (Chapitre 2). J'ai ensuite décrit le processus de rétablissement prolifératif en suivant par vidéo microscopie différents éléments organisationnels (Chapitre 3).

Finalement, j'ai recherché les éléments impliqués dans ce processus et pu mettre en évidence l'implication importante de l'élongasome qui apparait détenir la clef de l'organisation cellulaire (Chapitre 4).

Introduction

1. Le cycle de vie bactérien

1.1. La diversité bactérienne

Les bactéries ont très longtemps été résumées à de simples sacs cellulaires responsables de nombreuses pathologies humaines. Cependant, depuis une cinquantaine d'années, l'étude de ces organismes a permis de mettre en valeur l'immense diversité couplée à une forte adaptabilité de ce domaine de la vie. Il est estimé que seulement 1% des bactéries vivant sur la planète sont cultivables dans des conditions de laboratoire (Amann et al., 1995; Vartoukian et al., 2010). Ce chiffre frappant a tout d'abord pu être estimé par comparaison entre des observations microscopiques et des cultures sur boîtes d'un même échantillon. Il a ensuite pu être confirmé grâce à l'arrivée du séquençage massif (Roesch et al., 2007; Sogin et al., 2006). Cet écart entre le nombre de bactérie cultivable en laboratoire et la diversité bactérienne réelle est dû à nos milieux et conditions de cultures synthétiques, souvent incapables de reproduire l'environnement originel des espèces bactériennes. La diversité bactérienne commence donc à être considérée mais surtout caractérisée.

1.1.1 Diversité morphologique

Grâce à cet intérêt croissant, la diversité bactérienne est étudiée à de nombreuses échelles. L'une d'entre elles est la diversité morphologique de ces espèces. En effet, les bactéries sont connues pour pouvoir adopter de très nombreuses formes dont les plus connues sont la forme en bâtonnet comme les bactéries *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* et la forme sphérique (également appelées coque ou Coccus) comme la famille des Staphylocoques comprenant la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*. Cependant, il existe de nombreux autres types de bactéries présentant des formes très différentes (Margolin, 2009; Typas et al., 2011). Certaines peuvent présenter une courbure dans forme classique de bâtonnet comme *Caulobacter crescentus* ou le pathogène intestinal humain *Vibrio cholerae*. D'autres peuvent également présenter une forme de spirale comme la bactérie *Helicobacter pylori* ou encore les espèces appartenant à la famille des Spirochetes.

Un résumé de ces formes est présenté en [figure 1](#). De nombreuses théories ont été avancées pour tenter d'expliquer la diversité morphologique de ces organismes. La première est l'adaptation à l'environnement (Young, 2007). Ainsi, certaines cyanobactéries vivant dans un environnement marin auraient privilégié, au cours du temps, une forme sphérique leur permettant de moins faire face aux courants marins et réduisant les potentiels contacts avec des bactériophages ou prédateurs (Smith et al., 2017; Yulo and Hendrickson, 2019). Les morphologies peuvent également être adaptées pour la pathogénicité, comme pour la forme spiralée de *H. pylori* lui conférant un avantage pour pénétrer le mucus de l'estomac humain (Andersen, 2007; Denic et al., 2020).

Figure 1 : Morphologies bactériennes

Species	Shape
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Francisella tularensis</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Bordetella pertussis</i>	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Rickettsia typhi</i>	

<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	
<i>Anabaena variabilis</i>	

Tableau récapitulatif des morphologies bactériennes les plus fréquentes associées à un exemple d'espèce représentatif. Figure adaptée de Margolin et al, 2009

1.1.2 Classification

Avant l'apparition du séquençage massif, il existait de nombreuses classifications des espèces bactériennes. Celles-ci pouvaient être basées sur de nombreux critères, la morphologie comme discuté précédemment, la couleur des colonies sur boîte de culture, leurs conditions de cultures ou encore la capacité à retenir les colorants avec le très connu test de Gram. Ces classifications étaient, cependant, trop imprécises et très souvent éloignées

de la réalité évolutive. La famille des Actinobactérie à laquelle appartient, par exemple, les Streptomyces possédant une morphologie très proche des mycélium des champignons a ainsi pendant très longtemps été classée parmi les champignons alors qu'il s'agit en réalité de bactéries (Barka et al., 2016).

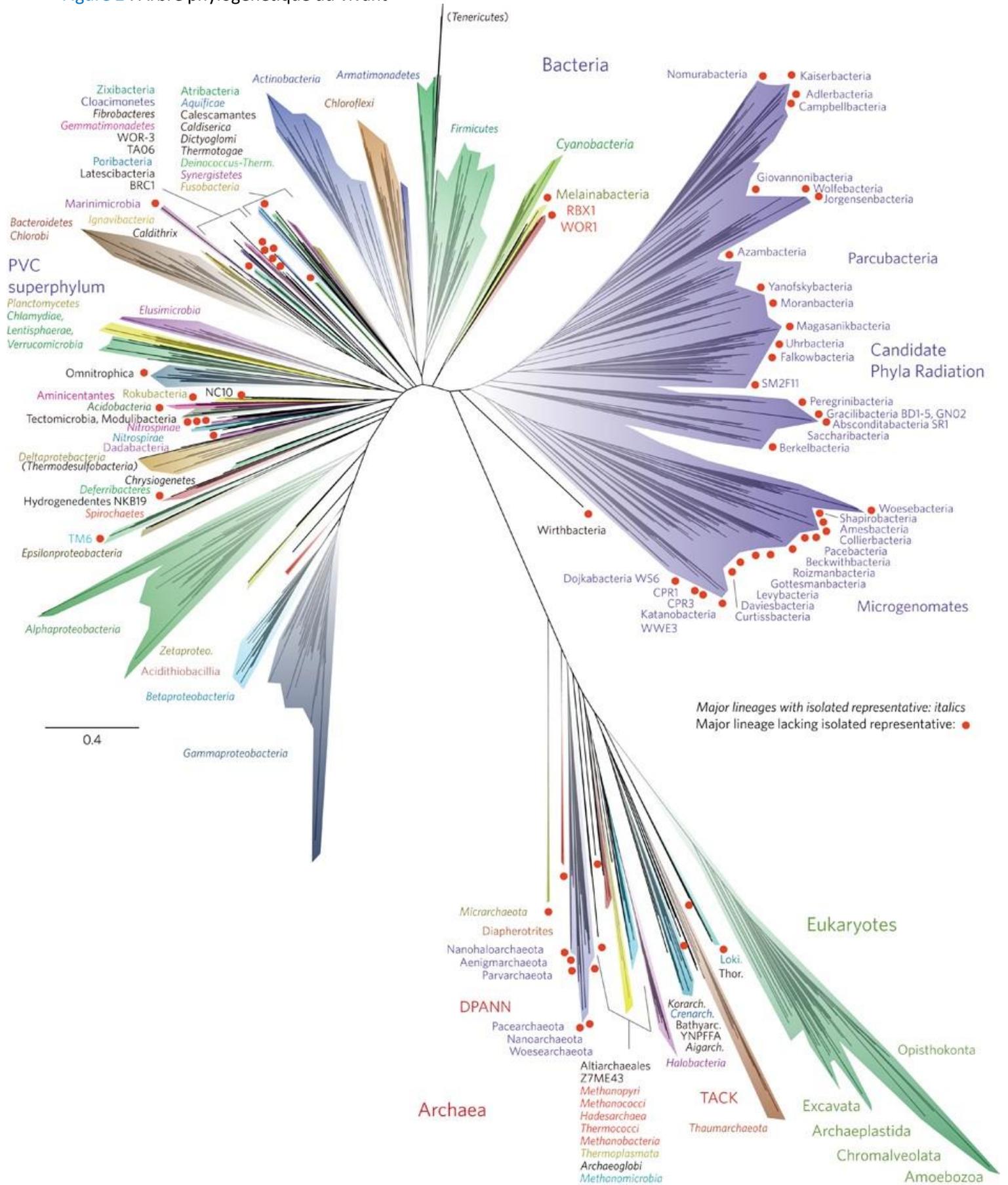
L'arrivée du séquençage a ainsi permis une véritable révolution apportant un outil efficace et rapide de comparaison de séquence. Permettant la création de l'arbre phylogénétique du vivant que l'on connaît aujourd'hui (révisé dans l'article de Hug et al., 2016) (Figure 2). Initialement, la phylogénie bactérienne a été établie sur l'analyse des ARN 16S, constituant majeur des ribosomes bactériens. Comme on peut le voir, l'arbre bactérien est bien plus étoffé que l'arbre des eucaryotes ou des archées reflétant la plus forte diversité des bactéries.

Les nouvelles technologies de séquençage ont été essentielles pour la caractérisation et la classification des espèces bactériennes. En effet, ces techniques ont permis de résoudre le problème des espèces non-cultivables en laboratoire. La métagénomique autorise l'identification et l'analyse de séquence génomique de toute espèce vivante dans un écosystème donné (sable, terre, eau, etc...) sans nécessiter la culture en laboratoire. Les échantillons sont prélevés, purifiés et puis directement séquencés. Les génomes reconstruits bio-informatiquement par la suite peuvent être analysés et classifiés dans l'arbre du vivant ce qui a grandement aidé dans la caractérisation de la diversité bactérienne, et à plus grande échelle dans la diversité du vivant (Parks et al., 2017).

1.2. Bactéries et environnement

Cette grande diversité bactérienne reflète leur grande capacité d'adaptation. Les bactéries, ont été capables de coloniser l'intégralité de notre planète. Nous avons ainsi pu les retrouver quasiment partout sur Terre, dans les océans, dans les déserts et parfois même dans les nuages (Rampelotto, 2013; Shinn et al., 2003). On retrouve notamment la famille des cyanobactéries de l'antarctique aux forêts tropicales (Rampelotto, 2013; Sayed et al., 2020). Il a été montré que les tempêtes de sables pouvaient projeter de nombreuses bactéries dans l'atmosphère, leur permettant de se déplacer via les masses d'air et les nuages avant de retomber parfois des milliers de kilomètres plus loin grâce à la pluie et ce de manière viable.

Figure 2 : Arbre phylogénétique du vivant



Arbre phylogénétique du vivant basé sur l'étude de séquences ribosomales (Hug et al., 2016).

Parmi les genres retrouvés dans les déserts, on peut noter des familles comme *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus* ou encore des *Actinobactéries* (Griffin, 2007; Sayed et al., 2020).

Parmi les procaryotes, les archées sont les championnes dans le domaine des résistances aux environnements extrêmes. L'archée *Methanopyrus kandleri* détient par exemple le record de croissance à haute température avec 122°C (Rampelotto, 2013). Les bactéries ne sont en reste dans ce domaine, et les espèces associées à une résistance à un environnement (« extrême ») car empêchant la vie d'organismes « classiques » sont appelées extrémophiles. On distingue, par exemple, les espèces hyperthermophiles capables de supporter de fortes températures, les acidophiles résistantes à un environnement acide, les xérophiles survivants dans un environnement pauvre en eau comme dans les déserts.

1.3. Vivre et survivre

1.3.1 Lorsque les conditions sont favorables

Avant d'étudier les diverses adaptations bactériennes à leur environnement, il nous faut tout d'abord aborder la vie classique de ces organismes. La diversité de ce groupe étant extrême, il existe toujours des exceptions. Nous décrivons ici le comportement de la majorité d'espèces, ou bien nous préciserons si il s'agit d'exemples particuliers. Lorsque les bactéries sont dans une situation environnementale favorable (nutriments en quantité suffisante, température apte au développement, pH adapté à la vie de l'espèce, absence de prédation, ect...) la bactérie est alors en phase proliférative appelée phase exponentielle (exp).

Durant cette phase exponentielle, les bactéries importent dans le cytoplasme les différents nutriments nécessaires à leur vie (source de carbone, d'azote, d'ions) via de nombreux transporteurs. Ces transporteurs sont de nature et structure très variées. Ils peuvent, en effet, agir de façon passive comme des porines qui laissent entrer de manière passive certaines molécules ou ions ou bien de façon active en consommant de l'énergie (ATP ou GTP) comme certains systèmes de transports ABC (ATP Binding Cassette). Ces structures peuvent être retrouvées dans la membrane externe et interne des bactéries à Gram négatif ou dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif (Jeckelmann and Erni, 2020; Masi et al., 2019). Ces transporteurs, présents en très grande quantité, permettent l'import

et l'export de nombreuses molécules. A titre exemple, les transporteurs impliqués dans l'import et l'export des sucres (sources de carbone) sont présentés en [figure 3](#).

Figure 3 : Systèmes d'import de sucre chez les bactéries

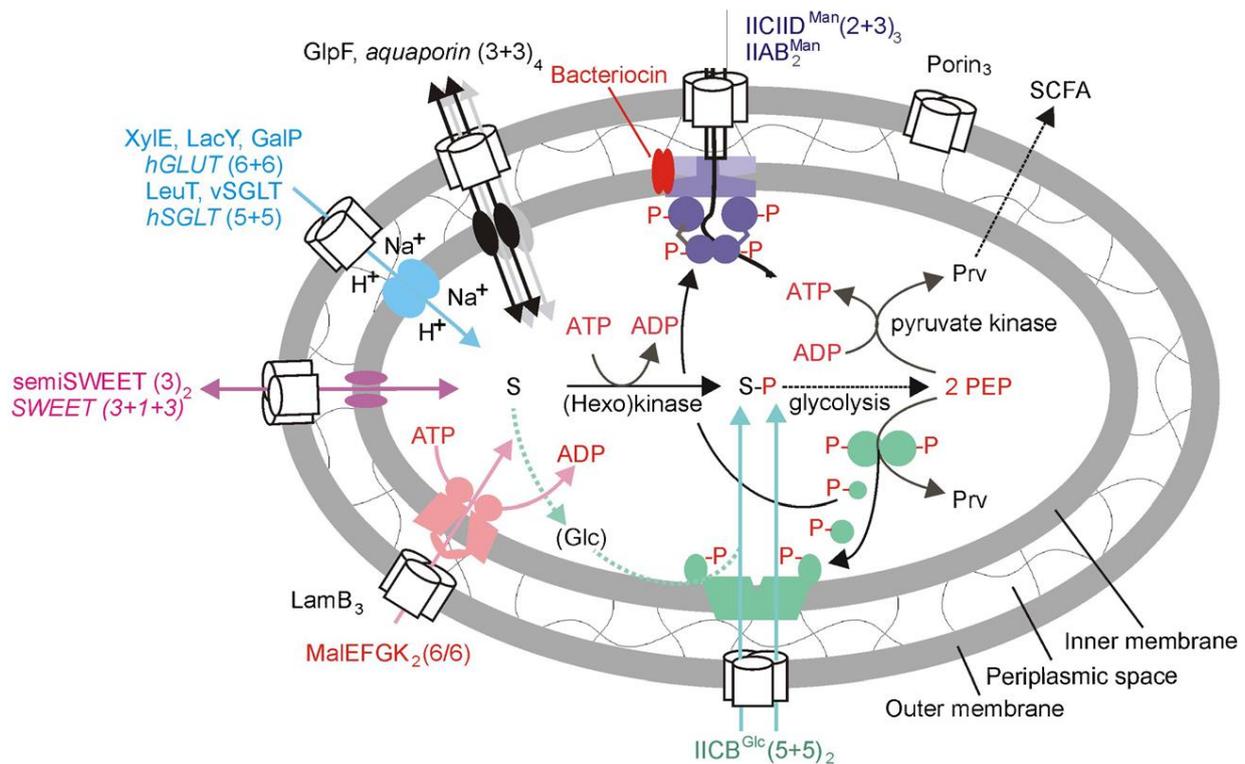


Figure modifiée de (Jeckelmann and Erni, 2020)

Il est important de préciser que ces systèmes d'imports sont souvent associés (notamment les systèmes ABC) à des systèmes de régulation d'expression génique. Ces systèmes permettent ainsi d'activer la voie métabolique nécessaire pour le catabolisme ou la gestion d'une molécule en cours d'import (comme un sucre par exemple). Inversement, cela permet de réprimer une voie métabolique lorsque celle-ci n'est pas nécessaire. Ce signal est souvent induit par un changement de conformation du canal ou transporteur lors du passage de la molécule (De Geyter et al., 2019; Jeckelmann and Erni, 2020).

De manière similaire à l'import, il existe de nombreux composants dont le rôle est d'exporter des molécules/protéines ([Figure 4](#)).

Figure 4 : Systèmes d'export chez les bactéries Gram -

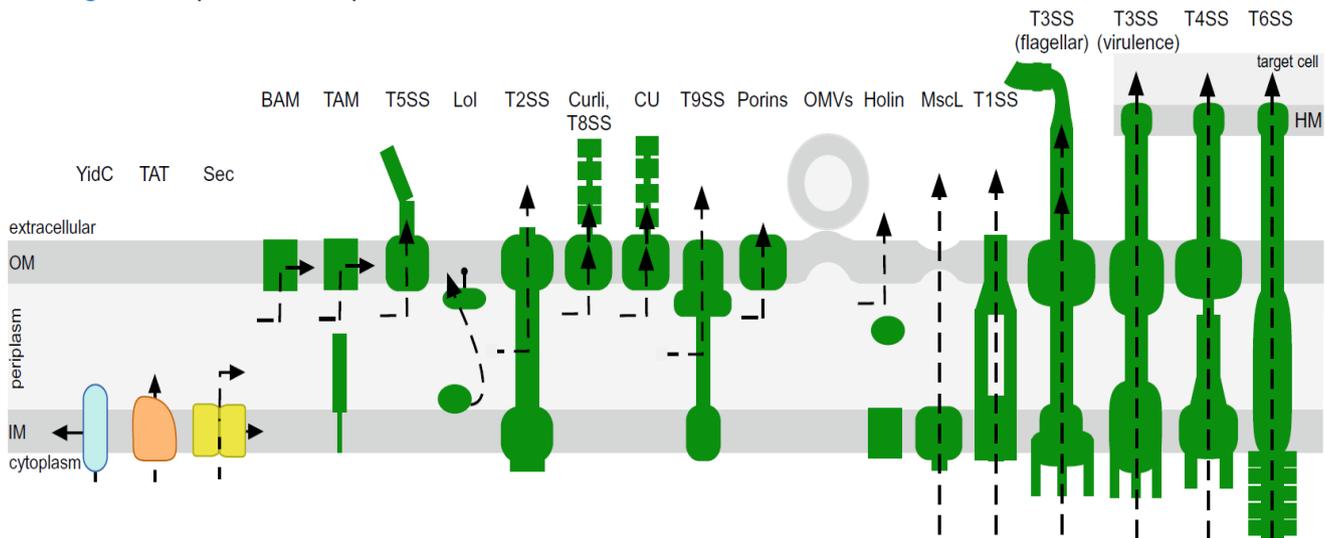


Figure modifiée de (De Geyter et al., 2019)

Les bactéries ont développé un attirail de systèmes d'export très diversifié. Tout comme pour l'import, certaines molécules peuvent être sécrétée de manière passive via de nombreuses porines, ou évacuées via des pompes de manière active en consommant de l'énergie. En ce qui concerne les protéines, de manière brève, les systèmes YidC et Sec interagissent ensemble afin d'exporter des protéines mal-conformées dites « unfolded » dont la conformation finale n'a pas encore été adoptée contrairement au système TAT lui capable d'exporter des protéines adoptant déjà leur conformation finale (De Geyter et al., 2019). Certains de ces systèmes sont aujourd'hui très étudiés, comme les pompes à efflux qui peuvent être impliquées dans les résistances aux antibiotiques en permettant leur expulsion avant d'atteindre leurs cibles. Chez les Gram négative, la superfamille des protéines RND, contenant notamment le transporteur AcrAB chez *E. coli*, sont connues pour être impliquées dans ces phénomènes d'exports d'antibiotiques (Zgurskaya et al., 2021).

Les systèmes dit de sécrétions ont également été très étudiés. Leurs fonctions sont diverses et parfois agissant comme des facteurs de virulence.

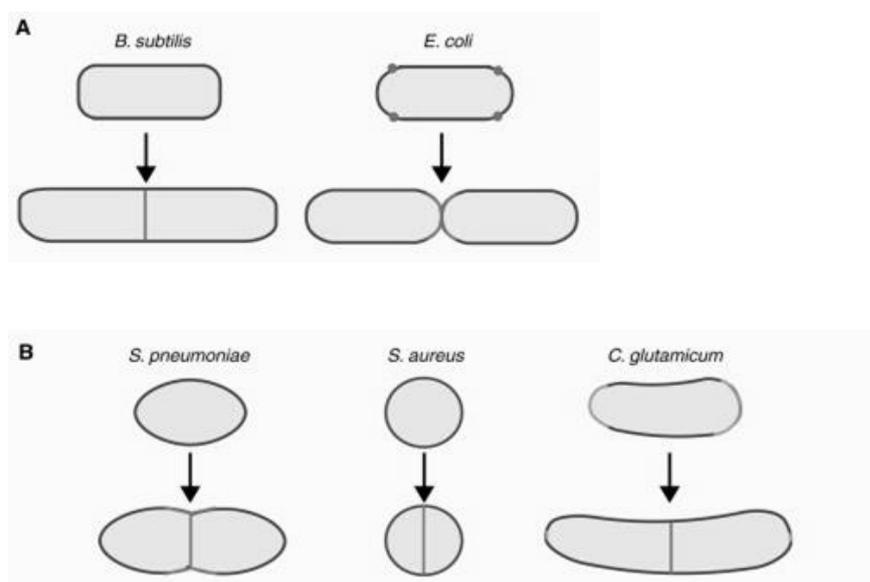
- Le système de sécrétion de type 3 est, par exemple, surnommé l'injectosome, présente une structure de type « aiguille et seringue » permettant d'injecter des molécules directement dans les cellules cibles. Les genres *Pseudomonas* et *Yersinia* ont notamment recours à ce système de sécrétion pour leur virulence (Green and Mecsas, 2016).

- Le système de type 4 est associé au processus de conjugaison bactérienne impliquée dans le transfert de molécule d'ADN permettant notamment l'acquisition d'ilote de pathogénicité et de diverses résistances aux antibiotiques (Backert and Meyer, 2006).

En plus de leurs rôles dans l'import/export, ces systèmes sont impliqués dans le maintien de la pression osmotique cellulaire. La membrane cytoplasmique bactérienne joue un rôle de barrière physique face à l'environnement, mais permet également de maintenir un équilibre au niveau des concentrations en ions essentiel pour la survie de la cellule. Ces concentrations sont ainsi ajustées à l'aide de ces systèmes d'import et d'export. En leur absence, la cellule subirait un stress osmotique qui, s'il survient de manière brutale ou prolongée, peut mener à la mort cellulaire (Krämer, 2010).

Malgré leur diversité, certaines généralités sur leur cycle cellulaire peuvent être énoncées. La réplication de leur génome corrèle avec une augmentation de la taille cellulaire avant éventuellement d'effectuer une fission binaire. Malgré la forme variable de celles-ci, la grande majorité des bactéries réalisent une division symétrique au centre, c'est-à-dire qu'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques, comme le montre la [figure 5](#). Il existe, cependant, des espèces pour lesquelles la division est asymétrique, c'est par exemple le cas de *Caulobacter crescentus* chez qui la division n'est pas parfaitement au centre et génère deux cellules différentes. L'une, peu mobile grâce à un pied appelé stalk, continue son cycle répliatif prolifératif. L'autre, très mobile grâce à la formation d'un flagelle et l'absence de stalk explore son environnement en mettant son cycle cellulaire sur « pause ». Ces cellules mobiles ne peuvent ni répliquer leur génome ni se diviser, il leur faudra pour cela trouver un environnement approprié dans lequel la cellule va pouvoir perdre son flagelle et développer un stalk. Une fois stabilisée dans son environnement, la bactérie pourra reprendre son cycle de vie asymétrique (Collier, 2019).

Figure 5 : Croissance et division des bactéries



Représentation schématique de la division bactérienne lors de la phase exponentielle, figure adaptée de Margolin et al, 2009

Ce cycle répliatif à division symétrique ou asymétrique peut se reproduire jusqu'à ce que les nutriments manquent ou qu'apparaisse un quelconque stress environnemental ou cellulaire (Busiek and Margolin, 2015). Afin de réaliser ce cycle, les bactéries doivent effectuer de manière concomitante différents processus et ont pour cela recours à de nombreux acteurs. Avant de pouvoir se diviser, la cellule doit doubler en taille nécessitant un agrandissement de la surface de la paroi. L'élongosome guide la synthèse de peptidoglycane (PG) afin que la cellule grandisse en conservant sa forme. Dans le même temps, le contenu génétique doit également doubler. Le génome est répliqué puis chaque copie doit être répartie dans deux « compartiments » qui deviendront les cellules filles.

La réalisation de ces 4 processus distincts (réplication de l'ADN, ségrégation de l'ADN, croissance et division cellulaire) est assurée par 4 complexes : le réplisome, le système de partition, l'élongosome et le divisome (Busiek and Margolin, 2015; Egan et al., 2017; Espinosa et al., 2017; Pinho et al., 2013). Les étapes de ce cycle prolifératif seront décrites plus précisément dans la partie 2 de l'introduction.

La durée d'un cycle cellulaire est très variable suivant les bactéries et les milieux utilisés. Dans les conditions optimales pour chacun, la bactérie de *E. coli* présente par exemple un cycle cellulaire (30 mins) beaucoup plus rapide que celui de *Mycobacterium tuberculosis* (24h) (Hett and Rubin, 2008).

1.3.2 En absence de nutriments

En conditions favorables, les bactéries prolifèrent et colonisent un milieu de manière plus ou moins rapide en fonction des espèces. Cependant, dans la nature, les conditions peuvent très rapidement changer et les bactéries doivent alors s'adapter afin de survivre. En prévision d'une carence nutritionnelle pressentie, les bactéries entrent en phase stationnaire (stat) (Bergkessel, 2021). Le cycle cellulaire est alors mis en « pause » à un stade précis du cycle. En absence de nutriments les bactéries vont en effet bloquer l'initiation de la réplication de leur génome juste après un événement de division, aboutissant donc à des cellules possédant un génome et dont le cycle cellulaire est à l'arrêt. La cellule conserve néanmoins certaines activités enzymatiques/métaboliques (Jaishankar and Srivastava, 2017).

Lors de l'entrée en phase stationnaire, cet arrêt de croissance est corrélé à une nette réduction de la taille des cellules (Nyström, 2004) ainsi qu'à une potentielle modification de la forme de celles-ci (légèrement sphériques) (Jaishankar and Srivastava, 2017). De manière surprenante cette réduction de la taille cellulaire aurait un impact non négligeable sur la diffusion de molécule au sein du cytoplasme. Le nucléoïde occuperait en effet plus de place dans un cytoplasme devenu plus petit ce qui empêcherai les facteurs de transcriptions d'atteindre leurs cibles (Bergkessel, 2021). Parallèlement, la paroi bactérienne est renforcée ; sa taille pouvant être multipliée par 2 (Mengin-Lecreulx and van Heijenoort, 1985). Cette modification permettrait de renforcer la résistance à certains stress.

Parallèlement à ces modifications physiques, des changements d'expressions géniques ont également lieu durant cette phase. Chez *E. coli*, le changement le plus connu est l'expression du facteur de transcription *rpoS* pour RNA polymérase sigma factor, également appelé σ^S . Décrit comme le facteur de transcription associé au manque de nutriments (Tanaka et al., 1997), son expression lors d'exposition à divers stress permet la transcription de gènes impliqués dans l'importation du fer ou encore le métabolisme des carbohydrates (Lacour and

Landini, 2004). Ce facteur de transcription n'est, cependant, pas le seul à être sur-exprimé durant la phase stationnaire. En effet, en fonction des espèces, de nombreux facteurs de transcriptions sont exprimés durant cette phase comme le montre le [tableau 1](#). Il a été démontré que la phase stationnaire présentait une réduction significative de l'activité métabolique afin de préserver les ressources et précurseurs disponibles. Chez *B. subtilis*, par exemple, le nombre de molécules de GTP, l'une des sources d'énergie utilisées par les bactéries, est drastiquement plus faible en phase stationnaire comparé à la phase exponentielle (Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001). Cependant, la forte expression de ces facteurs de transcription indique que, malgré une nette réduction de l'activité métabolique, certaines activités cellulaires doivent toujours être maintenues. Selon une étude, 20 % des gènes de la bactérie *E. coli* seraient sur-exprimés en phase stationnaire comparé à la phase exponentielle (Rava et al., 1999). On retrouve parmi ces des gènes des fonctions de réparation de l'ADN, d'osmo- et thermo- résistance ainsi que la synthèse de glycogène correspondant au stockage d'énergie.

Tableau 1 : Facteurs de transcription sur-exprimés durant la phase stat chez différentes espèces

Name of the organism	Sigma factors	Sigma factors upregulated at stationary phase
<i>Escherichia coli</i>	7 $\sigma^{70}(\sigma^D)$, $\sigma^{24}(\sigma^E)$, $\sigma^{28}(\sigma^F)$, $\sigma^{32}(\sigma^H)$, $\sigma^{54}(\sigma^N)$, $\sigma^{38}(\sigma^S)$, $\sigma^{18}(\sigma^{Fecl})$	$\sigma^{32}(\sigma^H)$, $\sigma^{54}(\sigma^N)$, $\sigma^{38}(\sigma^S)$
<i>Bacillus subtilis</i>	18 σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^F , σ^G , σ^H , σ^K , σ^L , σ^M , σ^V , σ^W , σ^Y , σ^X , σ^Z , Xpf, YlacC,	σ^B , σ^C , σ^D , σ^H
<i>Streptomyces coelicolor</i>	65	σ^B , σ^F , σ^H , σ^M , σ^N , σ^R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	σ^E , σ^H , σ^S
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7 σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^M	σ^B , σ^H , σ^M

Figure modifiée de Jaishankar and Srivastava, 2017. Tableau compilant les facteurs de transcription sigma connus chez différentes espèces ainsi que ceux décrit comme sur-exprimés durant la phase stat.

En résumé, la phase stationnaire permet à la bactérie, via l'expression de nombreux facteurs de transcriptions d'adopter une forme et un métabolisme optimisant l'import de ressources importantes (sucres, fer) tout en minimisant l'utilisation d'énergie. Le nombre de ribosomes permettant la traduction est par exemple fortement réduit durant cet état comparé à la phase proliférative (environ 50% de moins) (Piiir et al., 2011).

2. L'organisation cellulaire durant la phase exponentielle

L'organisation intracellulaire bactérienne en conditions prolifératives va être décrite en prenant comme modèle le pathogène humain *Vibrio cholerae*. *V. cholerae* est une bactérie aquatique Gram négative vivant communément dans des estuaires marins. Elle présente une forme en bâtonnet incurvé (voir [figure 6](#)). C'est un agent pathogène humain provoquant la maladie portant son nom. Cette bactérie est responsable de milliers de morts chaque année.

Figure 6 : Représentation de *Vibrio cholerae*



Vibrio cholera

Image tirée d'Adobe stock n°341277006

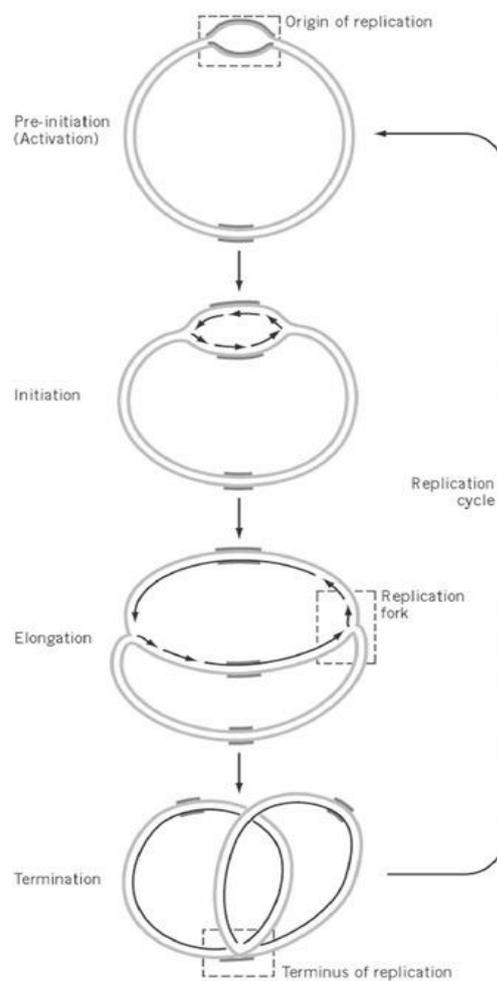
2.1 Organisation du génome et réplication

En général, les bactéries possèdent un unique chromosome circulaire, c'est le cas pour *E. coli* ou *B. subtilis* (Campbell, 1993; Espinosa et al., 2017). Cependant, l'architecture génomique peut être plus complexe avec des chromosomes linéaires comme chez les *Streptomyces* (Hayakawa et al., 1979) ou des chromosomes secondaires circulaires comme chez *Vibrio cholerae* (Yamaichi et al., 1999). A l'aide de nombreuses méta-analyses, il est estimé qu'environ 10% des bactéries possèdent un second chromosome (Harrison et al., 2010; Val et

al., 2016). *V. cholerae* a donc 2 chromosomes circulaires appelés chromosome 1 (chr 1) et chromosome 2 (chr 2) comportant respectivement 3 et 1 Mbp.

Un chromosome bactérien qu'il soit circulaire ou linéaire ne contient qu'une unique origine de réplication *oriC* alors que les eucaryotes en ont une multitude (O'Donnell et al., 2013). La réplication bactérienne est initiée à *oriC* grâce à l'ouverture de la double hélice d'ADN et au chargement de deux réplisomes, la réplication progresse de manière bidirectionnelle à vitesse constante. En l'absence de problème sur un chromosome circulaire, les deux fourches de réplication se rejoignent dans une zone appelée terminus de réplication (*ter*) située à l'opposé de *oriC* (O'Donnell et al., 2013)(figure 7).

Figure 7 : Schéma de la réplication bidirectionnelle bactérienne



L'initiation de la réplication requiert le recrutement de différentes protéines au niveau de *oriC*. Chez *E. coli*, la protéine DnaA reconnaît tout d'abord des séquences répétées de 9 nucléotides (Wolański et al., 2015) situées au niveau de l'origine appelées boîtes DnaA. Puis, de manière ATP dépendante, cette protéine va s'oligomériser formant ainsi une structure en hélice se fixant à l'ADN et permettant ainsi l'ouverture locale de l'ADN. DnaA favorise également le recrutement de l'hélicase DnaB (Duderstadt and Berger, 2008). DnaB est une hélicase possédant une activité d'hydrolyse de l'ATP lui permettant d'ouvrir de manière efficace le double brin parental d'ADN (Baker et al., 1986).

Le chromosome 1 de *Vibrio cholerae* possède à peu près la même *oriC* que celle de *E. coli* (Katayama et al., 2010). En revanche, celle du chr2 est d'origine plasmidique et repose sur l'initiateur spécifique des Vibrionaceae RctB. Cette régulation repose sur la réplication d'une séquence située sur le chr 1 appelée *crtS* qui va permettre un changement de conformation de RctB permettant d'activer l'initiation de la réplication de *ori2* (Val et al., 2016). La position de cette séquence permet aux 2 chromosomes de terminer la réplication au même moment (Baek and Chattoraj, 2014; Val et al., 2016). Elle varie en fonction de la taille du chr 1 afin d'adapter le timing de la fin de la réplication (Kemter et al., 2018).

L'initiation correspond au chargement de deux réplisomes en sens opposé (Beattie and Reyes-Lamothe, 2015). La réplication se fait pour chaque brin mais ne se fait que de 5' en 3'. Il y a donc un brin répliqué de manière continue et l'autre de manière discontinue car il progresse à posteriori par étape en synthétisant des fragments d'environ 1 à 2 kb appelés fragments d'Okazaki (Beattie and Reyes-Lamothe, 2015).

2.2 Ségrégation des génomes chez *V. cholerae*

Chez les eucaryotes, l'étape de réplication est dissociée de l'étape de ségrégation. Chez les bactéries, ces deux étapes sont concomitantes. Cela a été montré, par des expériences de suivi de loci chromosomiques dans des cellules en cours de croissance. Dans une cellule nouvellement formée, on observe l'origine de réplication et le terminus de réplication aux deux pôles opposés (Figure 8). Le terminus est systématiquement associé au nouveau pôle, pôle généré par la dernière division. On observe qu'après duplication de l'origine de réplication et bien avant la fin de la réplication, les deux copies sont immédiatement mobilisées aux deux pôles opposés (Figure 8 ; David et al., 2014).

Figure 8 : Réplication et ségrégation des chromosomes chez *V. cholerae*

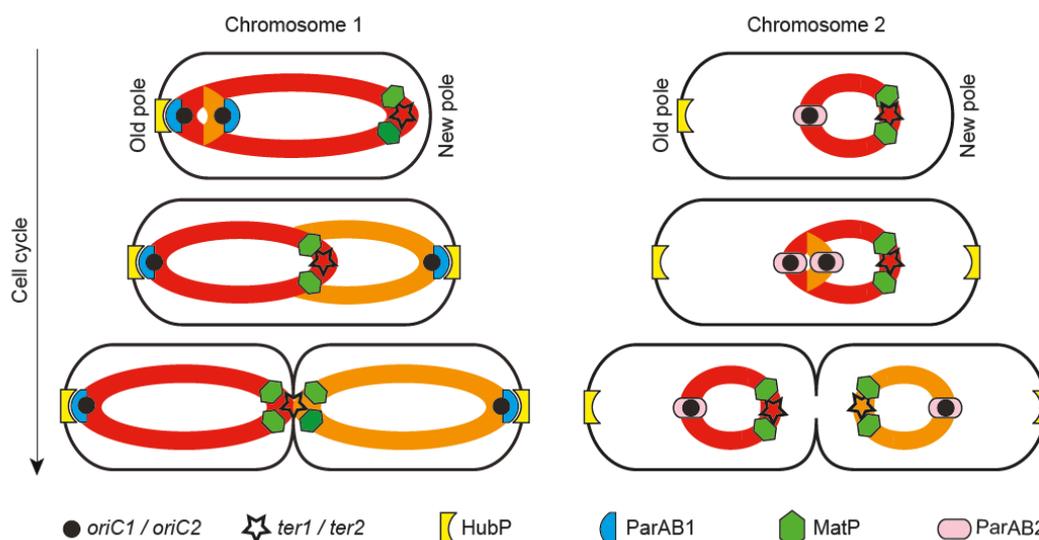


Schéma représentant la ségrégation des chromosomes de *V. cholerae* durant la réplication.

L'un des acteurs majeurs de la ségrégation chez les bactéries est un système appelé système de partition. Il est notamment impliqué dans la ségrégation des origines de réplication ainsi que dans la maintenance cellulaire de divers plasmides (Abelès et al., 1985). Ce système est conservé auprès de plus de 60% des espèces bactériennes (Livny et al., 2007). Il s'appuie sur le fonctionnement de deux protéines ParA et ParB et d'une séquence *parS*, donnant son nom au système de partition : système ParABS. La protéine ParA est une ATPase se fixant à l'ADN de manière aspécifique. ParB se fixe sur l'ADN de manière séquence spécifique au niveau d'une séquence appelée *parS* et de s'y étendre sur quelques kb adjacents (Graham et al., 2014). Le complexe ParB-*parS* présente de l'affinité pour ParA lorsque celui-ci est associé à l'ADN. A leur contact, ParA hydrolyse son ATP et est libéré de l'ADN du à sa perte d'affinité pour ParB. Le complexe ParB-*parS* peut donc poursuivre sa route et interagir avec d'autres ParA liées à l'ADN. De cette manière, le complexe ParB-*parS* est parfaitement distribué le long de la cellule (1 copie au centre ; 2 copies aux $\frac{1}{4}$ - $\frac{3}{4}$ de la cellule).

Chez *V. cholerae*, chaque chromosome possède son propre système de partition, ParAB1 et ParAB2. Chacun leur propre site de fixation *parS1* et *parS2* (Yamaichi et al., 2007a). Il existe trois sites *parS1* et 10 sites *parS2*. Dans le cas du chromosome 1, ces sites sont localisés près de l'origine de réplication. La protéine ParA1 non liée à l'ADN présente de l'affinité pour un nouvel acteur HubP qui est localisé au pôle de la cellule. Cette interaction permet de forcer la direction du complexe ParB1-*parS1* vers le pôle [figure 8](#) (Yamaichi et al., 2012). Cet ancrage n'est cependant pas appliqué au chr 2 qui reste localisé au centre de la cellule. L'absence de HubP a pour conséquence d'altérer la localisation du chr1 (Yamaichi et al., 2012). De manière intéressante, les gènes *parAB1* ne s'avèrent pas essentiels à la survie de *V. cholerae* contrairement aux gènes *parAB2* (Yamaichi et al., 2007b).

Localisation des terminus de la réplication : le rôle de MatP

L'organisation du chromosome bactérien n'est pas aléatoire dans la cellule. Celle-ci peut dépendre de différents facteurs agissant sur sa structuration. Certains loci chromosomiques peuvent ainsi être localisés de manière plus active, tels que les *oriC1* et *oirC2* de par leur système de partition. On peut noter par exemple l'ancrage de *oriC1* au pôle grâce à HubP qui s'associe avec ParAB1.

La localisation de *ter1* est également influencée activement par une protéine appelée MatP, se fixant spécifiquement aux régions *ter* via une séquence appelée *matS*. Cette protéine s'avère être conservée chez les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae*. Elle est associée à une organisation structurale de la région du *ter* bactérien, en effet en son absence on peut observer une ségrégation précoce et une modification de la structuration des régions *ter* (Lioy et al., 2018; Mercier et al., 2008). De plus, cette protéine interagit directement avec le divisome via les protéines ZapA et B (Männik et al., 2016). Ainsi, le *ter1* est maintenu au nouveau pôle en début de cycle cellulaire. Après réplication, les deux *ter* répliqués sont maintenus ensemble au centre de la cellule jusqu'à la division (David et al., 2014).

Pour résumer, une cellule nouvellement formée possède un chr 1 dont l'origine est ancrée au vieux pôle via l'interaction HubP / ParAB1 et un chr 2 localisé au milieu du cytoplasme. Le terminus de la réplication du chr 1, *ter 1*, est maintenu au pôle opposé grâce à une protéine appelée MatP qui joue également un rôle dans le maintien des 2 copies de *ter 1* après leur

réplication. Après initiation de la réplication à *oriC1*, la protéine HubP commence à se localiser au nouveau pôle afin de guider la mobilisation d'une des deux copies de *oriC1* vers ce pôle. La ségrégation du chr2 se fait mais sans ancrage.

2.3. Membrane, paroi et élongasome

L'élongasome permet la synthèse orientée du peptidoglycane afin d'assurer une croissance de la paroi en maintenant la forme de la cellule. Avant de détailler son fonctionnement, il est nécessaire de décrire la paroi cellulaire.

2.3.1 Bactéries Gram positives et Gram négatives

Les membranes bactériennes sont composées d'une bicouche lipidiques servant de couche protectrice pour le cytoplasme (Fisher and Mobashery, 2020), par-dessus cette bicouche on retrouve une structure appelée paroi dont les deux structures principales sont révélées par la coloration de Gram en 1884. Les bactéries peuvent ainsi être positive ou négative à ce test de coloration (Coico, 2005).

Les bactéries dites Gram + comme les *Entérocoques* ou *Staphylocoques* sont capables de retenir le colorant car elles possèdent une unique membrane plasmique couplée à une très épaisse couche de peptidoglycane. Les Gram dites négatives comme les *Enterobacter* ou encore les *Vibrios* possèdent non pas une mais deux membranes appelées membrane interne et externe avec un espace entre ces deux membranes appelé périplasme ou espace périplasmique. Ce périplasme est un espace très riche en protéines et contient également une couche moins épaisse de peptidoglycane comparé aux Gram + (Rohde, 2019; Silhavy et al., 2010). Ces informations sont résumées dans la [figure 9](#).

En plus des différences structurales, les Gram + et – présentent diverses molécules au sein de leur paroi. Les Gram + exhibent des acides téichoïques et lipothéichoïques à travers leur épaisse couche de peptidoglycane via un ancrage dans la membrane plasmique (Rohde, 2019). Les Gram – présentent diverses protéines comme des lipopolysaccharides (lps).

Figure 9 : Structure de la paroi des Gram + et des Gram-

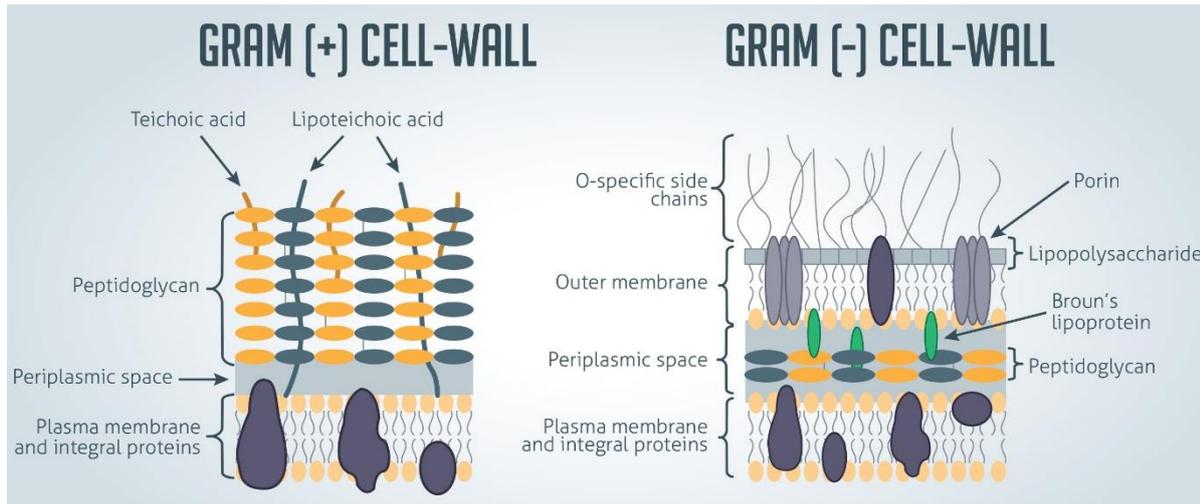


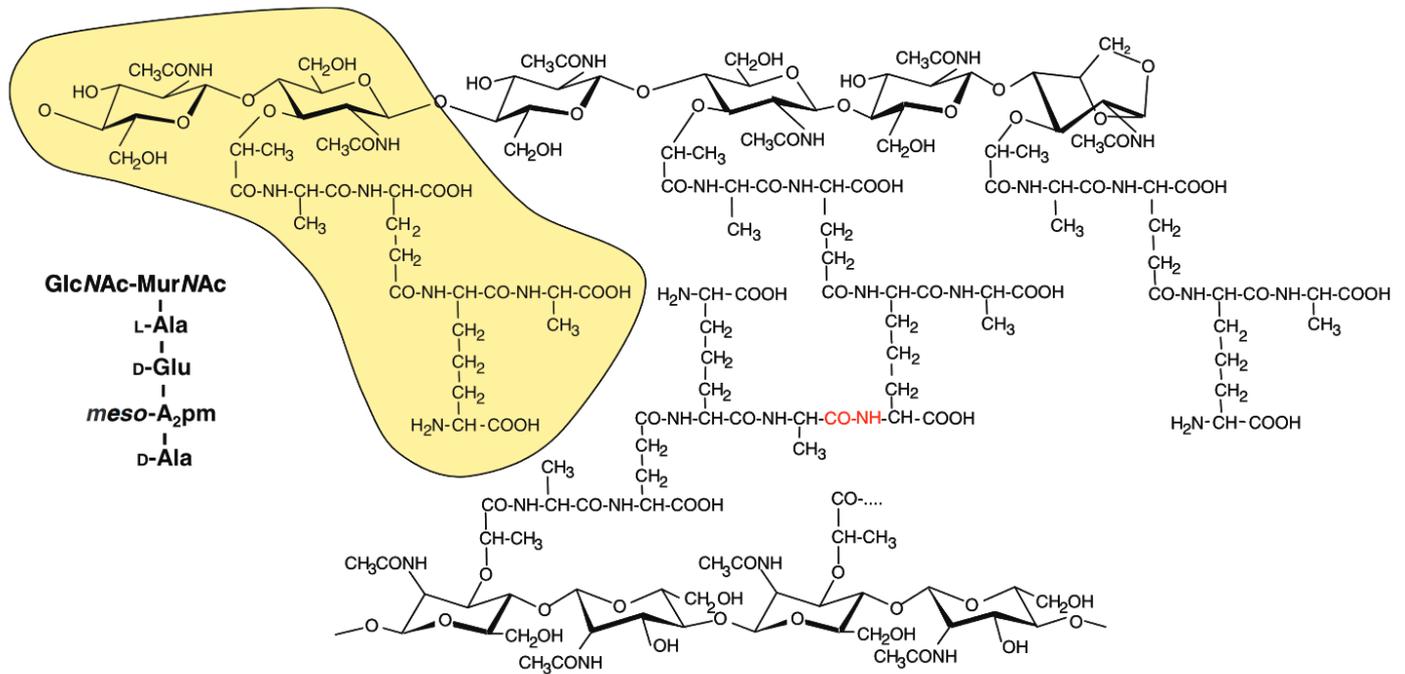
Figure tirée de technology network

Il a été montré que ces protéines jouent un rôle important dans le rôle de barrière face à l'environnement en réduisant la perméabilité des molécules hydrophobiques (Nikaido, 2003). Les protéines exposées à la surface des Gram – sont très étudiées car souvent responsable d'activation du système immunitaire et donc impliquées dans des phénomènes de pathogénicité (Raetz and Whitfield, 2002). *V. cholera* étant une Gram – nous allons désormais nous focaliser sur la structure de la paroi de ces organismes.

2.3.2 Le peptidoglycane dans les bactéries Gram négatives

En dessous de la membrane externe on retrouve le périplasma et le peptidoglycane. Le peptidoglycane est une structure constituée d'un assemblage de nombreuses molécules disaccharidiques, les N-acetyl glucosamine-N-actyl muramique acide aussi appelé GlcNAc–MurNAc. La molécule de MurNAc présente en plus une chaîne peptidique. Cet assemblage GlcNAc–MurNAc + chaîne peptidique représente l'élément de base du peptidoglycane. Des centaines d'éléments comme celui-ci sont alors reliés entre eux par des liaisons glycosidiques et peptiques pour former le peptidoglycane (Vollmer et al., 2008). Cette structure est représentée dans la [figure 10](#).

Figure 10 : Structure du peptidoglycane bactérien



Représentation de la structure du peptidoglycane de *E. coli*. La structure en jaune représente l'unité classique du peptidoglycane (GlcNAc–MurNAc + chaîne peptidique). Figure tirée de Vollmer et al., 2008

L'enchaînement de ces sucres et peptides forme une couche recouvrant l'intégralité de la cellule. Ces couches sont également empilées les unes sur les autres permettant de former une structure plus ou moins épaisse en fonction des espèces. La structure finale ainsi obtenue est souvent considérée comme l'exosquelette des bactéries. Sa rigidité est telle qu'en plus de son rôle protecteur, le peptidoglycane est également impliqué dans la détermination et le maintien de la forme des bactéries. La synthèse du peptidoglycane est l'une des cibles des antibiotiques fréquemment utilisés de nos jours. Sans cette structure, les bactéries explosent à cause de la pression osmotique. En présence d'un milieu osmo-protecteur, on peut observer une bactérie en forme de bâtonnet devenir sphérique si elle est débarrassée de son peptidoglycane (Joseleau-Petit et al., 2007).

Cette structure est située dans le périplasma, son assemblage requiert donc de nombreuses protéines qui vont devoir synthétiser les précurseurs nécessaires dans le cytoplasme (GlcNAc–MurNAc + chaînes peptidiques) et les transporter à travers la membrane interne jusqu'au périplasma puis y assembler la structure. La complexe chaîne de synthèse du peptidoglycane est présentée figure 11.

Figure 11 : Synthèse du peptidoglycane chez les Gram –

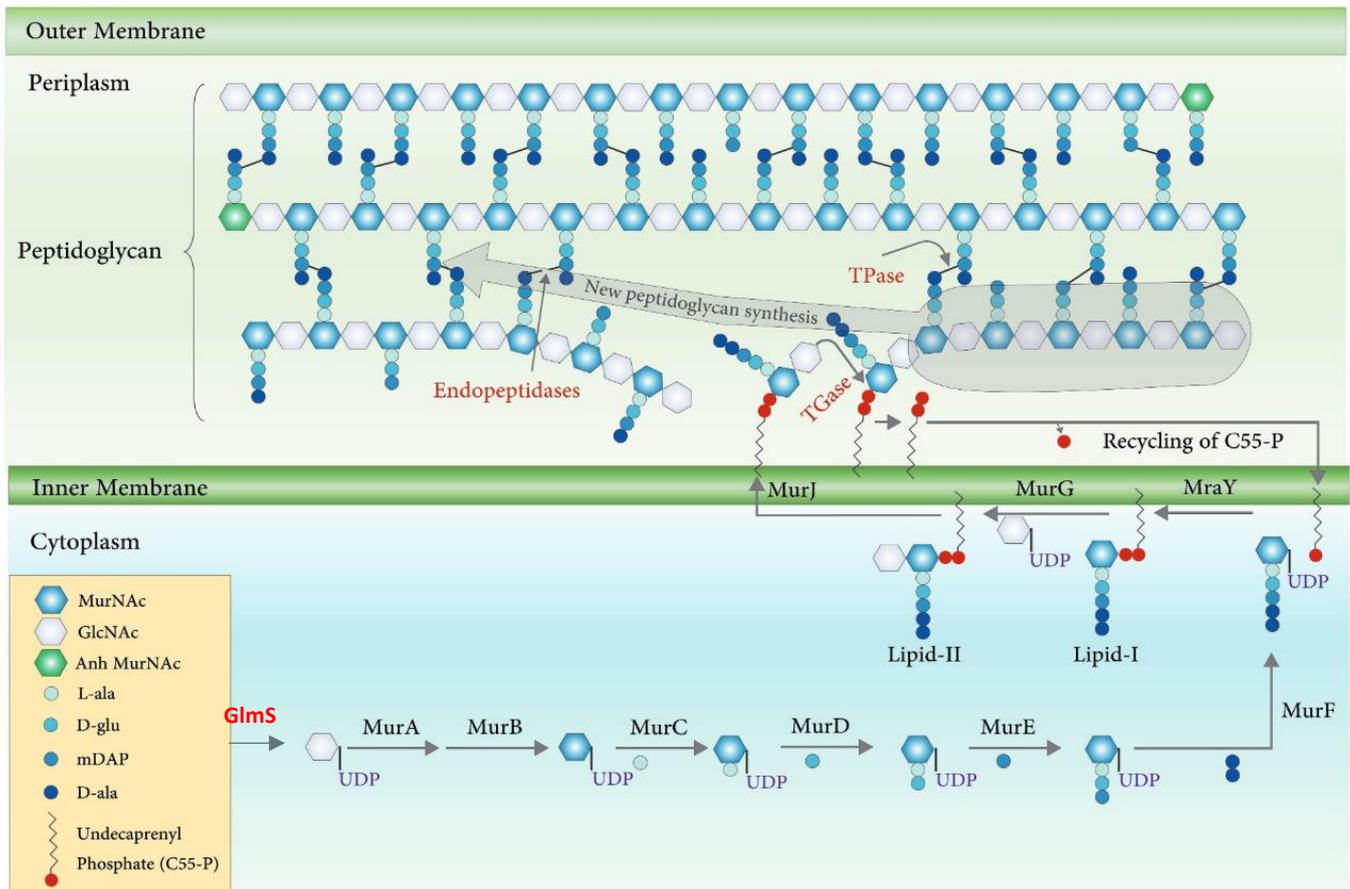


Figure tirée et modifiée de (Garde et al., 2021). Voie de synthèse des précurseurs du peptidoglycane chez les Gram -. Les activités transglycosylation et transpeptidation sont ici abrégées en TGase et TPase.

Cependant, nous ne nous attarderons pas ici sur l'intégralité de la chaîne de fabrication mais seulement sur certains acteurs qui seront importants pour la suite de notre étude (Garde et al., 2021).

2.3.3 Synthèse du PG : Renouvellement/Elongation/ Division

L'UDP-GlcNAc provient du catabolisme de la source de carbone. La première enzyme nécessaire à son obtention est la protéine GlmS, ici écrite en rouge. Elle a pour rôle de convertir le D-fructose 6-phosphate en D-glucosamine 6-phosphate pouvant par la suite être transformé en GlcNAc. L'UDP-MurNAc va ensuite subir une série de modification par les

protéines Mur qui vont venir ajouter les peptides sur le sucre (Alvarez et al., 2021). Une fois toutes les modifications réalisées dans le cytoplasme, la protéine MurJ, aussi appelée flippase, transfère l'unité dans le périplasme où elle sera prise en charge par les Penicillines Binding Proteins ou PBPs. Ces protéines ont été nommées ainsi car elles sont les cibles de nombreuses molécules inhibitrices comme les pénicillines (antibiotiques).

Les PBPs sont classés en deux catégories, les PBP de classe A sont dites bifonctionnelles car elles possèdent deux activités enzymatiques : la transglycosylation et la transpeptidation. La transglycosylation permet la formation de liaison entre les unités de GlcNAc–MurNAc, la transpeptidation relie ces chaînes de sucres sur plusieurs couches grâce à l'établissement de liaisons peptidiques comme on peut le voir sur la [figure 11](#). Les enzymes de classe B ne possèdent qu'une seule des deux activités enzymatiques (Pazos and Vollmer, 2021). Ces enzymes sont plus ou moins conservées au sein des bactéries. Chez *V. cholerae*, il existe au moins 6 PBP (PBP1A, 1B, PBP2,3,4,5) (Alvarez et al., 2021) dont 4 jouent des rôles majeurs ([tableau 2](#)).

Tableau 2 : résumé des PBP chez *V. cholerae*

PBP classe A	PBP classe B
PBP1 A	PBP2
PBP1 B	PBP3 / FtsI

PBP 1 A/B semblent redondantes car l'absence de l'une ou l'autre n'a pas de phénotype alors que le double mutant lui n'est pas viable. Ce n'est pas le cas pour PBP2 et 3 puisque PBP2 fait partie de l'élongasome alors que PBP3 appartient au divisome, deux machineries essentielles à la cellule (Dörr et al., 2014b).

Le peptidoglycane est une structure extrêmement dynamique siège de trois types de processus : Elongation, Division et Renouvellement. L'élongasome organise l'expansion de la paroi en conservant la forme de la cellule alors que le divisome organise la scission de la cellule. Le renouvellement s'effectue quant à lui en permanence, contrairement à l'élongation et la division qui sont régulées.

A) Renouvellement

Pour que le peptidoglycane soit toujours en bon état, un constant renouvellement s'opère sans provoquer ni de division ni d'élongation. Le renouvellement est de grande ampleur puisqu'entre chaque cycle réplcatif près de 50 % du peptidoglycane est remplacé (Park and Uehara, 2008). Pour cela, les bactéries ont recours à des enzymes capables de couper les liaisons du peptidoglycane, les lytiques transglycosylases et endopeptidases (voir [figure 12](#)). Il existe également d'autres enzymes plus sélectives comme les carboxypeptidases. Ces enzymes ont donc pour mission de couper des fragments de peptidoglycane permettant l'insertion de nouveaux composés, cependant leur expression doit être extrêmement contrôlée car ces enzymes peuvent facilement aboutir à la lyse cellulaire (Lee and Huang, 2013).

Figure 12 : Enzymes associées à la rupture du peptidoglycane bactérien

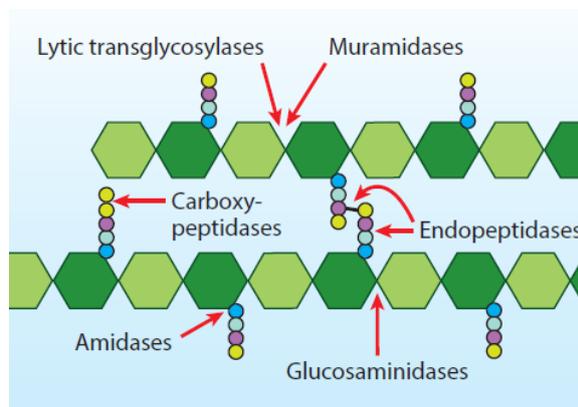


Figure tirée de Rohs and Bernhardt, 2021. Les unités de GlcNAc–MurNAc sont représentées par les octaédres vert clair et foncé, les chaînes peptidiques sont quant à elles indiquées par les ronds multicolores.

En cas de dégradation trop importante du peptidoglycane, le renouvellement peut être accru. La bactérie *B. subtilis* possède un système à deux composants appelé *walkR* capable de détecter la trop grande présence de fragments dégradé de la paroi et d'induire la répression de l'expression des enzymes responsable de sa dégradation, mais également d'activer l'expression des enzymes de synthèse (principalement PBP1 A et PBP1 B, les enzymes bifonctionnelles) (Dobihal et al., 2019). Chez *V. cholerae*, il existe un autre système à deux composants appelé *wigKR* (Dörr et al., 2016a), ce système est essentiel dans la synthèse *de novo* de la paroi après traitement aux antibiotiques visant celle-ci.

Il est également important de noter que la structure même du peptidoglycane bactérien évolue en fonction des conditions. Comme abordé précédemment lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire la taille de la paroi est généralement affectée. Les chaînes de sucres sont plus petites (en moyenne 2x plus courtes) mais présentent plus de liens peptidiques (en moyenne 2x plus) (Blasco et al., 1988; Dörr et al., 2014a). Ces modifications d'organisation ont été observées chez de nombreuses bactéries y compris *V. cholerae*. Elles seraient associées à un mécanisme de résistance limitant la dégradation du peptidoglycane (Stenström et al., 1989).

B) L'élongasome

La synthèse du peptidoglycane permettant l'élongation n'est pas réalisée de manière aléatoire sur le réseau de peptidoglycane. Le complexe protéique impliqué appelé élongasome ou Rod complexe est composé des protéines MreB, MreC, MreD, RodA, RodZ et enfin PBP2. L'altération de ce complexe est associée dans la majorité des cas à une perte de la morphologie bactérienne et une létalité majeure (Bendezú and de Boer, 2008). MreB est la protéine homologue de l'actine chez les bactéries (Chastanet and Carballido-Lopez, 2012). Elle forme dans le cytoplasme des filaments antiparallèles qui se fixent à la membrane interne (Billaudeau et al., 2019) et interagit avec le domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire RodZ (Bendezú et al., 2009). Le rôle des protéines MreC et MreD est encore peu connu mais semble important pour l'interaction avec les deux enzymes impliquées dans la synthèse même du peptidoglycane RodA et PBP2. Comme dit précédemment PBP2 est une PBP de classe B, qui possède une fonction de transpeptidation alors que RodA est une enzyme possédant une activité de transglycosylation (Emami et al., 2017). Les deux fonctions enzymatiques nécessaires à la synthèse du PG sont donc bien retrouvées dans ce complexe.

Il a été montré que la protéine MreB ne formait pas de longs filaments mais plutôt de petits « patchs » se déplaçant le long de l'axe de la cellule via polymérisation/dépolymérisation comme le résume la [figure 13](#) (Billaudeau et al., 2019). La localisation de MreB coïncidant avec la localisation de la synthèse du peptidoglycane a permis d'avancer un modèle selon lequel MreB guiderait l'élongasome via l'intérieur du cytoplasme.

Figure 13 : Localisation et déplacements de l'élongasome

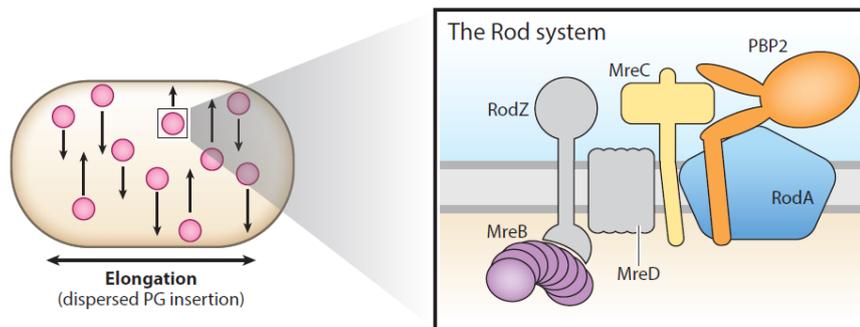


Figure tirée de Rohs and Bernhardt, 2021

Un autre acteur est impliqué dans la forme chez *V. cholerae*: la protéine Curvature regulator in *Vibrio*, CrvA (Bartlett et al., 2017). Cette protéine forme des filaments localisés dans le périplasma sur une bande longitudinale de la membrane interne. Cela serait capable de réduire les insertions de peptidoglycane à ce niveau et donc d'entraîner une différence d'élongation d'une face longitudinale par rapport à l'autre et induirait donc la courbure observable dans la forme de notre bactérie.

C) La division

1- Cinétique de la chorégraphie des protéines du divisome

Le divisome est composé d'une dizaine de protéines globalement conservées au sein des bactéries. La chorégraphie de ces protéines au cours du cycle peut varier d'une bactérie à l'autre. Chez *V. cholerae*, l'intégralité des protéines connues du divisome sont localisées au niveau du nouveau pôle dès le début du cycle cellulaire. Lorsque la division doit être effectuée, la protéine FtsZ (homologue de la tubuline eucaryote) va alors migrer vers le milieu de la cellule pour y former le Z-ring et recruter les protéines dites « précoces » de la division : FtsA, ZapA, ZapB, FtsE. Ces protéines peuvent ensuite recruter les protéines dites « tardives » FtsK, FtsW, FtsI (PBP3), FtsN et d'autres (Alvarez et al., 2021; Espinosa et al., 2017). L'objectif ici ne sera pas de décrire précisément le rôle de chacun de ces acteurs mais plutôt de dépeindre le processus dans sa globalité.

FtsZ est au centre du processus de division. C'est la position et le moment de sa polymérisation qui va déclencher la division. FtsZ recrute l'ensemble des protéines précoces qui à leur tour recrutent les protéines « tardives » dont FtsK (Draper et al., 1998 ; Grainge,

2010). FtsK est également impliquée dans la résolution des dimères de chromosomes (Yates et al., 2006). FtsK est essentielle de par son rôle dans la division chez les bactéries.

Finalement, les enzymes FtsN, FtsW et FtsI (également appelée PBP3) ainsi recrutées vont être responsable du clivage finale du peptidoglycane et de la membrane plasmique au niveau du septum (Misra et al., 2018, Egan et al., 2020) voir [figure 14](#). Cette synthèse de PG est également guidée par l'anneau FtsZ qui se rétracte au fur et à mesure de la constriction.

Figure 14 : Schéma du divisome chez les Gram négatives

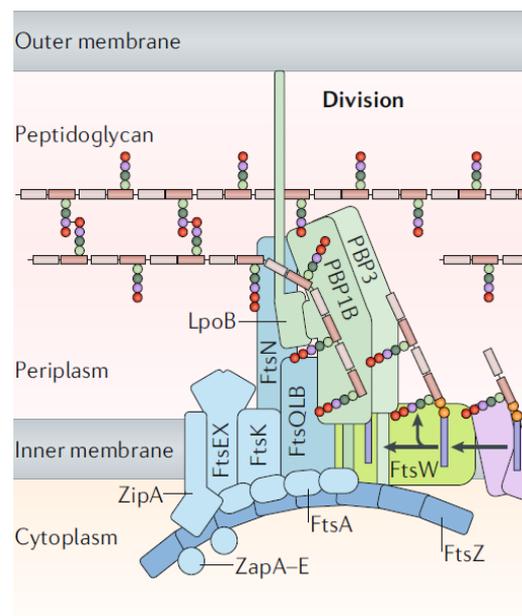


Figure modifiée de (Egan et al., 2020)

2-La régulation de la division

La division cellulaire est un processus extrêmement contrôlé car il peut aisément aboutir à la mort cellulaire. Le système Min est basé sur 3 protéines, MinCDE dont le rôle est d'inhiber la division cellulaire au niveau des pôles de la cellule. La protéine MinC empêche la polymérisation de FtsZ, MinD permet l'activation de MinC et enfin MinE est le régulateur topologique du système (Lutkenhaus, 2007). L'oscillation du système Min conduit à une localisation moyenne plus forte proche des pôles qui explique l'inhibition de la division dans cette zone (voir [figure 15](#)).

Figure 15 : Localisation oscillante du système Min

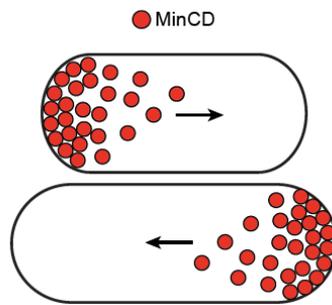


Figure tirée de Espinosa et al., 2017

Un autre système de régulation de la division est appelé l'occlusion par le nucléoïde : NO (Nucleoid Occlusion). Cela permet de réguler spatialement et temporellement le déclenchement de la division. Chez *V. cholerae* et *E. coli*, le système NO est basé sur la protéine SlmA qui est aussi un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ. SlmA est capable de se fixer sur des sites spécifiques appelés SlmA binding sites (sbs). Ces sites sont répartis partout sur les deux chromosomes de *V. cholerae* sauf au niveau des terminus de la réplication. L'inhibition est donc « levée » uniquement au centre de la cellule lorsque la ségrégation des chromosomes est terminée (Cho et al., 2011) (voir [figure 16](#)). Ces deux systèmes agissent en parallèle pour contrôler précisément le processus de division.

Figure 16 : Localisation de SlmA au cours du cycle cellulaire

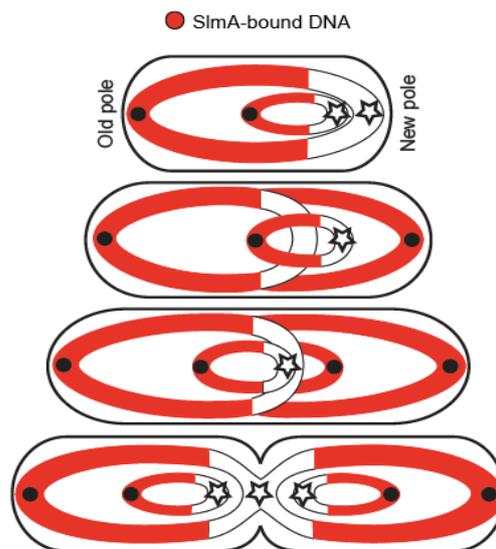
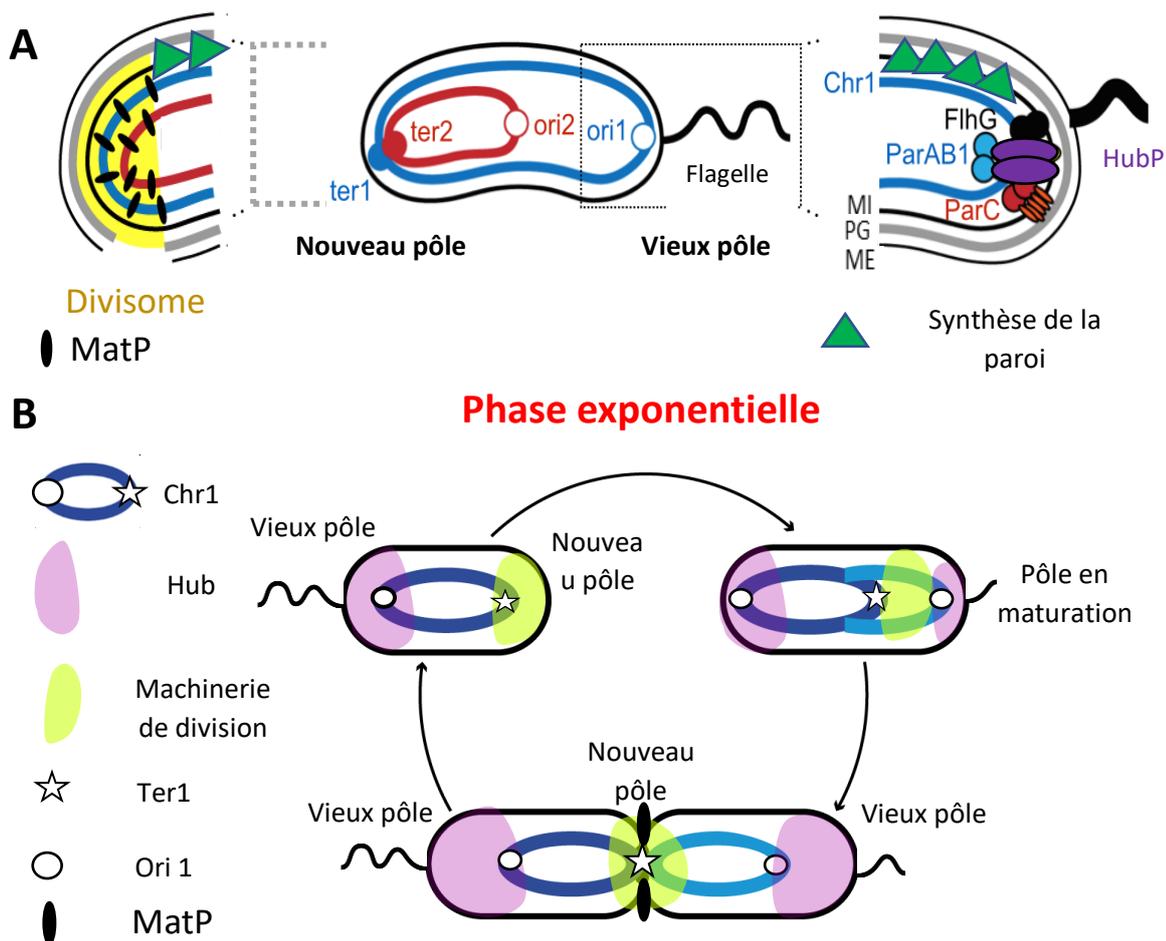


Figure tirée de Espinosa et al., 2017. La zone de fixation de SlmA est représentée en rouge, sa zone d'exclusion en blanc, les origines de réplifications sont les ronds noirs et les terminus les étoiles blanches.

Pour finir ce chapitre nous avons résumé ces informations dans la [figure 17](#)

Figure 17 : Organisation cellulaire schématique de *V. cholerae* en phase exponentielle



Représentation schématique de l'organisation cellulaire de *V. cholerae*. **(A)** Organisation d'une cellule nouvellement formée. On retrouve les deux chromosomes, les deux ter sont situés au niveau du nouveau pôle, l'ori 2 est localisée à la moitié de la cellule alors que l'ori 1 est située à l'opposé des ter au niveau du vieux pôle. L'ensemble du divisome reste en place après la division au nouveau pôle interagissant avec MatP et les ter. A l'opposé on retrouve le système de partitionnement qui avec l'aide de la protéine HubP ancre l'ori 1 au vieux pôle. Enfin, on retrouve partout tout autour de la cellule la machinerie de synthèse de la paroi (élongasome + PBPs). **(B)** Organisation intracellulaire au cours du cycle cellulaire, seul le chromosome 1 est montré. Lorsque la réplication s'initie grâce au réplisome les deux ori sont rapidement ségrégées grâce au système de partitionnement et HubP qui va désormais se localiser aux deux pôles. En parallèle les protéines précoces de la division commencent l'assemblage du Z-ring qui sera terminé avec l'arrivée des protéines tardives aboutissant à une bonne division symétrique et la création des deux nouveaux pôles prêts à recommencer un nouveau cycle.

3. Adaptation et stratégie de survie

Les conditions de vie des bactéries sont changeantes au cours du temps, parfois même de manière très brutale (changement de température, apparition d'un prédateur, manque de nutriments etc). C'est pourquoi ces espèces ont développé de nombreuses stratégies pour survivre.

3.1 Le Biofilm

Il est de coutume de dire que l'union fait la force, il se trouve que c'est également le cas pour les bactéries. Jusqu'à présent, dans notre étude, nous avons toujours considéré les bactéries de manière individuelle, or dans l'environnement, celles-ci sont en réalité fréquemment rassemblées en communauté dans une structure appelée biofilm. Un biofilm est un rassemblement d'une ou plusieurs espèces bactériennes au sein d'une matrice extracellulaire sécrétée par les bactéries le composant (Hall-Stoodley et al., 2004). Cette matrice est composée de polysaccharides et de diverses protéines variant en fonction des espèces. Chez *V. cholerae*, le composé principal du biofilm est le Vibrio Polysaccharide (VPS) auprès duquel on retrouve trois protéines RbmA, RbmC et Bap1 (Teschler et al., 2015).

La formation d'un biofilm est un procédé complexe, qui requiert l'attachement à une surface, ce qui implique des facteurs comme les pili, puis la sécrétion des composés de la matrice (VPS, RbmA, RbmC, Bap1) (Yan and Bassler, 2019). En parallèle, la cellule initiant le biofilm va effectuer son cycle cellulaire permettant d'obtenir une colonie de bactéries fixées à une surface et protégée par cette matrice extracellulaire (Figure 18). Les biofilms peuvent être formés dans de nombreuses situations, aussi bien en milieu aqueux soumis aux mouvements des vagues que sur les paroi de l'intestin humain (Hall-Stoodley et al., 2004)

Figure 18 : Formation d'un biofilm chez *V. cholerae*

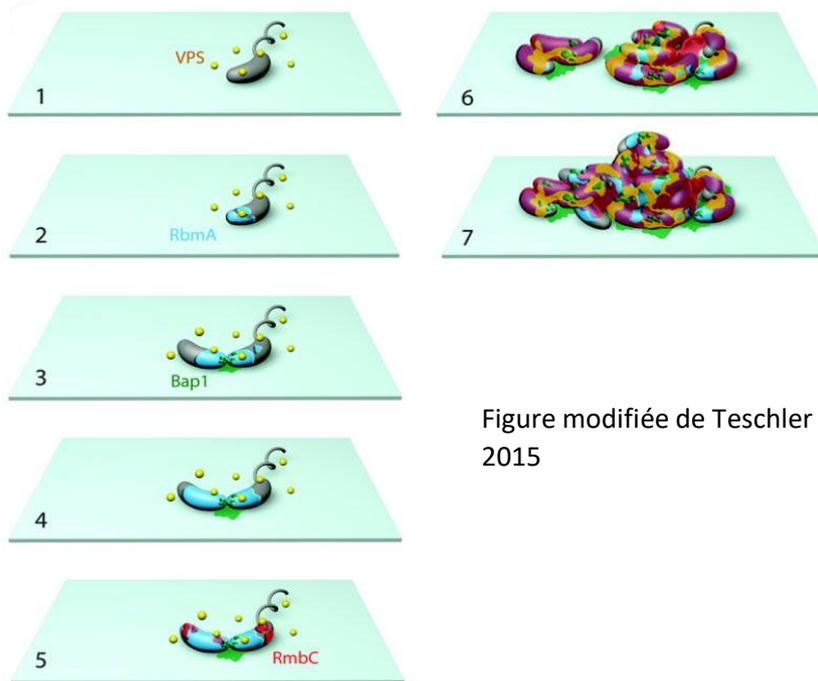


Figure modifiée de Teschler et al., 2015

Ils peuvent présenter de très nombreuses différences morphologiques à la fois de l'extérieur mais surtout en son sein. En effet, la matrice extracellulaire étant extrêmement riche en polysaccharides et en protéines, l'accès aux nutriments peut s'avérer inégal en fonction de la localisation des cellules. Il a ainsi été décrit que les cellules pouvaient se « différencier » au sein de la structure : certaines cellules en phase stationnaire (Walters et al., 2003), d'autres très mobiles pouvant quitter le biofilm afin de favoriser la formation de nouvelles colonies dans l'environnement (Teschler et al., 2015) ou encore des cellules dites persistantes dont nous parlerons plus tard. Il a également été décrit chez différentes espèces de *Vibrio* (dont *V. cholerae*) la présence de cellules sphériques non cultivables au sein des biofilms de ces espèces (Alam et al., 2007; Rodrigues et al., 2015). Il semblerait que ces différenciations puissent être guidées par le quorum-sensing bactérien basé sur la densité bactérienne (Ng and Bassler, 2009).

La formation de biofilm permet aux bactéries de se protéger de nombreux stress extérieurs comme les pressions mécaniques d'un environnement aquatique ou encore l'agression de prédateurs, comme les phages qui ne peuvent pénétrer la matrice extracellulaire. Il s'avère que cette stratégie de survie est un problème de santé publique majeur. Les biofilms sont non seulement associés à des pathologies graves (mucoviscidose avec des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* par exemple (Lee and Yoon, 2017), mais surtout responsables de nombreux phénomènes de résistances aux antibiotiques et de contamination

notamment dans les hôpitaux. En effet, si les phages ne peuvent pénétrer en profondeur la matrice des biofilms, il en est de même pour les molécules antibiotiques et le système immunitaire (Jamal et al., 2018; Rabin et al., 2015).

3.2 Persistance, VBNC, dormance

Une autre stratégie pour survivre peut consister en l'arrêt total ou partiel du métabolisme de manière plus ou moins longue afin d'éviter un stress.

3.2.1 Persistance

Au sein d'une population bactérienne, les cellules ne se développent pas toutes au même rythme (Levin and Rozen, 2006). On distingue ainsi deux types de cellules. Une majorité qui croît à un rythme classique et une très faible proportion (environ 1 pour 1 000 000 (Moyed and Bertrand, 1983) à la croissance bien plus lente. Ces cellules ont longtemps été négligées, car considérées comme des anomalies destinées à mourir. Cependant, ces cellules présentent une résistance aux antibiotiques bien plus élevée que la population proliférative (Lewis, 2010). Cette sous-population de cellules présentant une résistance aux antibiotiques plus élevée est impliquée dans des phénomènes de résurgence bactérienne et d'apparition de souches multi résistantes, c'est pourquoi elles sont appelées persistantes (Gerdes and Maisonneuve, 2012) (Figure 19).

Figure 19 : Schéma d'une culture traitée aux antibiotiques en présence de cellules persistantes

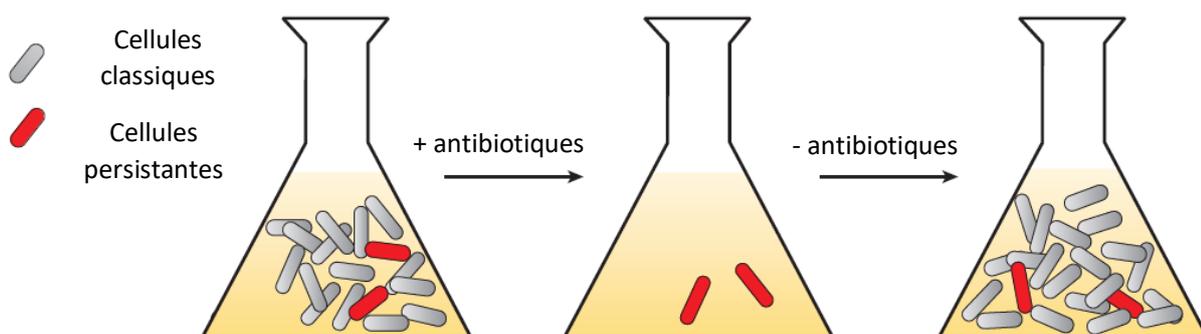


Figure modifiée de Gerdes and Maisonneuve, 2012

Ces cellules persistantes existent chez la majorité des espèces bactériennes (Lewis, 2010), l'étude de ce phénomène a rapidement conduit à la découverte de facteurs influençant la formation de ces cellules. L'exposition répétée de *E. coli* à un antibiotique visant la paroi a ainsi permis d'identifier un gène augmentant fortement la formation de cellules persistantes. Ce gène a donc été appelé *hip* (high persistence) (Moyed and Bertrand, 1983). Il s'avère que ce gène fait partie d'un duo appelé *hipAB* qui encode pour un système toxine anti-toxine. La surexpression de la toxine de ce système permet d'augmenter le nombre de cellules persistantes et le taux de survie après traitement à différents antibiotiques, alors que la surexpression de l'anti-toxine réduit ces nombres (Moyed and Bertrand, 1983). Confirmant donc des implications génétiques à ce phénomène même si celui-ci reste encore incompris. D'autres systèmes toxine anti-toxine ont été associés à ce type de phénomène c'est par exemple le cas du système *vapBC* chez *Mycobacterium tuberculosis* (Gerdes and Maisonneuve, 2012).

3.2.2 Etat Viable mais non cultivable : VBNC

En 1982 des scientifiques ont plongés pour une durée de deux semaines des souches classiques *V. cholerae* et *E. coli* dans de l'eau salé mimant l'eau de mer. Ils se sont alors rendu compte qu'une proportion de la population de ces deux espèces n'était plus capable de croître sur les milieux de culture synthétique habituels (Xu et al., 1982). Ils ont donc testé la viabilité de ces cellules qui s'avérait être positive. Ils les ont alors décrites comme « Viable But Non Culturable (VBNC). Le stade VBNC est donc un état dans lequel des cellules parfaitement cultivables en laboratoire vont, après une exposition plus ou moins prolongée à un stress, devenir non cultivable malgré la survie de celles-ci. Il a rapidement été montré que ces cellules peuvent subir de nombreux changements au niveau de la paroi et de la morphologie (Signoretto et al., 2002; Takeda, 2011), en effet l'exposition prolongée à l'eau de mer froide (4°C) provoque un changement morphologique chez *V. cholerae* qui conduit à une forme sphérique au lieu de sa forme en bâtonnet incurvée classique. L'analyse des cellules VBNC de *E. coli* a montré une augmentation significative des liaisons peptidiques (3x supérieur) et une importante diminution de la taille des chaînes saccharidiques au sein du peptidoglycane. Ces cellules restent cependant métaboliquement actives (Rahman et al., 1994).

Initialement décrites dans l'eau de mer, la présence de ces cellules est désormais avérée dans de nombreux autres environnements (estuaires, eaux stagnantes, eau potable, dans le sol ou encore dans la nourriture) (Pinto et al., 2015). Cette stratégie de survie semble être partagée par de nombreuses autres bactéries (Figure 20).

De nombreuses conditions semblent également pouvoir induire cet état, on retrouve notamment la température, les concentrations salines importantes, le pH ou encore la concentration en oxygène (Pinto et al., 2015). Cependant, les mécanismes conduisant la formation de ces cellules restent globalement encore aujourd'hui très peu connus. On peut noter l'implication du régulateur *rpoS* qui semble lié à un équilibre entre phase stationnaire et état VBNC (Kusumoto et al., 2012).

Figure 20 : Liste des espèces chez qui le stade VBNC a été décrit (figure tirée de Pinto et al., 2015)

<i>Acetobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>A. acetii</i> (Millet & Lonvaud-Funel, 2000)	<i>E. faecalis</i> (Oliver, 2005)	<i>R. solanacearum</i> (Oliver, 2005)
<i>Acinetobacter</i>	<i>E. hirae</i> (Oliver, 2005)	<i>Rhizobium</i>
<i>A. calcoaceticus</i> (Lemke & Leff, 2006)	<i>E. faecium</i> (Oliver, 2005)	<i>R. leguminosarum</i> (Oliver, 2005)
<i>Aeromonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>R. meliloti</i> (Oliver, 2005)
<i>A. hydrophila</i> (Oliver, 2010)	<i>E. amylovora</i> (Oliver, 2010)	<i>Rhodococcus</i>
<i>A. salmonicida</i> (Oliver, 2005)	<i>Escherichia</i>	<i>R. rhodochrous</i> (Oliver, 2005)
<i>Agrobacterium</i>	<i>E. coli</i> (Oliver, 2005)	<i>Salmonella</i>
<i>A. tumefaciens</i> (Oliver, 2005)	<i>Francisella</i>	<i>S. enteritidis</i> (Oliver, 2005)
<i>Alcaligenes</i>	<i>F. tularensis</i> (Oliver, 2005)	<i>S. enterica</i> (Oliver, 2005)
<i>A. eutrophus</i> (Oliver, 2005)	<i>Helicobacter</i>	<i>Serratia</i>
<i>Arcobacter</i>	<i>H. pylori</i> (Oliver, 2005)	<i>S. marcescens</i> (Oliver, 2005)
<i>A. butzleri</i> (Fera et al., 2008)	<i>Klebsiella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>K. aerogenes</i> (Oliver, 2005)	<i>S. dysenteriae</i> (Oliver, 2005)
<i>B. lactis</i> (Lahtinen et al., 2008)	<i>K. pneumoniae</i> (Oliver, 2005)	<i>S. flexneri</i> (Oliver, 2005)
<i>B. longum</i> (Lahtinen et al., 2008)	<i>K. planticola</i> (Oliver, 2005)	<i>S. sonnei</i> (Oliver, 2005)
<i>B. animalis</i> (Lahtinen et al., 2008)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Sinorhizobium</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>L. plantarum</i> (Oliver, 2005)	<i>S. meliloti</i> (Oliver, 2005)
<i>B. cepacia</i> (Oliver, 2005)	<i>L. lindneri</i> (Suzuki et al., 2006)	<i>Vibrio</i>
<i>B. pseudomallei</i> (Oliver, 2005)	<i>L. paracollinoides</i> (Suzuki et al., 2006)	<i>V. alginolyticus</i> (Oliver, 2010)
<i>Campylobacter</i>	<i>L. lactis</i> (Oliver, 2005)	<i>V. anguillarum</i> (Oliver, 2005)
<i>C. coli</i> (Oliver, 2005)	<i>Legionella</i>	<i>V. campbellii</i> (Oliver, 2005)
<i>C. jejuni</i> (Oliver, 2005)	<i>L. pneumophila</i> (Oliver, 2005)	<i>V. cholerae</i> (Oliver, 2005)
<i>C. lari</i> (Oliver, 2005)	<i>Listeria</i>	<i>V. fischeri</i> (Oliver, 2005)
<i>Citrobacter</i>	<i>L. monocytogenes</i> (Oliver, 2005)	<i>V. harveyi</i> (Oliver, 2005)
<i>C. freundii</i> (Dhiab et al., 2008)	<i>Oenococcus</i>	<i>V. mimicus</i> (Oliver, 2005)
<i>Cytophaga</i>	<i>O. oeni</i> (Millet & Lonvaud-Funel, 2000)	<i>V. natriegens</i> (Oliver, 2005)
<i>C. allerginae</i> (Oliver, 2005)	<i>Pasteurella</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> (Oliver, 2005)
<i>Enterobacter</i>	<i>P. piscicida</i> (Oliver, 2005)	<i>V. proteolytica</i> (Oliver, 2005)
<i>E. aerogenes</i> (Oliver, 2005)	<i>Pseudomonas</i>	<i>V. shiloi</i> (Oliver, 2005)
<i>E. cloacae</i> (Oliver, 2005)	<i>P. aeruginosa</i> (Oliver, 2005)	<i>V. vulnificus</i> (Oliver, 2005)
<i>E. agglomerans</i> (Rowan, 2004)	<i>P. fluorescens</i> (Oliver, 2005)	<i>Xanthomonas</i>
	<i>P. putida</i> (Oliver, 2005)	<i>X. axonopodis</i> (Oliver, 2010)
	<i>P. syringae</i> (Oliver, 2005)	<i>X. campestris</i> (Oliver, 2005)
		<i>Yersinia</i>
		<i>Y. pestis</i> (Pawlowski et al., 2011)

L'état VBNC apparait cependant être réversible via l'ajout potentiel dans le milieu de culture de différents composés (Figure 21). Cette réversibilité peut être induite par de nombreux facteurs comme la température, le passage au sein d'un hôte ou encore la présence en faible concentration d'une protéine appelée Rpf pour Resuscitation promoting factor. Les mécanismes exacts du fonctionnement de cette réversion restent peu connus.

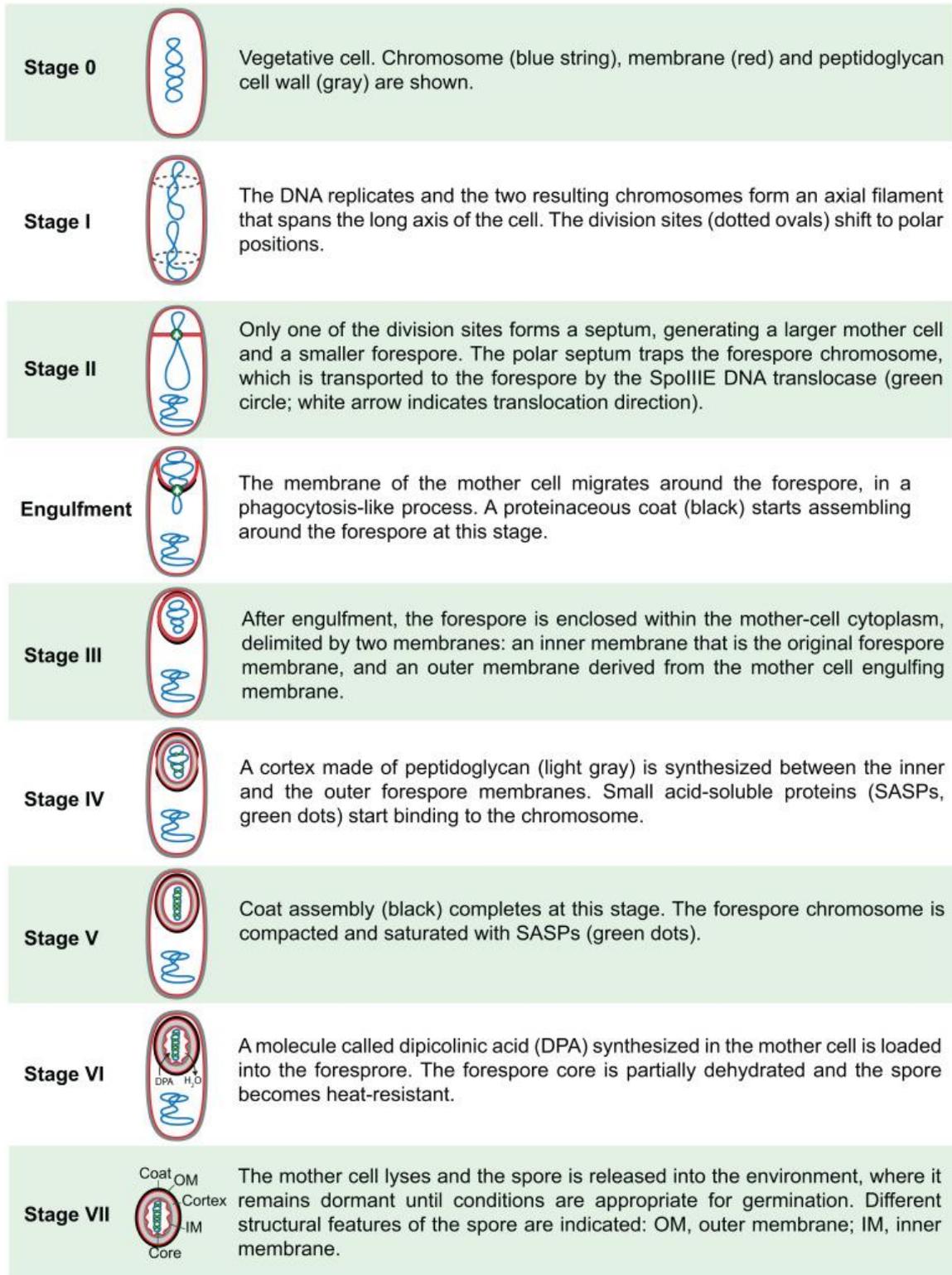
Figure 21 : Réversibilité du stade VBNC (figure tirée de Pinto et al., 2015)

Resuscitation stimuli	Species in which it was observed
Amino acids	<i>E. coli</i> (Pinto et al., 2011)
Gas mixture	<i>C. jejuni</i> (Bovill & Mackey, 1997)
Heat shock in rich culture media	<i>S. enterica</i> (Gupte et al., 2003)
Heat-stable autoinducer	<i>E. coli</i> (Reissbrodt et al., 2000) <i>S. enterica</i> (Reissbrodt et al., 2000)
In amoeba	<i>Legionella pneumophila</i> (Steinert et al., 1997)
In animal models	<i>C. jejuni</i> (Baffone et al., 2006; Cappelier et al., 1999) <i>V. vulnificus</i> (Oliver & Bockian, 1995)
Resuscitation promoting factor	<i>S. enterica</i> (Panutdaporn et al., 2006)
Rich culture media	<i>Arcobacter butzleri</i> (Fera et al., 2008) <i>Ent. faecalis</i> (Lleò et al., 1998, 2001) <i>Ent. hirae</i> (Lleò et al., 2001)
Supernatants of growing cells	<i>E. coli</i> (Ozkanca et al., 2009; Pinto et al., 2011)
Temperature upshift	<i>E. coli</i> (Pinto et al., 2011) <i>A. hydrophila</i> (Maalej et al., 2004) <i>E. coli</i> (Pinto et al., 2011) <i>V. parahaemolyticus</i> (Wong et al., 2004) <i>V. vulnificus</i> (Oliver et al., 1995)

3.2.3 Dormance et sporulation

Les stratégies d'adaptation que nous venons de voir ont en commun de conserver une certaine activité métabolique des cellules, souvent réduite mais pas nulle. Cette activité métabolique peut, dans certaines situations, être complètement éteinte. Dans ce cas les cellules sont alors appelées dormantes. Une parfaite illustration de dormance est la sporulation bactérienne. Lorsque soumise à une privation nutritionnelle extrême certaines bactéries peuvent activer une voie génétique leur permettant de réaliser une division asymétrique aboutissant à la formation d'une cellule inactive métaboliquement appelée spore (Stragier and Losick, 1996). Ce phénomène est intensément étudié chez les espèces *Bacillus*. Les étapes de formation de cette spore sont complexes mais désormais connues (figure 22)

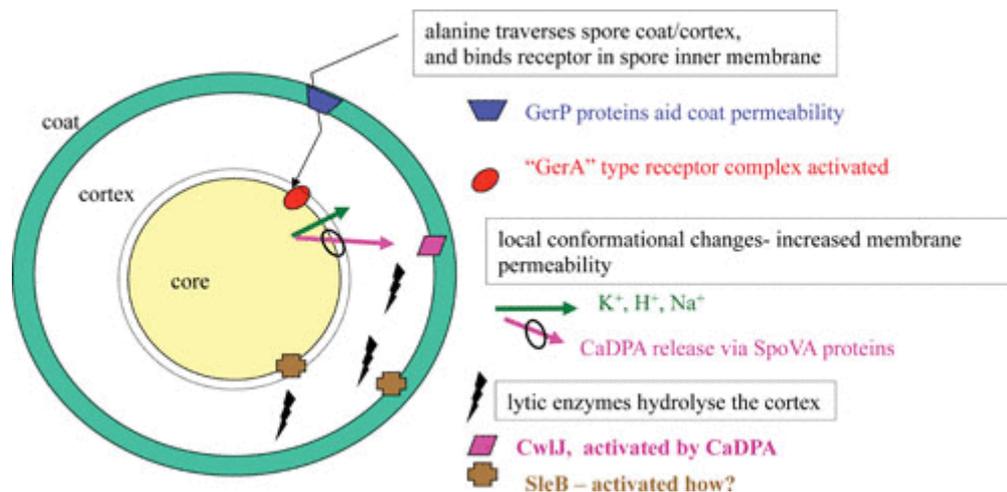
Figure 22 : Etapes de formation d'une spore image tirée de Riley et al., 2020



Dans des conditions de carence, un processus de sporulation se met en place : le chromosome adopte une structuration très allongée appelée filament axial. La division ne s'effectue pas au centre de la cellule mais proche d'un pôle. Le septum se referme sur un des deux chromosomes, piégeant la région origine dans le petit compartiment formé. Avant la fermeture du septum, une protéine homologue à FtsK, SpoIIIE, « aspire » l'ensemble du chromosome resté dans le grand compartiment. Cette protéine permet ensuite d'englober ce petit compartiment, ce qui achève la formation de la spore. Après libération dans l'environnement, la spore pourra survivre très longtemps dans des environnements très rudes en attendant les bonnes conditions pour germer (Riley et al., 2020).

La sporulation est une phase de vie transitoire, ce qui signifie que l'arrêt métabolique n'empêche pas la bactérie de « sentir » la situation de son environnement. Il a été supposé que l'activation de certains récepteurs induirait une réponse permettant la réactivation de la spore retournant ainsi à sa vie proliférative (Figure 23) (Moir and Cooper, 2015).

Figure 23 : Etapes de la germination d'une spore tirée de (Moir and Cooper, 2015)



3.3 Résistance par Perte de la paroi

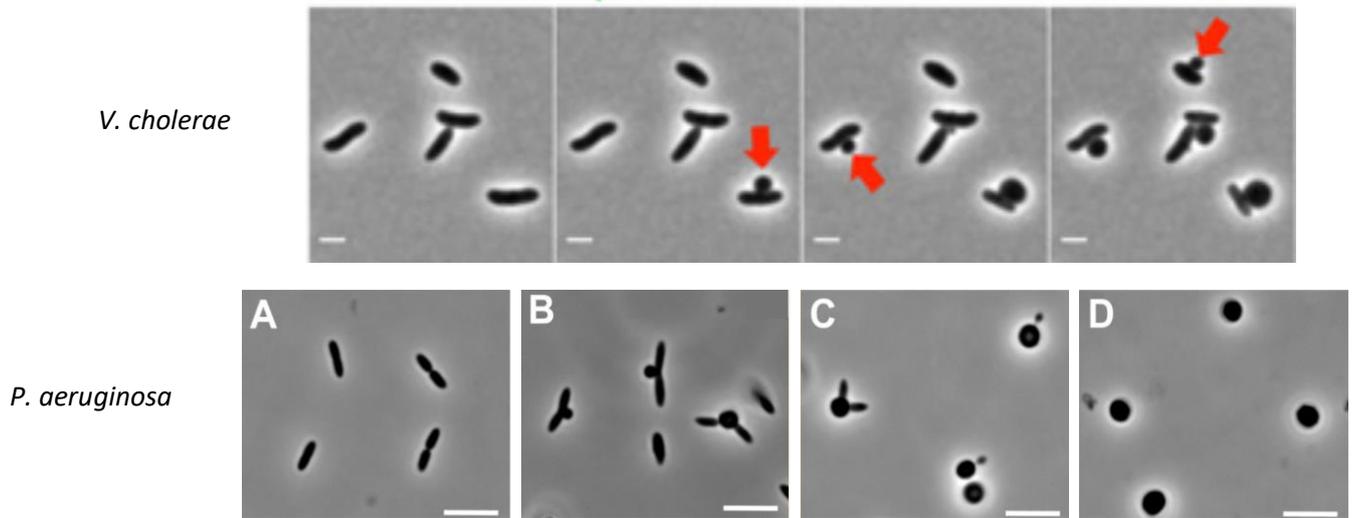
La morphologie est une caractéristique importante des bactéries car définie par leur paroi, qui est essentielle à leur survie. Cependant, l'une des stratégies de survie bactérienne est de sacrifier leur paroi et donc leur morphologie afin de résister aux stress environnementaux. Les cellules qui ont perdu une partie ou la totalité de leur paroi sont appelées CWD pour Cell-Wall Deficient. Cette appellation peut, en réalité, regrouper différents types de cellules dont la paroi a été altérée.

Les CDW peuvent être scindées en deux catégories, les cellules dont la paroi est altérée mais reste partiellement présente et les cellules dont elle est totalement absente. Ainsi les cellules possédant un résidu de paroi sont appelées sphéroplastés alors que celles complètement dépourvues de paroi sont appelées protoplastés (Allan et al., 2009). Au sein de ces deux catégories les cellules peuvent être capables de se répliquer et de se diviser, les protoplastés et sphéroplastés capables d'un tel comportement peuvent être appelés L-formes.

De façon surprenante, l'observation de cellules sans paroi est fréquente chez de nombreuses espèces. Ces cellules CWD ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes aussi bien Gram + que Gram - (Mercier et al., 2014). L'absence de cette paroi requiert donc la présence d'un environnement osmoprotectant afin d'éviter la lyse cellulaire. Dans le cadre de l'étude de ces cellules, l'osmoprotection est généralement apportée par la présence de molécules comme le sucrose ou le glycérol dans le milieu de culture.

La formation des cellules CWD peut être induite par utilisation de molécules visant l'intégrité de la paroi bactérienne comme le lysosyme mais surtout les antibiotiques (Allan et al., 2009). Chez *V. cholerae* et *P. aeruginosa*, il a été montré que l'exposition aux antibiotiques comme la pénicilline induisait la formation de sphéroplastés (Monahan et al., 2014; Weaver et al., 2018) (Figure 24).

Figure 24 : Vidéo microscopie de l'entrée en forme sphéroplaste



Vidéo microscopie d'une culture de *V. cholerae* traitée à la pénicilline G et de *P. aeruginosa* traitée aux méropénèmes. Figure adaptée de Monahan et al., 2014; Weaver et al., 2018

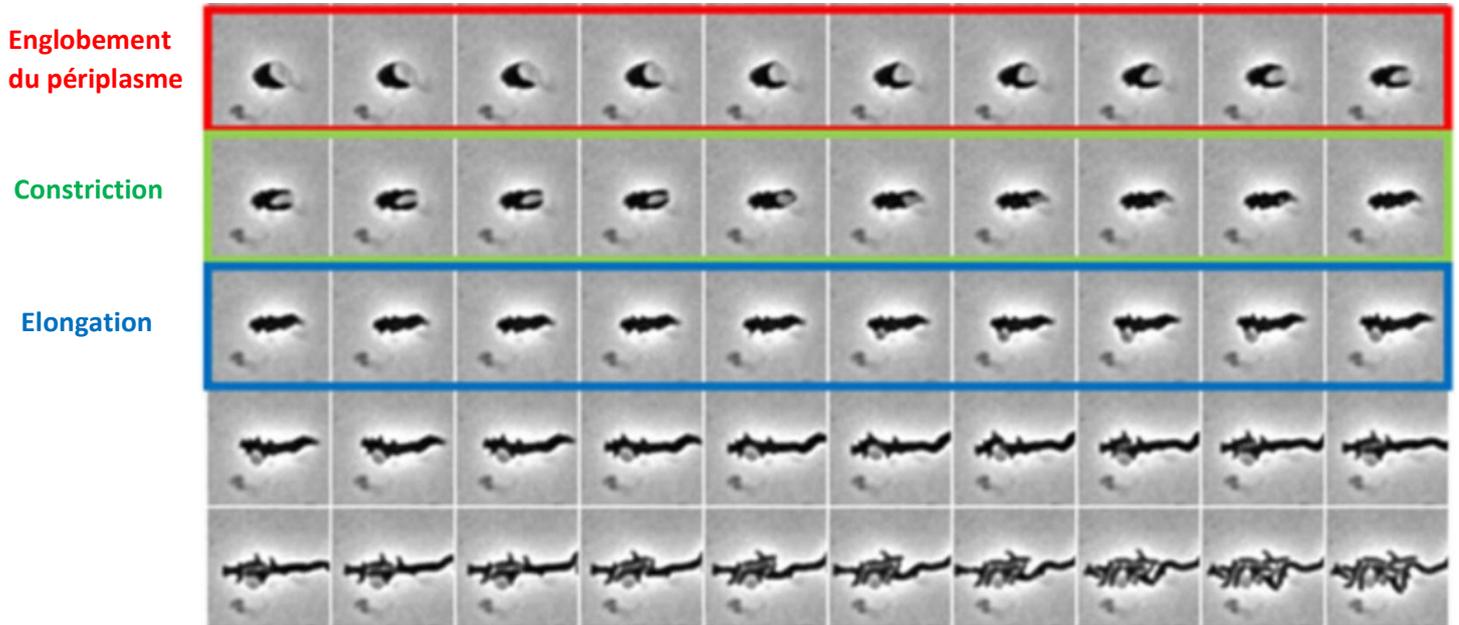
3.3.1 Sphéroplastes

Le traitement de deux espèces différentes avec deux antibiotiques différents aboutit à l'obtention de sphéroplastes suivant un processus semblable (Figure 24). Dans les deux cas, cela est initié par l'apparition d'une boursoufflure au centre des cellules aboutissant à la formation de sphéroplaste. Ainsi obtenus, leur taille continue à augmenter mais ils ne sont pas capables de se diviser (Weaver et al., 2018). Ils ne peuvent donc être appelés L-formes.

Ce processus s'avère être totalement réversible lorsque les antibiotiques sont retirés du milieu (Weaver et al., 2018) (Figure 25). L'équipe de Dörr a ainsi pu mettre en évidence 3 étapes ayant lieu durant ce processus de réversion à la forme proliférative. Les sphéroplastes présentent un important espace périplasmique localisé d'un côté de la cellule. Celui-ci va tout d'abord être englobé dans le cytoplasme : englobement du périplasme. La cellule s'allonge ensuite avant d'effectuer des divisions permettant de rétablir la forme originelle de *V. cholerae* et sa capacité proliférative. Ce mécanisme est donc au cœur des phénomènes de résistance aux antibiotiques ; la survie des bactéries est induite par le traitement lui-même. Les acteurs de la synthèse de la paroi (comme les PBPs) sont essentiels pour cette réversion et sont même surexprimés au cours du processus. Ainsi la présence du système à deux composants impliqué

dans la régulation de la synthèse de ces mêmes gènes de synthèse de la paroi *wigKR* est également impératif (Dörr et al., 2016a; Weaver et al., 2018).

Figure 25 : Vidéo microscopie du retour vers la forme en bâtonnet de *V. cholerae* après traitement aux antibiotiques visant la paroi

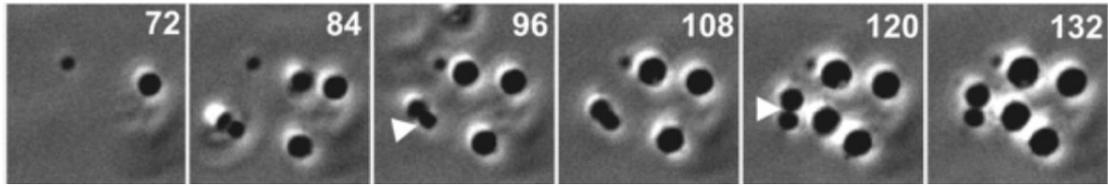


Vidéo microscopie d'une cellule de *V. cholerae* traitée à la pénicilline G puis observée au microscope après lavage. Figure adaptée de Weaver et al., 2018

3.3.2 L-formes

L-formes sont des cellules dont l'altération de la paroi n'empêche pas la croissance ni la division. Ce phénomène a principalement été étudié chez *B. subtilis* mais est également observé chez les bactéries Gram négative (figure 26). Ces divisions sont complètement indépendantes de la machinerie classique de division basée FtsZ (Leaver et al., 2009). Elles associées à une importante synthèse de membrane qui via des mécanismes physiques aboutit à une scission des membranes (Mercier et al., 2013). L'induction de ces L-formes est également réalisée par le traitement de molécules affectant la viabilité de la paroi bactérienne (lysosyme, antibiotiques etc...).

Figure 26 : Vidéo microscopie de la division de L-forme chez *B. subtilis*



Vidéo microscopie d'une culture de *B. subtilis* traitée au lysozyme puis observée au microscope. Images tirées de Domínguez-Cuevas et al., 2012

Résultats

Chapitre 1 : Le L-Arabinose induit la sphéroplastisation réversible de *V. cholerae* due à un catabolisme illégitime toxique

1.1. Le L-Ara provoque l'arrêt de la prolifération et la perte de la forme de *V. cholerae*

Comme décrit dans l'introduction, le stress peut prendre de nombreuses formes (températures, PH, antibiotiques etc...) et induire une pléthore de réponses cellulaires. Parmi ces réponses, on retrouve des modifications du peptidoglycane (Alvarez et al., 2021), des changements d'expressions géniques (Lacour and Landini, 2004) et parfois même la perte complète de la morphologie cellulaire (Ranjit and Young, 2013; Weaver et al., 2018). Cette transition morphologique est observable chez *V. cholerae* après une incubation prolongée à une température basse ou encore à la suite d'un traitement aux antibiotiques visant la paroi. Au laboratoire, nous avons découvert une nouvelle façon d'induire cette transition morphologique chez cette bactérie : L'utilisation du L-Arabinose.

Le L-Arabinose (L-Ara) est un sucre fréquemment utilisé dans les laboratoires. Il est par exemple, utilisé pour induire l'expression de gènes d'intérêt mis sous le contrôle du promoteur pBAD, promoteur des gènes codant les enzymes de la voie de catabolisme de l'arabinose. Dans le cas de cette utilisation, ce sucre peut être, sans altérer les expériences, introduit jusqu'à une concentration de 0.4%. Cependant, dans le cas de la bactérie *V. cholerae*, nous avons réalisé que, dans certains cas, si nous ajoutions ce sucre à une concentration de 0,1% au milieu contenant déjà sa propre source de carbone, la croissance de la culture cellulaire était stoppée presque instantanément. Dans cette étude, nous utiliserons, lorsque non précisé autrement, la souche sauvage de *V. cholerae* N16961.

1.1.1 Effet du L-Ara sur la croissance et la forme de *V. cholerae*

Afin de comprendre ce phénomène, nous avons tout d'abord réalisé des courbes de croissance bactérienne avec différents milieux de culture et différentes concentrations de L-

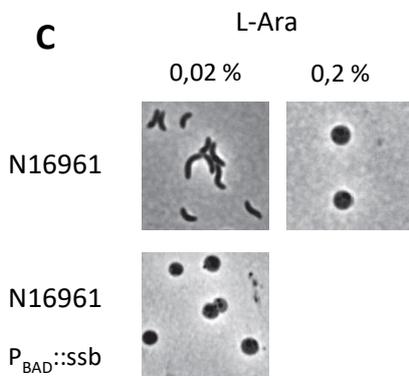
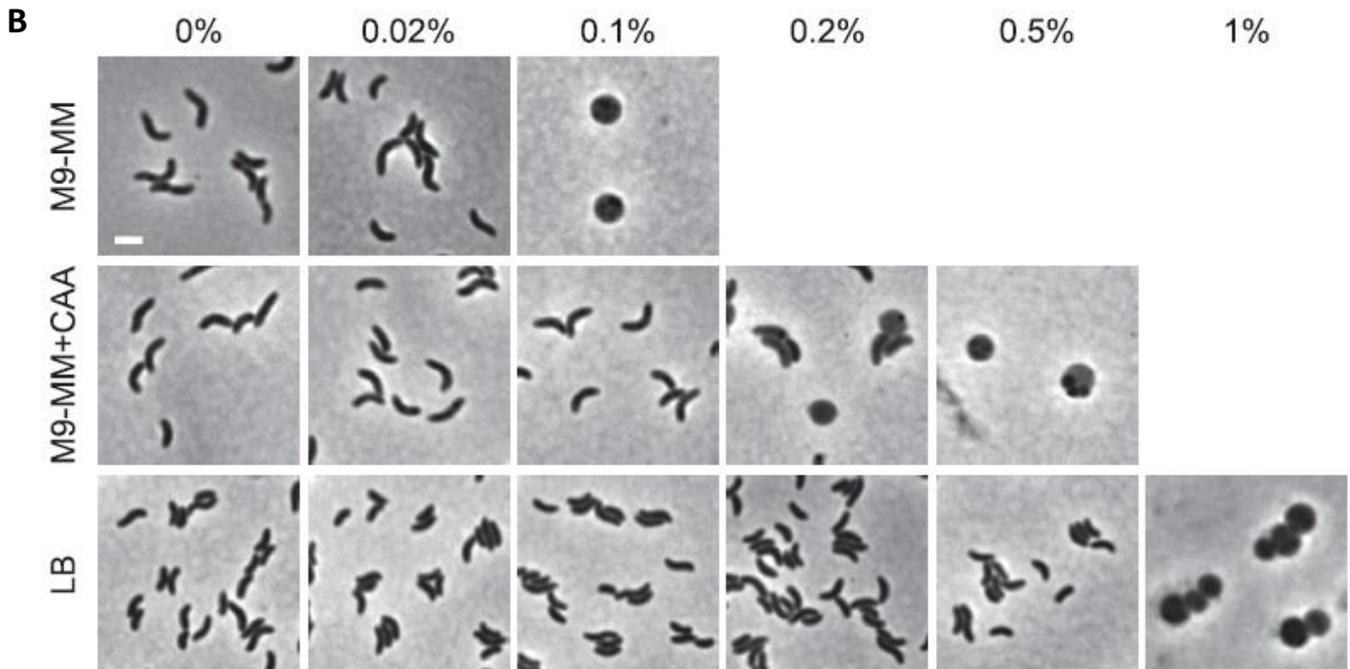
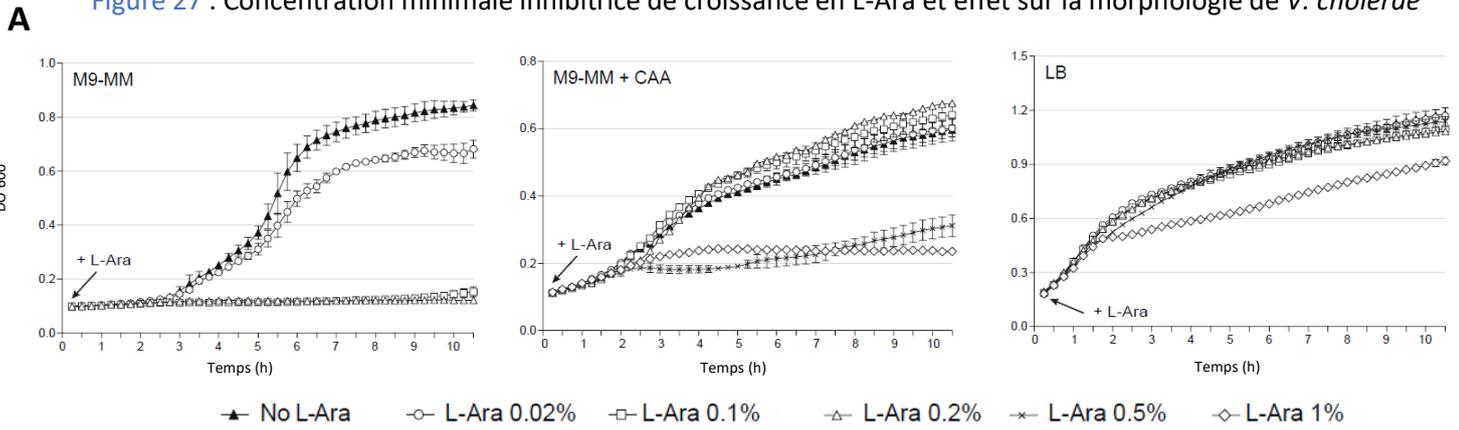
Arabinose ([figure 27 A](#)). Nous constatons un arrêt de la prolifération pour une concentration en L-Ara de 0,1% en milieu M9-MM, de 0,5% en milieu M9-MM supplémenté en Casamino acids et un arrêt partiel à 1% en milieu riche LB. La richesse du milieu semble donc influencer de manière importante le processus : plus le milieu est riche plus la concentration de L-Ara doit être élevée pour stopper la croissance. La morphologie des cellules dans les différentes conditions a été observée par microscopie, après 8h ([figure 27 B](#)). On constate que dans toutes les conditions provoquant l'arrêt de la croissance, plus de 90% de la population cellulaire est de forme sphérique. Il semble donc y avoir une corrélation entre l'inhibition de la croissance et la transition morphologique vers une forme sphérique non proliférative.

Pour la suite des expériences, nous avons décidé d'utiliser le milieu M9-MM et une concentration en L-Ara de 0,2% (sauf si précisé autrement).

Une partie des résultats présentés dans ce premier chapitre a été publiée dans le journal *Applied and Environmental Microbiology* (l'article est disponible en [annexe n°4](#)).

Il est également important de noter que toutes les souches de *V. cholerae* ne se comportent pas toutes de la même façon face au L-Ara. En effet, la majorité des souches requière 0,1 à 0,2 % de L-Ara pour induire la forme sphérique sur la population bactérienne en milieu M9-MM. Cependant, nous avons également pu observer que certaines souches mutantes présentaient une hyper-sensibilité au L-Ara. La souche portant une copie mutante ectopique du gène *ssb* codant une protéine impliquée dans de nombreux processus cellulaires (réplication, transcription etc) ne requiert que 0,01% de L-Ara pour induire la forme sphérique, soit 10X moins que pour la majorité des souches ([Figure 27 C](#)).

Figure 27 : Concentration minimale inhibitrice de croissance en L-Ara et effet sur la morphologie de *V. cholerae*

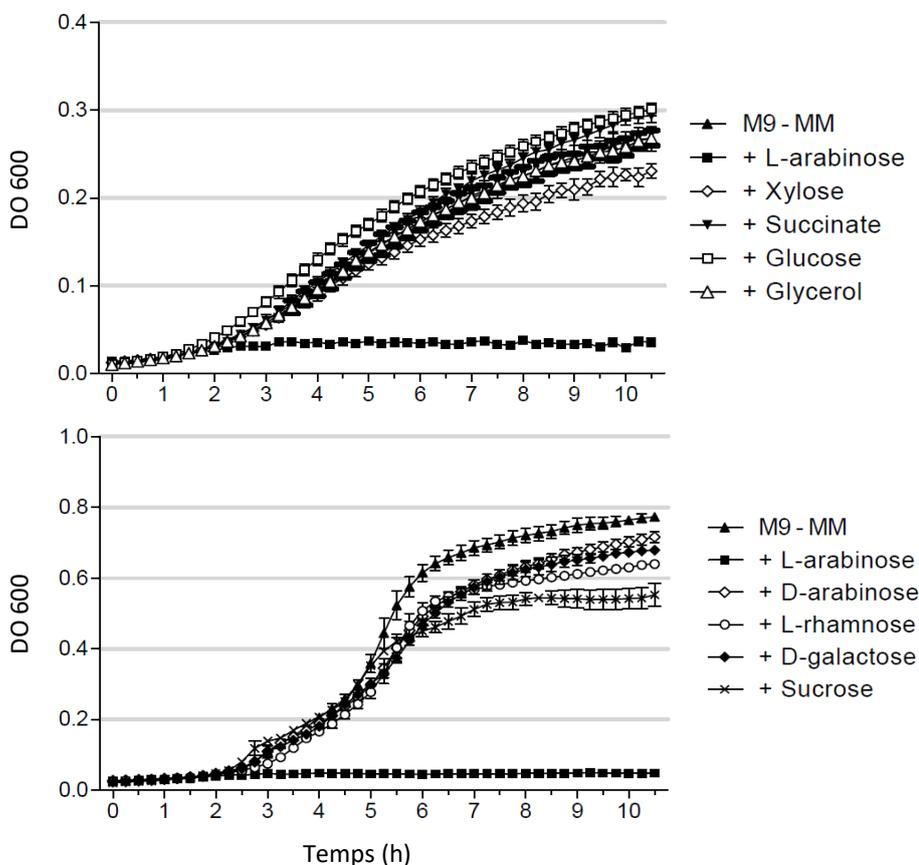


(A) Courbes de croissance de la souche sauvage cultivée à 30°C dans les conditions décrites (CAA=casamino acids) avec ajout de différentes concentrations de L-Ara. Le L-Ara est ajouté 1h après dilution d'une culture de nuit. (B) Photos de la souche sauvage cultivée 8h à 30°C dans les conditions décrites, le L-Ara est ajouté 1h après dilution d'une culture de nuit à DO 0.02. L'échelle représente 2µm. (C) Comparaison de l'effet de la concentration du L-Ara sur différentes souches de *V. cholerae*, ici la souche sauvage (N16961) et une souche modifiée issue de la souche sauvage. Les cultures ont été réalisées à 30°C l'arabinose ajouté 1h après dilution des cultures de nuit do 0,02, photos présentent 8h après ajout du L-Ara.

1.1.2 Effet d'autres sucres sur la croissance et la forme de *V. cholerae*

Nous avons également testé différents sucres afin de savoir si l'inhibition de croissance ainsi que la transition morphologique étaient aussi causées par d'autres composants et notamment la forme D de l'arabinose. Pour cela nous avons utilisé le milieu M9-MM (fructose 0.4%), puis nous avons ajouté différents sucres avec une concentration de 0,2 %, sauf pour le glycérol utilisé à 10% (figure 28). De tous les sucres testés, seul le L-Arabinose affecte la croissance de *V. cholerae*. De manière surprenante, la version D de ce sucre n'induit pas le même phénotype que sa version L. La morphologie des cellules de chaque culture a également été vérifiée au microscope après 8h de traitement avec chaque sucre ; seul le traitement au L-Ara présente une inhibition de croissance et une modification morphologique vers une forme sphérique non proliférative.

Figure 28 : Effet de différents sucres sur la croissance de *V. cholerae*

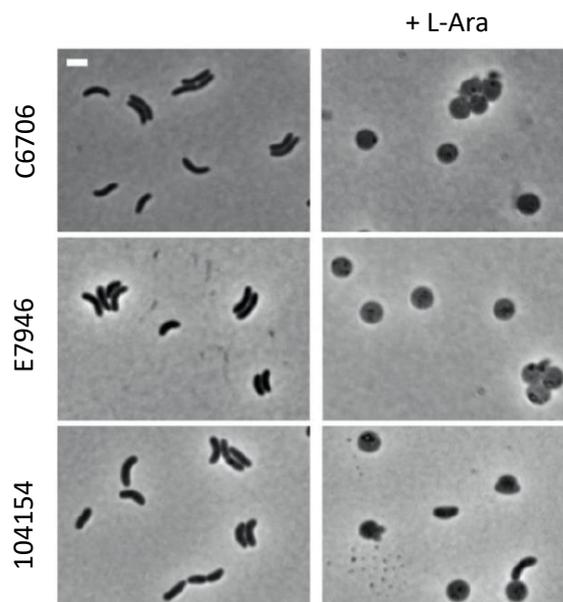


Courbes de croissance réalisées en milieu minimum M9-MM avec ou sans ajout de divers sucres. Un seul sucre est ajouté à chaque fois, 1h après dilution d'une culture de nuit avec une concentration de 0,2% sauf pour le glycérol qui a été ajouté à hauteur de 10%.

1.1.3 Effet du L-Ara sur la croissance d'autres souches de *V. cholerae*

Au laboratoire, nous utilisons la souche de la bactérie *V. cholerae* N16961 qui est pathogène. Nous nous sommes donc demandé si l'effet du L-Ara était aussi observable sur d'autres souches (pathogènes ou non) de cette espèce. Ainsi la sensibilité au L-Ara de deux nouvelles souches pathogènes (C6706 et E7946) et une souche non pathogène (104154) a été testée en [figure 29](#). Les trois autres souches réagissant de manière similaire à N16961, la sensibilité au L-Ara semble donc partagée par les différentes souches de *V. cholerae*.

Figure 29 : Effet du L-Ara sur diverses souches de *V. cholerae*



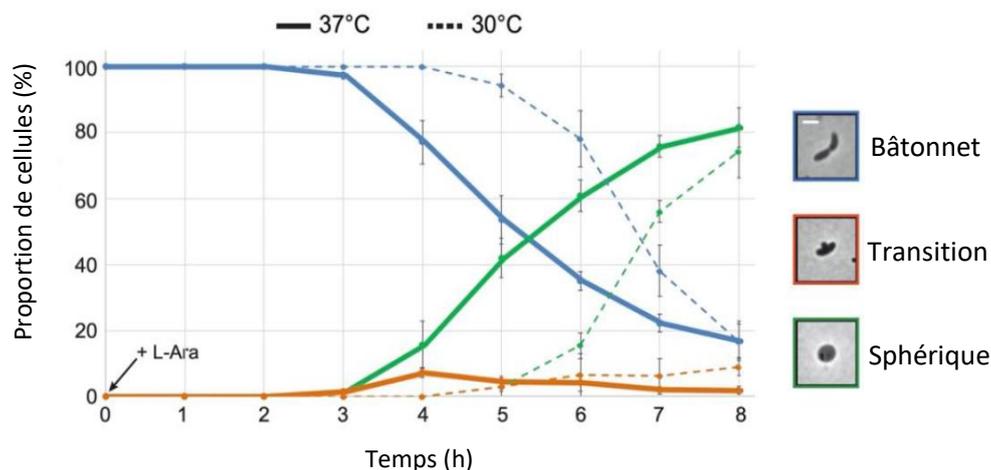
Photos des souches de *V. cholerae* avec et sans traitement au L-Ara. Le L-Ara a été ajouté 1h après dilution de la culture de nuit et les photos présentent 8h après traitement au L-Ara et en phase exponentielle pour les cellules non traitées. L'échelle représente 2 μ m.

1.2 Cinétique de la transition morphologique de *V. cholerae* provoquée par le L-Ara & Viabilité des cellules sphériques

Pour caractériser de manière plus approfondie le phénotype provoqué par le traitement au L-Ara (M9-MM L-Ara 0,2%), nous avons réalisé une cinétique de la transition morphologique. La proportion de cellules sphériques au sein d'une culture traitée au L-Ara à 30°C a été évaluée en dénombrant les sphères et les bâtonnets toutes les heures, par analyse

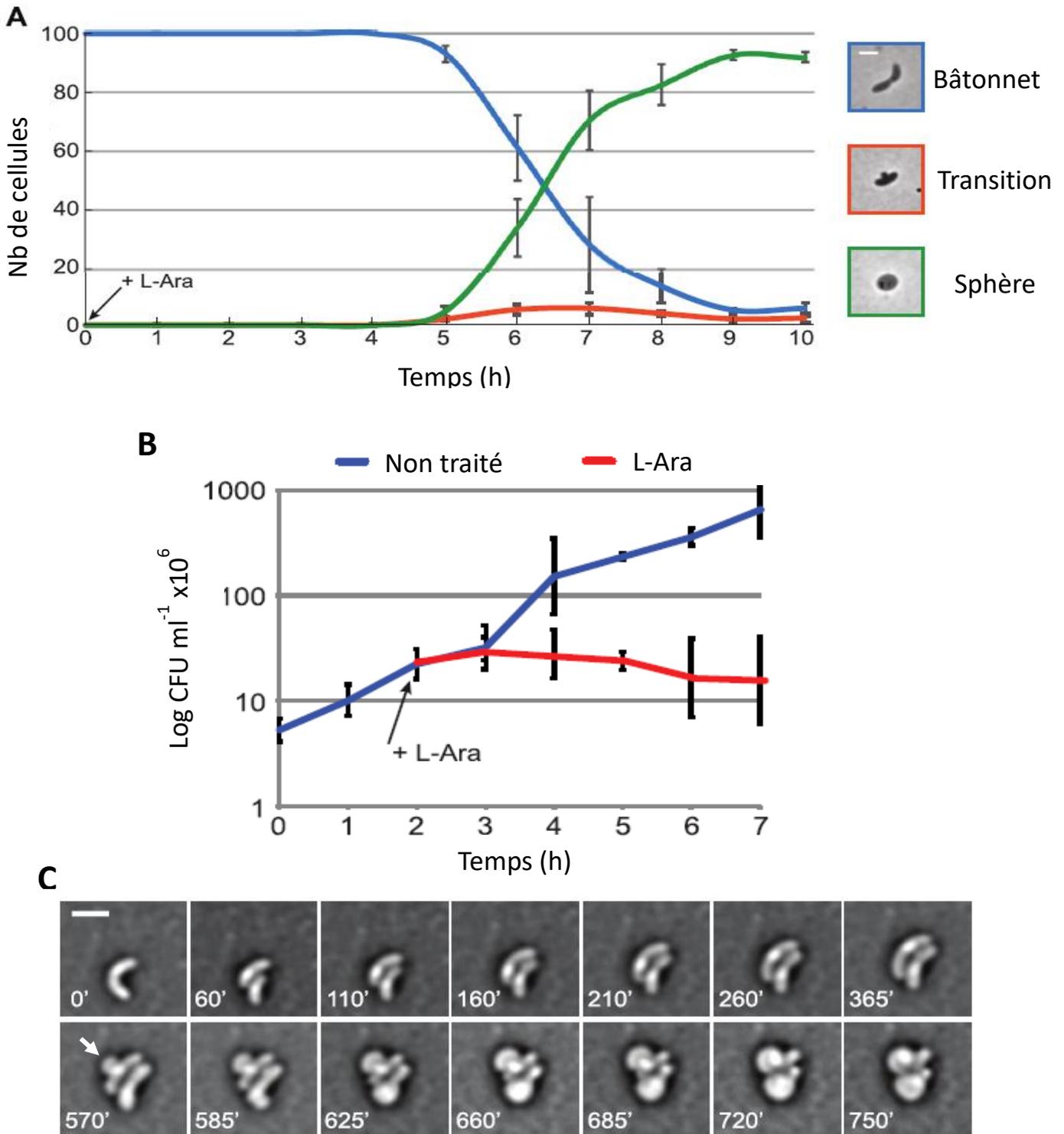
des images de microscopie. Parallèlement, des étalements sur boîtes ont été réalisés afin de déterminer la proportion de cellules viables. Les résultats de ces expériences sont montrés dans la [figure 30](#). Les premières bactéries sphériques sont observables après 5h ([figure 30 A](#)) de traitement L-Ara ; la majorité de la population (>90%) adopte cette forme après environ 9h. Nous avons pu remarquer que l'élévation de la température à 37°C (température du corps humain, hôte de *V. cholerae*) durant l'incubation avec le L-Ara permettait d'augmenter la vitesse de la transition vers la forme sphérique de quelques heures ([Figure 31](#)). Les premières cellules sphériques apparaissent après 5h à 30°C contre 3h à 37°C.

Figure 31 : Transition morphologique 37°C vs 30 °C



Cinétique de la transition morphologique vers la forme sphérique, la morphologie a été inspectée par microscopie toutes les heures. Une photo de chaque catégorie est représentée (bâtonnet, transition, sphérique) ces résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes, l'écart type est indiqué. L'expérience réalisée à 37°C est en trait plein, celle réalisée à 30°C en pointillé. La souche sauvage a été utilisée en milieu M9-MM.

Figure 30 : Transition morphologique : vitesse, caractéristique et viabilité



(A) Cinétique de la transition morphologique vers la forme sphérique, la morphologie a été inspectée par microscopie toutes les heures. Une photo de chaque catégorie est représentée (bâtonnet, transition, sphérique) ces résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes l'écart type est indiqué. (B) La souche sauvage a été étalée sur boîte toutes les heures en présence ou absence de L-Ara les valeurs sont la moyenne de 3 expériences indépendantes, l'écart type est indiqué. (C) Vidéo-microscopie de la transition vers la forme sphérique, observée sur pad d'agarose contenant 0.2% de L-Ara. Ces expériences ont été réalisé avec la souche sauvage dans un milieu M9-MM à 30°C.

Alors que l'effet morphologique requiert quelques heures avant d'être observable, l'effet sur la croissance est quasiment immédiat comme vu sur les suivis de croissances (figure 27 A). En ce qui concerne la viabilité, on remarque que le nombre de CFU ne chute pas. Il reste identique au nombre obtenu au moment de l'ajout du L-Ara contrairement au contrôle sans traitement qui augmente (figure 30 B). Le nombre de cellules capables de former des colonies sur boîte LB sans arabinose reste identique au nombre avant addition d'arabinose pendant au moins 7h. Puisque le nombre de cellules n'augmente pas et que le nombre de cellules viables reste stable, nous pouvons conclure que ce phénotype de transition morphologique n'est pas létal et doit être réversible.

Ce phénomène de transition a été suivi par vidéo-microscopie permettant de confirmer l'absence de prolifération cellulaire après addition de L-Ara et également de révéler l'existence d'une forme « transitoire ». En effet, la transition entre bâtonnet et sphère est progressive et débute par l'observation d'une boursouflure sur la paroi du bâtonnet (figure 30 C panel 570'). Cette « boursouflure » s'accroît au cours du temps pour aboutir à la formation d'une cellule sphérique. Cette transition est assez longue sur milieu solide puisque la transition complète prend plusieurs heures (au minimum 3h). Cependant, les analyses en milieu liquide (figure 30 A) suggèrent que la transition s'effectue plus rapidement car la proportion de cellule en transition n'a jamais excédé quelques % de la population et ce malgré l'augmentation du nombre de cellules sphériques. La zone d'apparition de cette boursouflure ne semble pas prédéfinie. En effet, l'analyse de nombreuses images montre que celle-ci peut se former aussi bien au pôle que sur la partie centrale -concave ou -convexe (Figure 32).

Figure 32 : Zone d'apparition de la « boursouflure de transition »



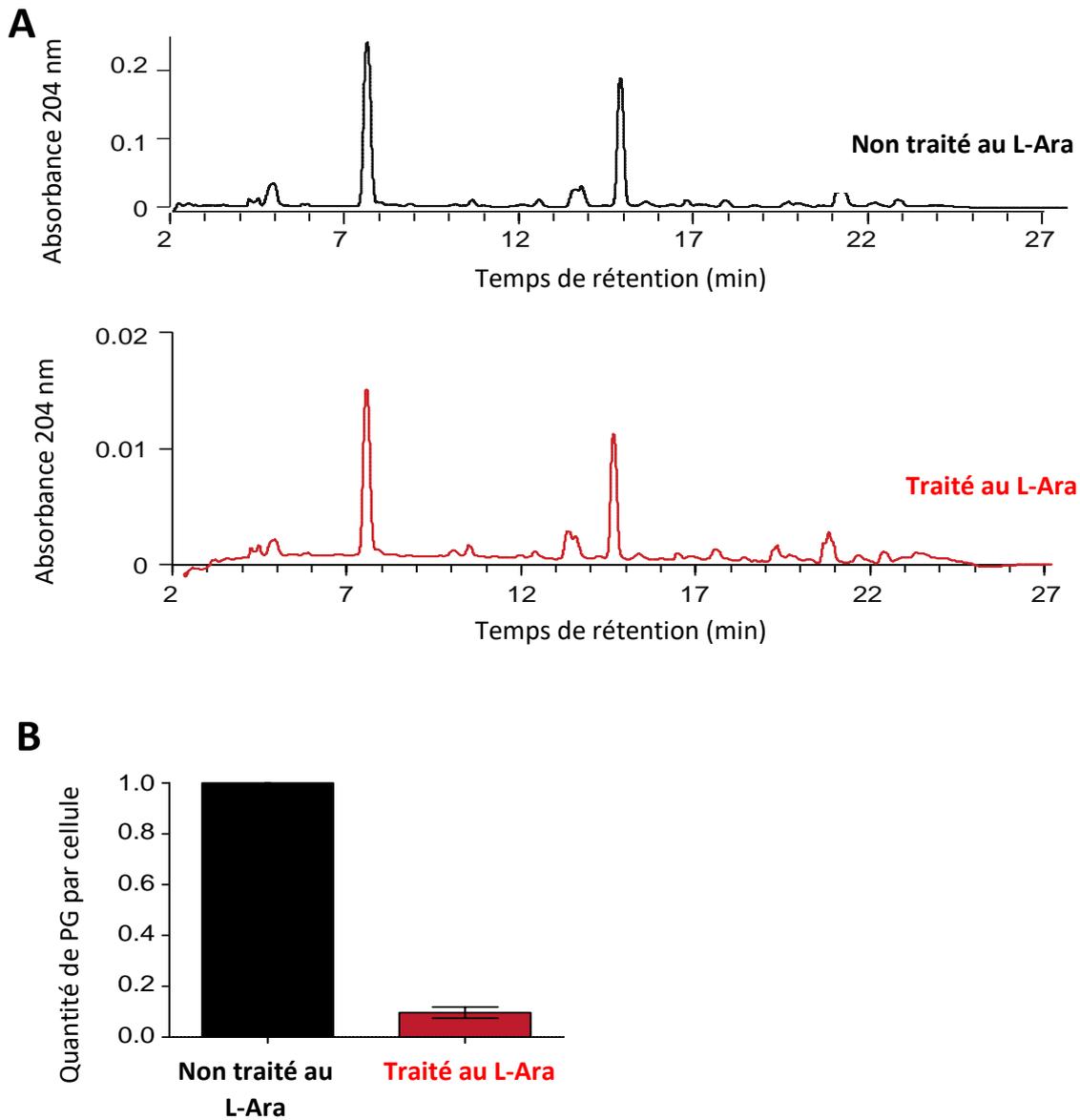
1.3 La transition morphologique induite par le L-Ara est causée par une dégradation du peptidoglycane : Sphéroplastisation

Comme vu dans l'introduction, la forme d'une bactérie est déterminée par la structure de sa paroi et principalement l'assemblage de sa couche de peptidoglycane (PG). Ainsi, en collaboration avec l'équipe de F. Cava (Sweden, Umeå University), nous nous sommes intéressés à la quantité et à la composition du peptidoglycane des cellules sphériques traitées au L-Ara (voir [figure 33](#) et [tableau 1](#)).

Pour cette expérience, il était important de ne pas être contaminée par des cellules bâtonnets et donc nous avons recouru à une souche de *V. cholerae* extrêmement sensible à l'effet du L-Ara, générant une population de sphères quasiment pure. Nous avons donc utilisé la souche EGV 217 (voir [tableau des souches](#)).

La quantité de PG de la population de cellule traitée au L-Ara par rapport à celle de la population non traitée peut être estimée en comparant, pour un même nombre de cellule, la quantité de l'ensemble des composants du PG par spectrométrie de masse. Après 8h de traitement à l'arabinose, la proportion de PG n'est plus que de 10% par rapport à une culture non traitée ([figure 33 B](#)). Ce résultat suggère que la transition morphologique est la conséquence d'une dégradation et/ou d'une absence de régénération du PG en condition L-ara et non pas à un changement de forme à proprement dit. En plus de la quantité globale de peptidoglycane des cellules dans nos deux conditions, nous avons également pu détailler la composition précise de celui-ci. L'analyse de la composition du peptidoglycane ([Tableau 1](#)) révèle des différences d'organisation statistiquement pertinentes.

Figure 33 : Quantification du Peptidoglycane de *V. cholerae* par spectrographie de masse



(A) Profile représentant la séparation des muuropeptides par HPLC pour les cellules traitées ou non au L-Ara. **(B)** Quantification du peptidoglycane dans les cellules traitées ou non au L-Ara. La quantité obtenue par cellule a été normalisée par la valeur obtenue pour les cultures non traitées. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, l'écart type est représenté. La valeur du peptidoglycane par cellule est statistiquement différente entre les deux condition $P < 0,0002$ (t-test).

En effet, les peptides au sein de la structure sont moins présents sous forme de monomères, et l'augmentation des anhydro-muropeptides nous indique que les chaînes de sucres sont également en moyenne moins longues, mais présentent beaucoup plus de cross link avec les peptides. Le traitement au L-Ara semble donc affecter la synthèse ou le renouvellement correcte du PG car réduit à 10% mais modifie également son organisation conventionnelle.

Tableau 1 : Composition du peptidoglycane

Paramètres	Exp	L-Ara
Monomères (%) *	48,1 ± 0,6	40,2 ± 3,2
Dimères (%)	43,1 ± 1,9	47,2 ± 3,1
Trimères (%)	8,8 ± 2,5	12,6 ± 4,8
Anhydro-muropeptides (%) *	14,8 ± 2,3	21,9 ± 3,7
DAP-DAP cross-linked muropeptides (%) *	4,9 ± 0,7	7,5 ± 0,9
Total cross-linkage (%) *	37,7 ± 1,4	47,2 ± 5
Taille de la chaîne de sucre (%) *	11,7 ± 1,4	7,5 ± 1,1

* P value <0,05 sur T-test

Les valeurs indiquées sont les moyennes issues de 3 expériences indépendantes

1.4 *V. cholerae* semble cataboliser le L-Ara par une voie illégitime toxique

Au vu des résultats précédents, il semble donc que le L-Ara soit toxique pour notre bactérie. Afin de comprendre comment cette toxicité affecte *V. cholerae*, une recherche de mutants résistants à l'effet du L-Ara a été entreprise. Pour cela, nous avons traitée au L-Ara une banque de mutants de *V. cholerae* obtenue par insertion aléatoire d'un transposon. La résistance au L-ara d'un mutant conduit à une augmentation de sa proportion au sein de la banque après ajout du sucre. La proportion de chaque mutant au sein de la population a été

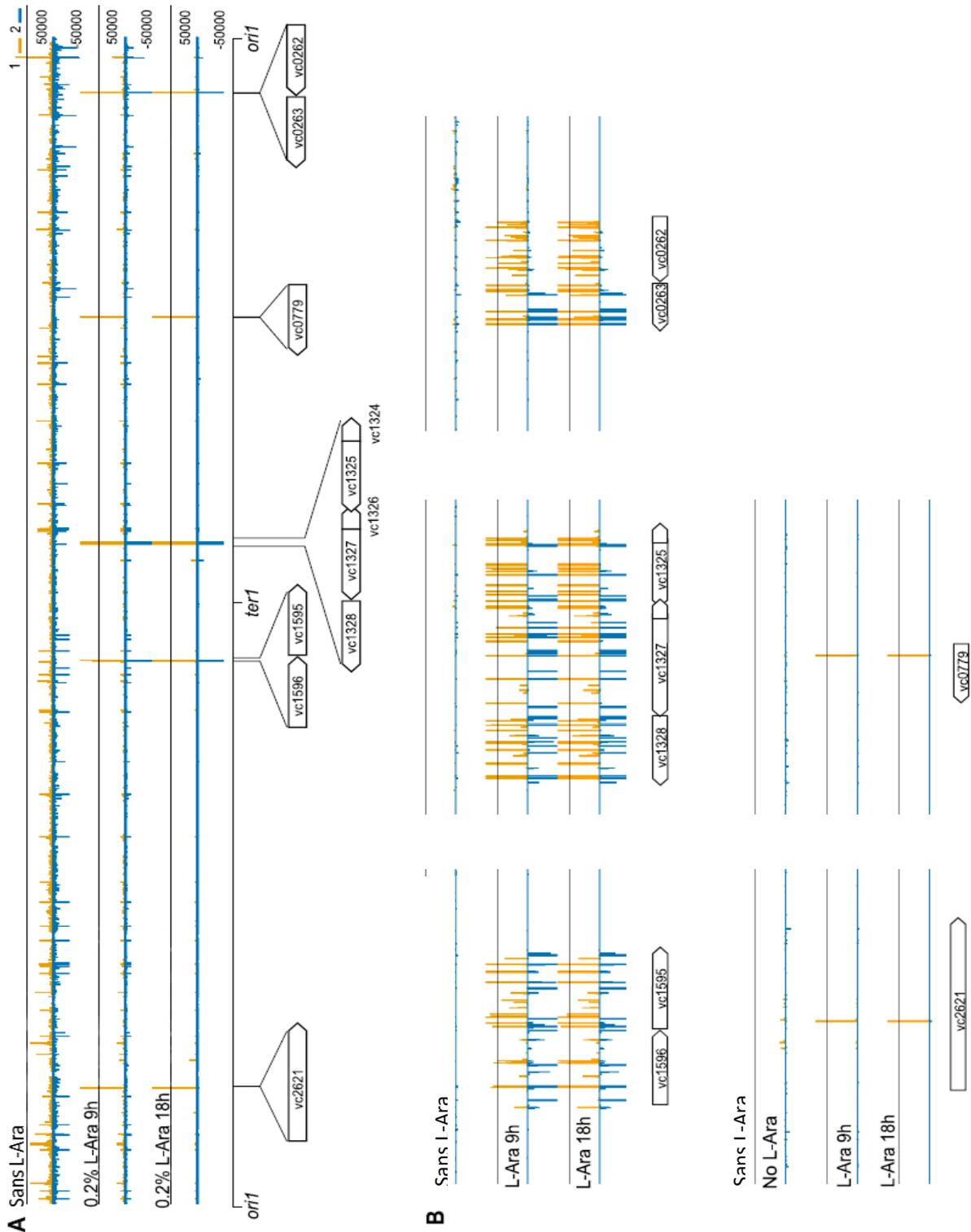
déterminée par séquençage massif de toutes les jonctions entre le transposon et le génome. Cette proportion a été mesurée avant traitement au L-Ara puis 8h et 18h après. Les résultats de cette expérience sont présentés en [figure 34](#). Comme attendu, les « reads » ou événements de séquençage du contrôle sans traitement au L-Ara sont répartis sur l'intégralité du génome, à l'exception des gènes essentiels qui sont absents. En revanche, la grande majorité des « reads » obtenus pour les 2 autres conditions (8h et 18h après traitement au L-Ara) est répartie sur seulement 9 gènes. Après analyse de la répartition intra génique des « reads », les gènes VC2621 et VC0779 ont été exclus car les reads obtenus pour ces gènes ne sont pas répartis sur toute la séquence mais en un unique site et uniquement sur l'un des deux brins. De même, le gène VC0262 ne fut pas retenu car les « reads » étaient bien répartis sur le gène mais ne correspondaient qu'à l'un des deux brins.

Par une expérience complémentaire de criblage sur boîte LB contenant du L-Ara, on retrouve 6 mutants dont les 5 déjà identifiés ([tableau 2](#) :VC0263, 1325, 1327, 1328, 1595) et un nouveau gène a pu être identifié VC2689. Le nom et fonction supposée de ces 6 gènes sont détaillés en [tableau 2](#), les fonctions supposées de ces gènes ont été déterminées par analyse bio-informatique basées sur l'homologie de séquence.

Tableau 2 : Nom et fonctions des suppresseurs identifiés par criblage

N° du gène	Fonction supposée
VC0263	Galactosyl-transferase
VC1325	Galactoside ABC transporter, periplasmic D-galactose/D-glucose binding protein
VC1327	Galactoside ABC transporter, ATP-binding protein
VC1328	Galactoside ABC transporter, permease protein
VC1595	Galactokinase
VC2689	6-Phosphofructokinase, isozyme I

Figure 34 : Répartition des transposons dans les différentes conditions de culture.

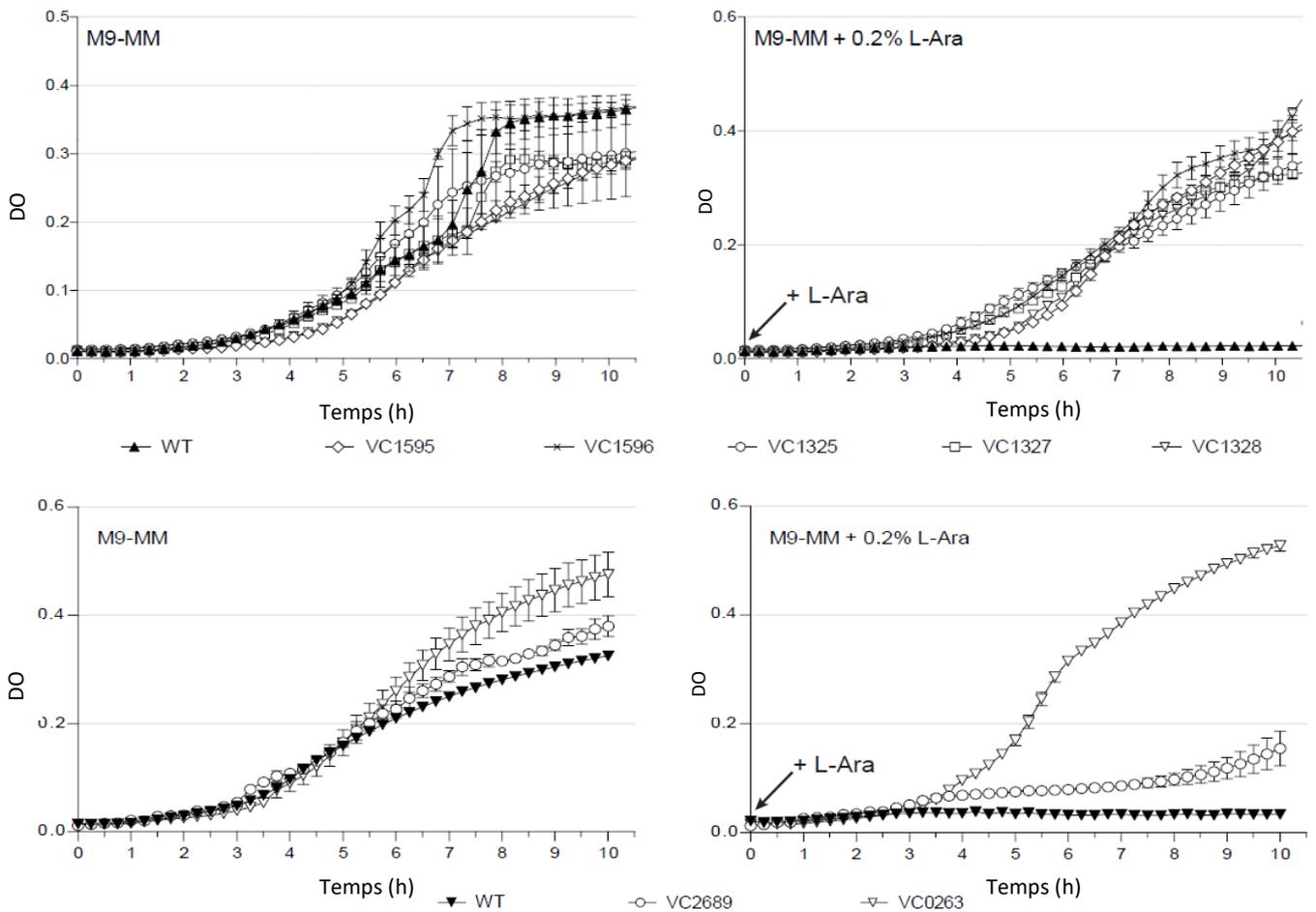


La banque de mutants par transposition a été réalisée dans une souche sauvage. Les échantillons ont été prélevés pour séquençage avant l'ajout de 0,2% de L-Ara puis après 8 et 18h. **(A)** Profil d'insertion du transposon sur le chromosome 1, les régions du chromosome sont indiquées sous le profil. **(B)** Zoom des régions montrant une augmentation significative du nombre d'insertion du transposon.

Avant de nous intéresser à la putative fonction de ces mutants, nous avons tout d'abord réalisé une délétion propre et indépendante de ces gènes avant de tester leur sensibilité au L-Ara. Pour cela nous avons réalisé des courbes de croissance en présence ou absence de L-Ara ([Figure 35](#)). En absence de L-Ara, le profil obtenu des 6 mutants suggèrent une capacité de croissance similaire à la souche sauvage, i.e, aucun des mutants ne montre une incapacité à proliférer. En présence de L-Ara, on observe comme attendu que la souche sauvage est incapable de proliférer (triangle plein). Cependant, l'addition d'arabinose n'entraîne plus d'arrêt de prolifération pour les mutants. Leur croissance est similaire à celle sans L-Ara à l'exception du mutant du gène VC2689 qui prolifère très faiblement. Parallèlement, les cultures ont été observées au microscope. Aucune des cultures issues des souches mutantes ne subit de transition morphologique après traitement au L-Ara.

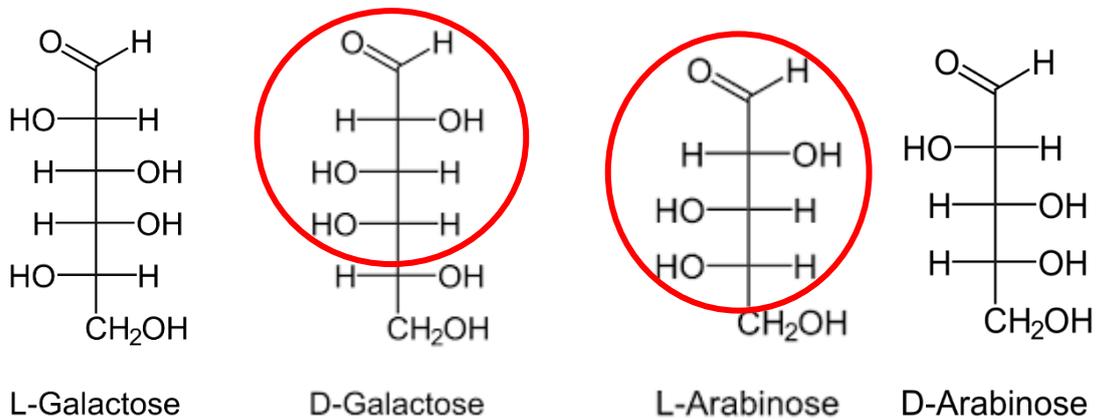
Après vérification de l'insensibilité de nos mutants au L-Ara nous nous sommes intéressés aux fonctions potentielles de nos mutants ([tableau 2](#)). D'après les homologies de séquence, 5 des 6 suppresseurs identifiés (tous sauf VC0263) seraient impliqués dans la même voie métabolique : La voie de dégradation du galactose. Le galactose est un sucre à 6 atomes de carbone contrairement à l'arabinose qui n'en possède que 5. Malgré cette différence, on peut noter que la structure du L-Ara présente des similarités avec celle du D-galactose (voir [figure 36](#)). Le L-Ara et le D-galactose sont, pour ces sucres, les énantiomères les plus retrouvés.

Figure 35 : Croissance des supresseurs en présence et absence de L-Ara



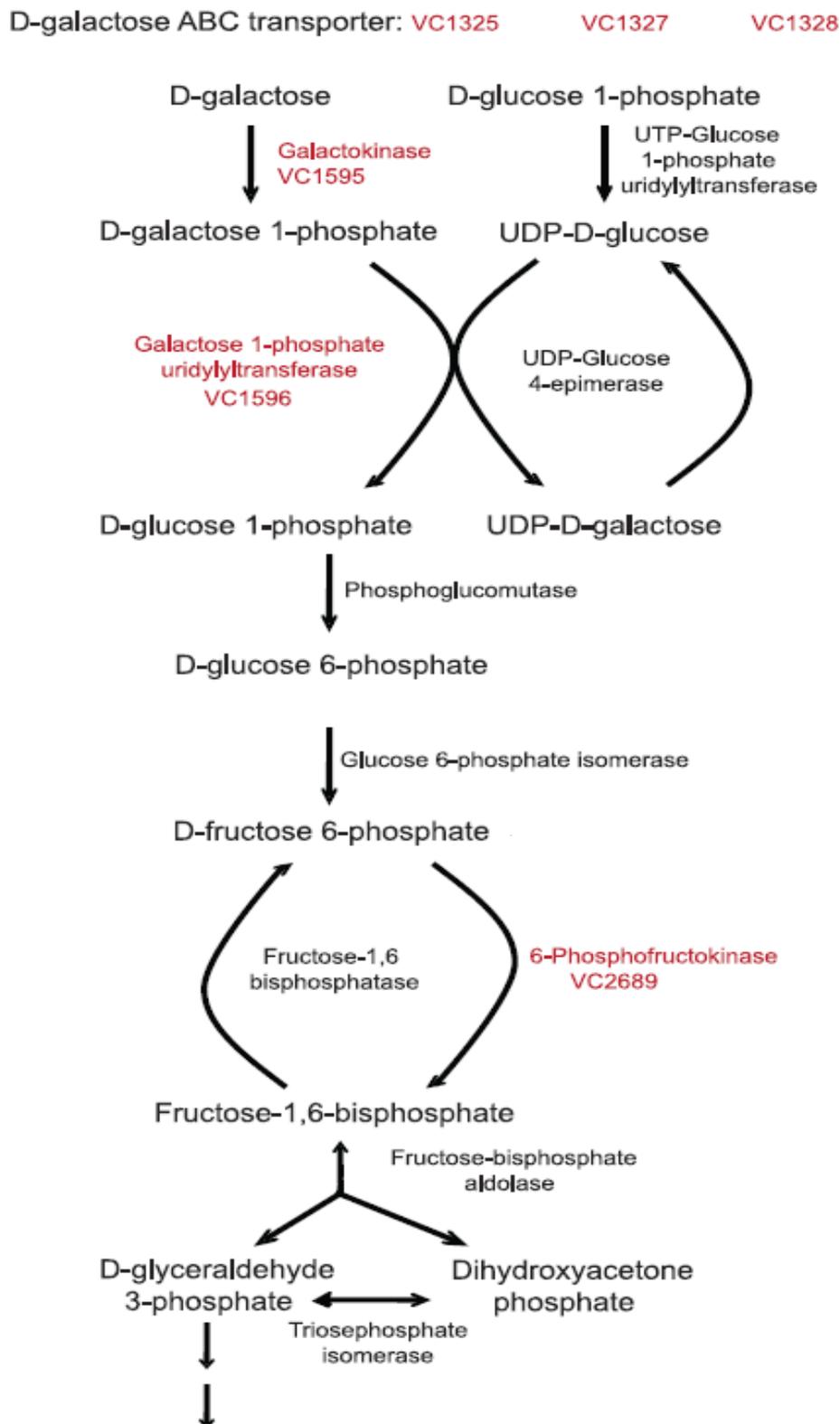
Courbes de croissance réalisées sur les mutants identifiés lors du crible avec la banque de transposition. Les mutants sont indiqués par des formes géométriques, les cultures ont été réalisées avec ou sans L-Ara 0,2% à 30°C. La densité optique a été mesurée à 600 nm, les valeurs sont la moyenne de 3 répliques indépendants, l'écart type est représenté.

Figure 36 : Structures du galactose et de l'arabinose



Nous savons cependant que l'utilisation du D-galactose n'induit aucun arrêt de croissance chez *V. cholerae* (figure 28). Nous nous sommes donc intéressés à la voie du galactose chez *V. cholerae* ; son cycle catabolique est représenté en figure 37. Comme on peut le voir sur cette figure, les 6 supresseurs se situent relativement au début de la voie, notamment les gènes VC1325,27 et 28 qui sont les gènes responsables de l'import du D-galactose dans la cellule. Cela semble indiquer que le L-Ara est importé dans la cellule via le même transporteur ABC que le D-galactose. En effet, *V. cholerae*, d'après les annotations de la séquence du génome dans GenBank, ne possède ni les gènes liés à la dégradation de l'arabinose ni ceux dédiés à son import dans le cytoplasme. L'introduction d'un transposon dans le système d'import du D-galactose aboutissant à une suppression du phénotype du L-Ara nous permet donc de supposer que ces deux sucres utilisent le transporteur ABC (VC1325, 1327, 1328). Les autres supresseurs sont potentiellement impliqués dans le catabolisme du D-galactose qui a pour but sa transformation en glucose-6-phosphate puis en fructose -6-phosphate. Il semblerait donc que ces enzymes confondent le galactose avec le L-Ara et que la dernière étape de ce catabolisme contre-nature aboutisse à un composé toxique pour la cellule. Nous pourrions même supposer que le système responsable de l'import du D-galactose reconnaît la partie entourée en rouge sur la figure 36, car cette partie est commune avec le L-arabinose. Une détoxification semble possible puisque la cellule reste capable de former une colonie sur boîte dépourvue de L-Ara.

Figure 37 : Voie catabolique du galactose chez *V. cholerae*



Voie catabolique du galactose, les 6 supresseurs identifiés à l'aide des deux cribles ainsi que leurs fonctions supposées sont représentés en rouge.

1.5. Le L-Ara provoque la modification du transcriptome dont la répression de *glmS*, essentiel à la synthèse du peptidoglycane

1.5.1 Modification du transcriptome

Afin de tenter de comprendre les raisons de la toxicité du L-Ara, nous avons décidé de comparer l'expression des gènes avant et après traitement avec ce sucre-poison. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de RNA-Seq dans 3 conditions : 1) tout d'abord sur des cellules en phase exponentielle, 2) puis sur des cellules traitées au L-Ara pendant 2h (avant la transition morphologique) et enfin 3) pendant 7h (lorsque la majorité des cellules sont sphériques). Pour l'analyse nous avons donc comparé l'expression des gènes dans les conditions L-Ara (2h, 7h) à celle des gènes en phase exponentielle. Cette technique nous permet d'avoir accès à l'expression relative des gènes au niveau de la population. Pour notre analyse nous nous sommes arbitrairement focalisés sur les 200 gènes les plus affectés en positif (surexprimés) et les 200 en négatif (réprimés), ce nombre correspondant environ à l'ensemble des gènes présentant une modification d'expression d'au moins $2 \log_2$. La fonction probable de ces 400 gènes a été recherché par recherche bio-informatique d'homologues. Les fonctions ont été regroupés par catégories et sont représentés sur la [figure 38](#). La liste complète des 200 gènes est présentée dans [l'annexe n°2](#).

Plus de 35% des gènes sélectionnés sont de fonctions inconnues. On remarque que, après 2 ou 7h, la plus grande catégorie de fonction affectée est celle du métabolisme. Cette catégorie assez vaste regroupe les enzymes dont les fonctions vont, de l'import à la transformation de nombreux composés, comme le traitement du fer ([voir annexe n°2](#)). Ces résultats suggèrent une modification métabolique aussi bien positive que négative induite par le traitement. Ces modulations d'expression corrélient avec les nombreux facteurs de transcriptions affectés (surexprimés et réprimés) aussi bien après 2h que 7h de traitement.

Figure 38 : Surexpression et répression des gènes après traitement au L-Ara dans 2 conditions

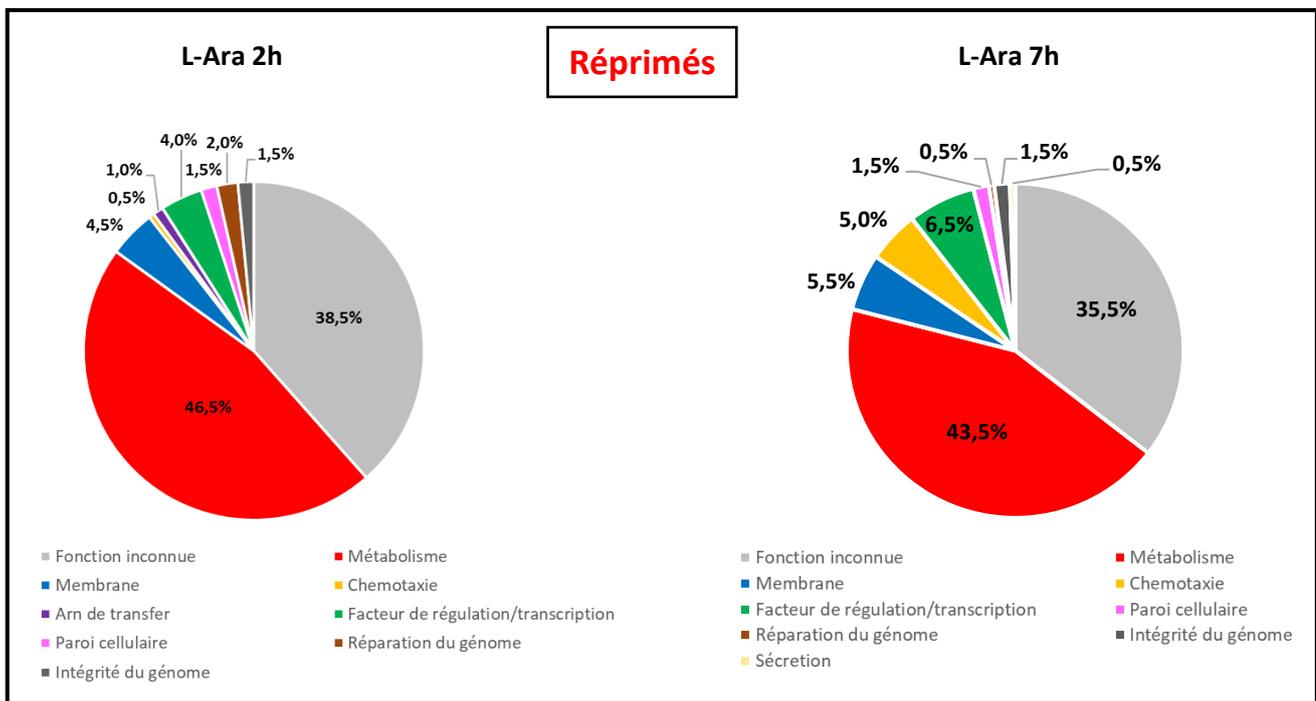
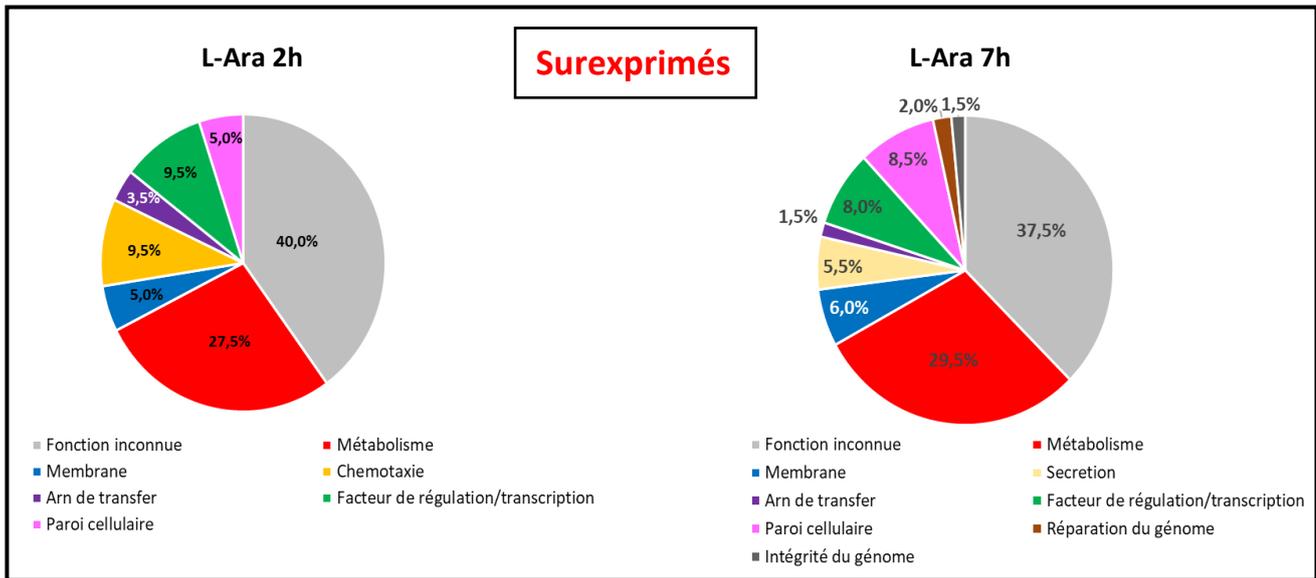


Schéma de la proportion des différentes catégories fonctionnelles d'expression modifiée (surexprimée et réprimée) après traitement au L-Ara pendant 2h et 7h comparativement à la phase exponentielle à l'aide du logiciel DeSeq2

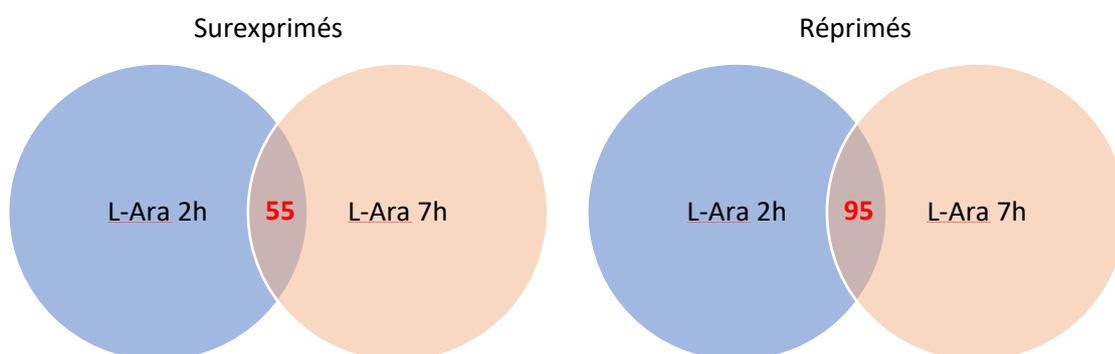
Si l'on se focalise tout d'abord sur les gènes surexprimés, on peut noter l'apparition de plusieurs catégories de gènes qui n'apparaissent qu'après 7h. En effet des gènes impliqués dans l'Intégrité et la réparation du génome sont surexprimés après 7h. Cela suggère que les cellules sphériques pourraient avoir à gérer de potentiels dommages à l'ADN. De plus, il est

intéressant de noter que près de 10% des gènes surexprimés après 2h de traitement sont impliqués dans des activités de chimiotaxie et que ce n'est plus le cas après 7h. On constate la surexpression de gènes impliqués dans la sécrétion. Dans le cadre de notre hypothèse concernant la formation d'un composé toxique lors de la dégradation de L-Ara, l'induction de l'expression de voies de sécrétion pourrait peut-être expliquer l'aspect réversible de l'effet toxique du L-Ara.

Si l'on se focalise désormais sur la répression des gènes après le traitement, on peut observer que tout comme certains gènes plus exprimés, il existe des gènes en lien avec la membrane et la paroi bactérienne qui sont réprimés dans les deux conditions (10 et 14,5% respectivement). On peut donc se demander si-il existe un lien entre la perte de forme de la bactérie et les modifications d'expression des gènes. Finalement, on peut retrouver après 7h de traitement des gènes impliqués dans la chimiotaxie qui étaient surexprimés après 2h.

Il semble donc que l'expression des gènes varie au cours du traitement au L-Ara, Il pourrait y avoir une réponse précoce et une réponse tardive. L'évolution de la modification de l'expression du génome est représentée en [figure 39](#).

Figure 39 : Nombre de gènes surexprimés ou réprimés présents à la fois après 2h et après 7h de traitement L-Ara.



La figure a été établie à partir de la liste des 200 gènes les plus sur-exprimés et réprimés.

Comme on peut le voir sur cette figure, seulement $\frac{1}{4}$ des gènes surexprimés après 2h de traitement le sont encore après 7h. Cela semble aller dans le sens des observations précédentes pour lesquelles on pouvait voir des gènes de chimiotaxie surexprimés après 2h mais réprimés après 7h. Les gènes réprimés sont quant à eux plus stable dans leurs expressions car près de 50 % d'entre eux le sont toujours après 7h.

Pour continuer l'analyse de ces résultats de RNA-Seq, nous nous sommes focalisés sur les 10 gènes les plus affectés dans nos différentes conditions ([tableau 3](#)).

Tableau 3 : Gène et fonction des gènes les plus affectés

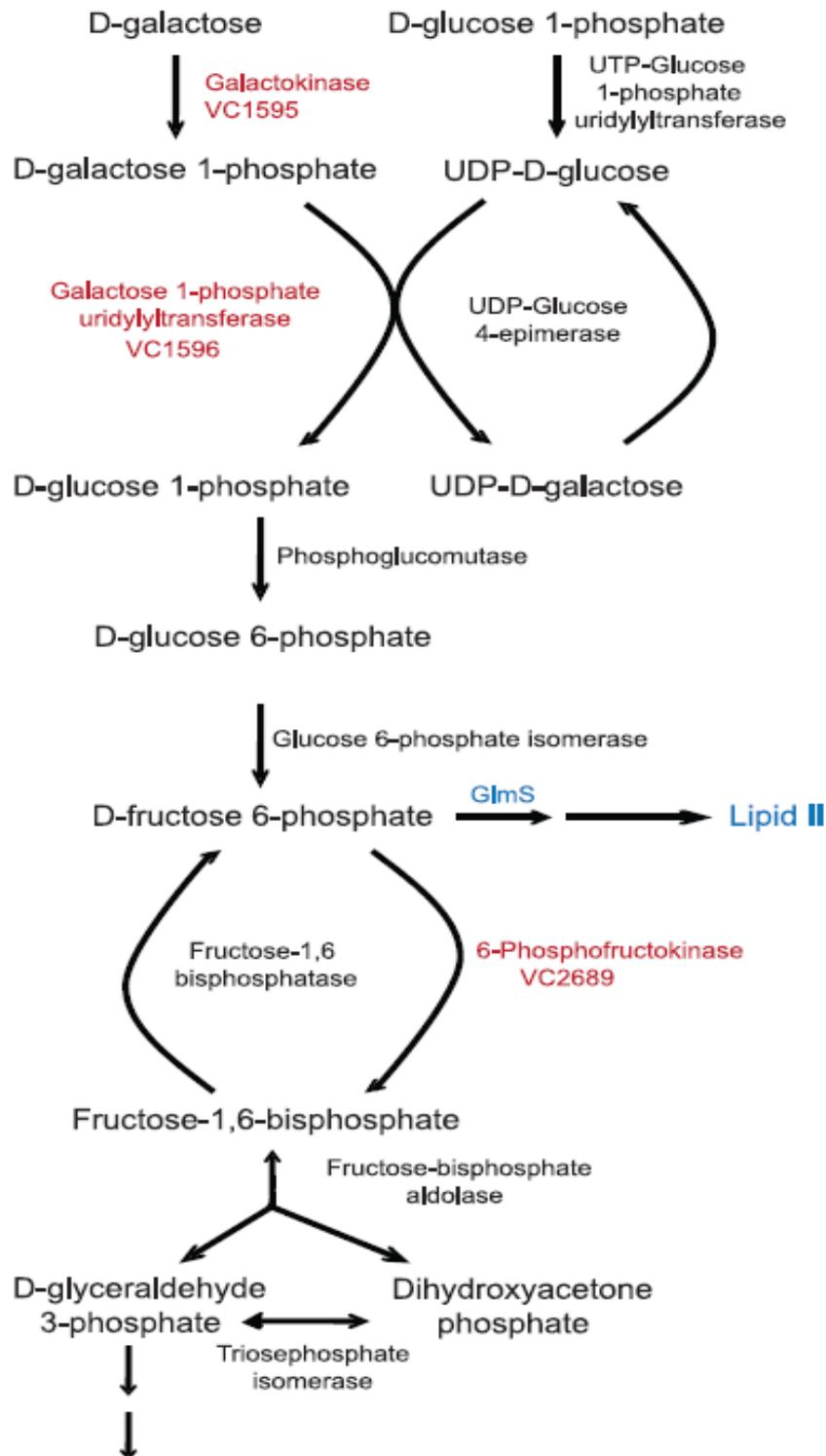
L-Ara 2h surexprimé		L-Ara 7h surexprimé	
Gène et fonction potentielle	Log2 fold change	Gène et fonction potentielle	Log2 fold change
VCA0139 (fonction inconnue)	5.16	VCA0139 (fonction inconnue)	6.52
VC1820 (PTS system, fructose-specific IIA component)	4.64	VC0157 (IvaP, alkaline serine protease/hydrolase)	6.19
VCA0721 (fonction inconnue)	4.50	VC1227 (fonction inconnue)	5.44
VCA0826 (fonction inconnue)	4.31	VCA0733 (fonction inconnue)	5.38
VC1020 (fonction inconnue)	4.15	VC2637 (peroxiredoxin family protein/glutaredoxin)	5.37
VCA0035 (PgpB, phosphatidylglycerophosphatase B)	4.10	VCA0732 (SipA, Stress-inducible protein A)	5.18
VC1596 (galactose-1-phosphate uridylyltransferase)	3.98	VCA0967 (fonction inconnue)	5.13
VC1339 (fonction inconnue)	3.97	VCA0821 (fonction inconnue)	4.96
VC1616 (fonction inconnue)	3.91	VC0885 (fonction inconnue)	4.94
VC2181 (outer membrane lipoprotein LolB)	3.91	VCA0721 (fonction inconnue)	4.91

L-Ara 2h réprimé		L-Ara 7h réprimé	
Gène et fonction potentielle	Log2 fold change	Gène et fonction potentielle	Log2 fold change
VC0608 (iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein)	-7.63	VCA0881 (fonction inconnue)	-6.48
VC0487 (GImS)	-6.41	VCA0880 (fonction inconnue)	-6.46
VC0773 (vibriobactin-specific isochorismate synthase)	-4.52	VCA0882 (fonction inconnue)	-6.27
VC0162 (ketol-acid reductoisomerase)	-4.42	VCA0879 (fonction inconnue)	-6.14
VC1704 (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase)	-4.40	VC1249 (fonction inconnue)	-4.33
VC0991 (asparagine synthetase B, glutamine-hydrolyzing)	-4.39	VCA0883 (fonction inconnue)	-4.13
VCA0607 (Regulator of nucleoside diphosphate kinase)	-4.30	VCA0884 (fonction inconnue)	-4.04
VC0772 (vibriobactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase)	-4.25	VCA0224 (fonction inconnue)	-3.90
VC1174 (anthranilate synthase component I)	-4.16	VCA0738 (fonction inconnue)	-3.89
VC2659 (fumarate reductase, 13 kDa hydrophobic protein)	-4.13	VC0487 (GImS)	-3.47

Parmi cette liste certains gènes ont retenu notre attention (indiqués en rouge dans le [tableau 3](#)). Pour les gènes surexprimés, il était important de retrouver les acteurs impliqués dans le métabolisme du galactose. La présence du gène VC1596 dans ce tableau vient conforter notre hypothèse concernant l'utilisation (et donc même l'induction) de la voie de catabolisme du galactose pour (et par) le L-Ara. De plus, d'autres gènes impliqués dans la voie métabolique du galactose ([figure 37](#)) sont également surexprimés de manière significative ([voir annexe n°2](#)). Pour notre étude, nous nous sommes focalisés sur la seconde protéine la plus réprimé après 2h de traitement : GImS. En effet, cette protéine a attiré notre attention car elle est impliquée très en amont dans la synthèse du peptidoglycane. Elle permet la création des précurseurs essentiels à cette structure. Cette protéine peut d'ailleurs être ajoutée sur notre figure 38 décrivant la voie métabolique du galactose ([Figure 40](#)).

Figure 40 : Voie catabolique du galactose chez *V. cholerae* et implication de GImS

D-galactose ABC transporter: VC1325 VC1327 VC1328

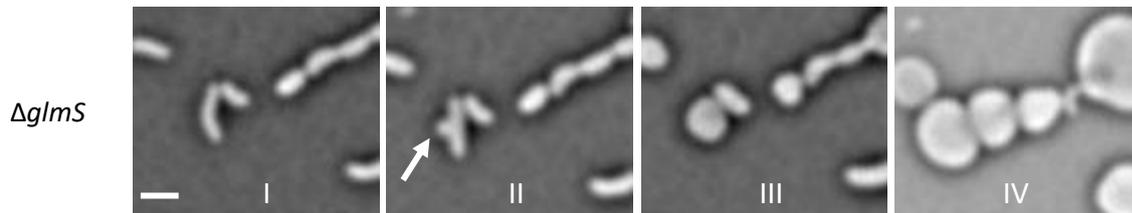


Voie catabolique du galactose, les 6 supresseurs identifiés à l'aide des deux cribles ainsi que leurs fonctions supposées sont représentés en rouge. La protéine GImS est indiquée en bleu.

1.5.2 L'absence de *glmS* conduit à la sphéroplastisation mais pas à l'arrêt de la croissance

Afin d'observer le phénotype de l'absence du gène essentiel *glmS*, des cellules mutantes préalablement cultivées en présence de précurseurs complétant la fonction de *glmS* ont été déposées sur un milieu (M9-MM + 1,5% agarose) dépourvu de précurseurs et suivies par vidéo microscopie (Figure 41).

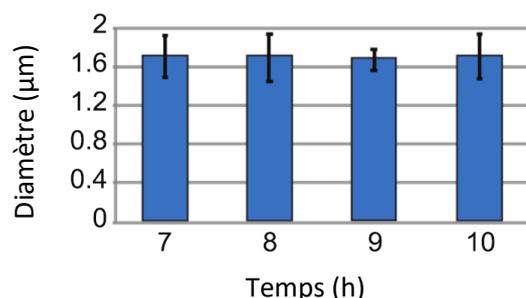
Figure 41 : Effet de la délétion de *glmS* sur des cellules en phase exponentielle



Images d'une souche $\Delta glmS$ cultivée en milieu M9-MM + glc NAC déposée sur pad d'agarose M9-MM sans glc NAC pour expérience de vidéo-microscopie. L'échelle représentée est de 2 μm .

Comme on peut le voir sur le panel II de la figure 41, la délétion de *glmS* induit la formation d'une boursouffure aboutissant à la création de cellules sphériques. Ce phénotype rappelle celui des cellules traitées au L-Ara. Cependant, la croissance des cellules dépourvues de *GlmS* n'est pas stoppée, leur volume augmente au cours du temps. Nous avons pris soin de mesurer le volume cellulaire des cellules traitées au L-Ara afin de vérifier que celui-ci est stable contrairement aux mutants *glmS*. Le volume moyen des cellules sphériques a été mesuré toutes les heures pendant 4h (Figure 42). Ce volume stable au cours du temps avec une moyenne d'environ 1.6 μm . Les cellules sphériques obtenues par la délétion du gène *glmS* diffèrent donc de celles obtenues par traitement au L-Ara car le volume de ces premières ne se stabilise pas mais au contraire augmente au cours du temps (figure 41, panel III et IV).

Figure 42 : Volume de cellules sphériques traitées au L-Ara au cours du temps



Volume moyen mesuré au cours du temps sur un échantillon de 3 expériences indépendantes, l'écart type est représenté.

Résumé du chapitre 1 et discussion

En résumé, nous avons décrit une nouvelle méthode permettant d'induire un arrêt de la croissance couplée à un changement morphologique chez *V. cholerae* : l'utilisation du L-Ara. Ce sucre permet de stopper la croissance et provoque en quelques heures la formation de cellules sphériques non prolifératives. Ce processus est totalement réversible pour les cellules. À l'aide de cribles basés sur l'utilisation d'une banque de transposition, nous avons pu déterminer que cet effet était en lien avec le métabolisme du galactose.

Une concentration de 0.2% en L-Ara suffit à induire un arrêt de la prolifération ainsi qu'une transition morphologique pour la majorité des cellules d'une culture d'une souche sauvage. Certains mutants sont plus sensibles requérant alors moins d'arabinose et permettant la transformation en cellules sphériques de l'intégralité de la population d'une culture. Il est intéressant de savoir que la température de croissance des cultures est un paramètre important pour ce phénomène. En effet, nous avons vu dans la [figure 31](#) que la transition morphologique est fortement accélérée dans une culture à 37°C au lieu de 30°C. Ce phénomène pourrait être dû à un simple effet métabolique, certaines protéines et enzymes pouvant être plus efficaces à certaines températures qu'à d'autres expliquant cette différence de vitesse dans le processus d'entrée en forme sphérique. *V. cholerae* étant un pathogène humain dont la température moyenne est justement 37°C, il serait possible que l'amélioration de la vitesse soit un mécanisme d'adaptation en cas de stress du pathogène dans son hôte.

Nous avons également pu voir, dans la [figure 28](#), une différence de comportement entre la forme L de l'arabinose (la plus retrouvée dans la nature) induisant notre phénotype et la forme D de ce même sucre apparemment sans effet sur notre bactérie. Plus tard, nous avons pu déterminer que l'effet du L-Ara semble en relation avec l'import et le métabolisme du galactose ([Figure 34, 35, 36, 37 et tableau 2](#)). La similitude structurale entre le L-Arabinose et le D-galactose pourrait expliquer l'import et la dégradation du L-Ara et contrairement au D-Ara. Nous pouvons supposer au vu de ces résultats que le L-Ara est importé convenablement dans la cellule mais probablement mal catabolisé induisant un stress cellulaire important aboutissant à l'arrêt complet de la croissance et au phénotype que nous observons ([Figure 30](#)).

L'expérience de RNAseq a révélé que de nombreux changements s'effectuaient durant le traitement au L-Ara, qu'ils soient métaboliques, en lien avec les membranes, la paroi ou encore dus à des facteurs de transcription. Parmi les nombreux gènes intéressants pour l'étude de notre phénotype, nous pouvons noter le gène VC2181 impliqué dans la membrane externe. Nous n'avons pas exploré plus en profondeur la potentielle implication de cette protéine dans notre phénotype mais il était intéressant de relever sa présence. Il y a également de nombreuses protéines dont l'analyse bio-informatique n'a pu déterminer de fonction.

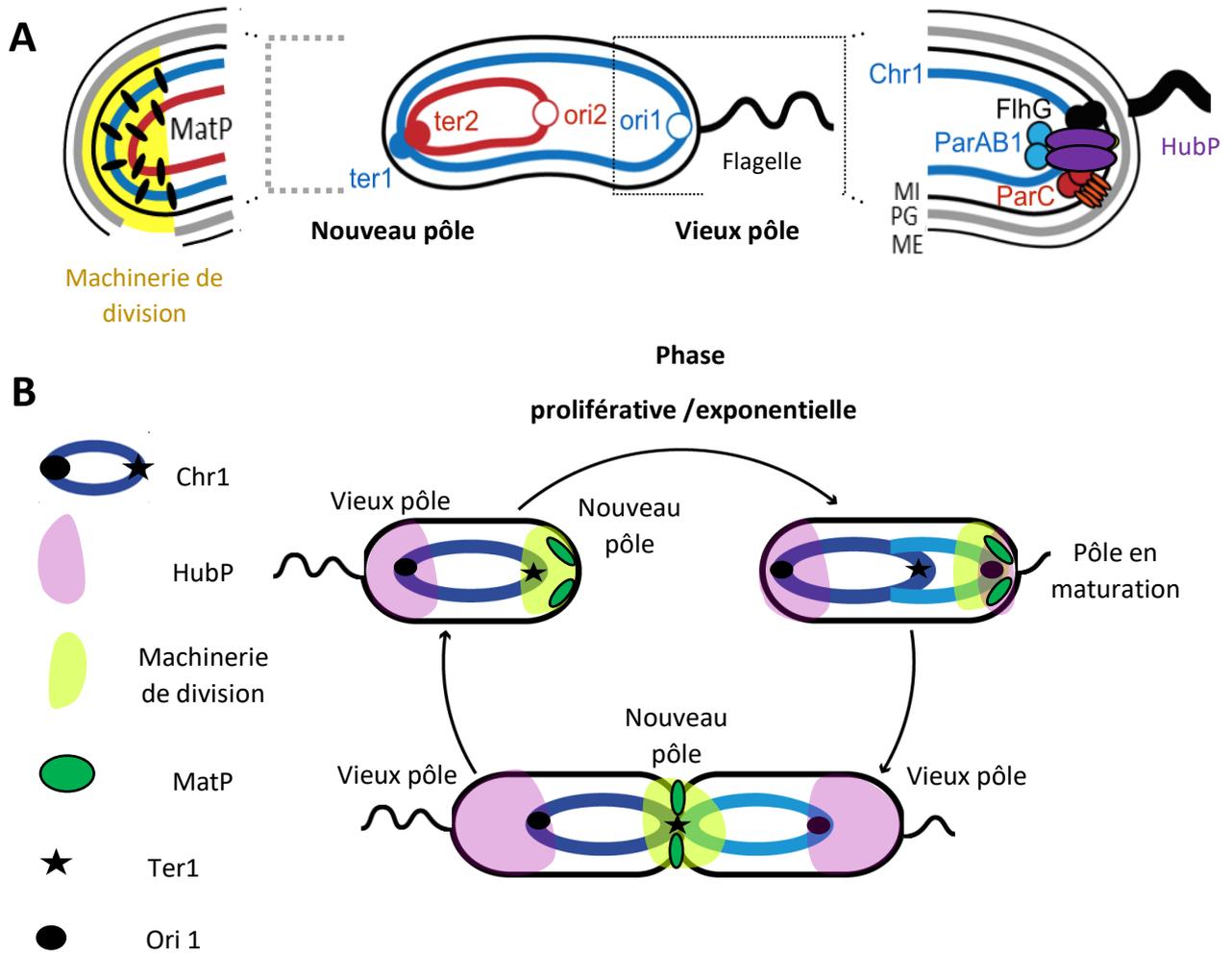
Le gène *glmS* impliqué dans la synthèse du peptidoglycane est fortement réprimé 2h après exposition au L-Ara. L'observation d'une souche dépourvue de ce gène nous a indiqué que cette répression lors du traitement au L-Ara pourrait être à l'origine de la perte de la forme en bâtonnet classique de *V. cholerae*. En effet, nous pouvons observer la même « boursouflure » lors de la formation des cellules sphériques. Cependant, les sphères obtenues par la délétion du gène *glmS* voient leur volume cellulaire augmenter au cours du temps contrairement à celui des cellules traitées au L-Ara qui est stable. Nous supposons donc que la répression de *glmS* lors du traitement au L-Ara aboutit à une incapacité pour les cellules de renouveler leur peptidoglycane par faute de précurseurs, provoquant à long terme (5-8h) la création de cellules sphériques. Cependant, le traitement au L-Ara doit induire au moins une autre réaction responsable de l'arrêt de l'augmentation du volume cellulaire indépendante de la répression de *glmS*.

Chapitre 2 : L'organisation cellulaire des sphéroplastes induits par le L-Ara

Le maintien de l'organisation cellulaire de *V. cholerae* est assez bien décrit grâce à l'étude de sa forme proliférative (Figure 43). Le but de ma thèse est l'étude de l'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire.

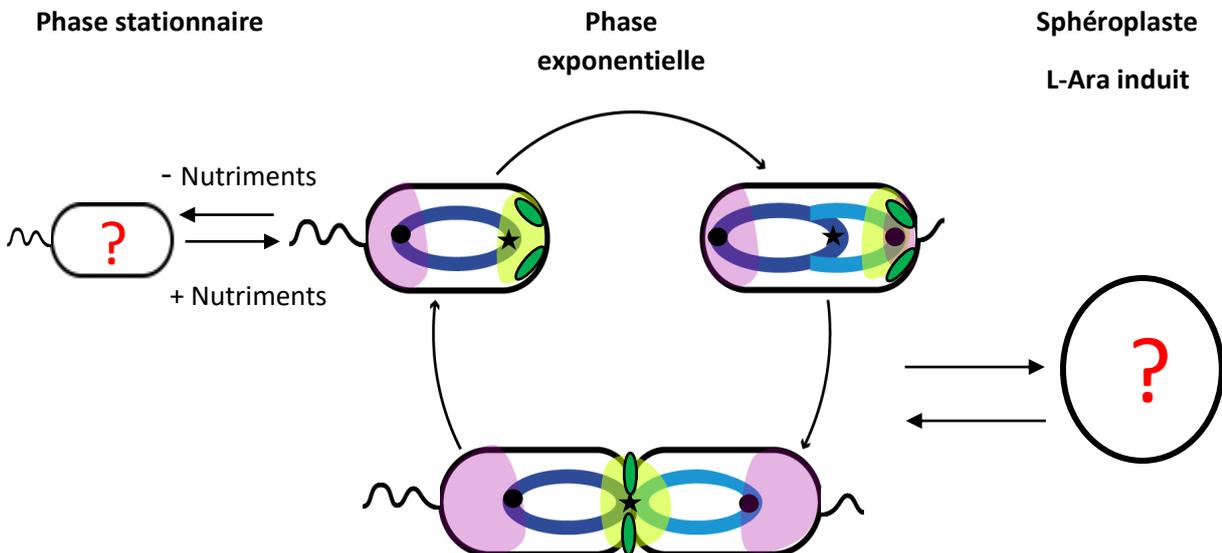
J'ai mis en évidence, dans le chapitre 1, un traitement au L-Ara permettant l'obtention de sphéroplastes non prolifératifs stables et réversibles. Dans ce chapitre 2, je vais déterminer le niveau de perturbation de l'organisation intracellulaire de ces sphéroplastes ainsi que celui de cellules non prolifératives dites en phase stationnaire (Figure 44). Dans le cas où l'organisation intracellulaire sera considérée suffisamment perturbée, nous aurons alors une condition efficace pour étudier son établissement *de novo*.

Figure 43 : Organisation cellulaire schématique de *V. cholerae* en phase exponentielle



Représentation schématique de l'organisation cellulaire de *V. cholerae*. **(A)** Organisation d'une cellule nouvellement née. **(B)** Organisation au cours du cycle cellulaire, seul le chromosome 1 est représenté.

Figure 44 : Objectif du chapitre 2



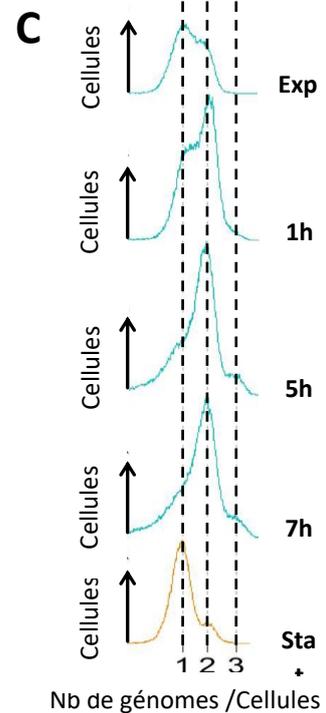
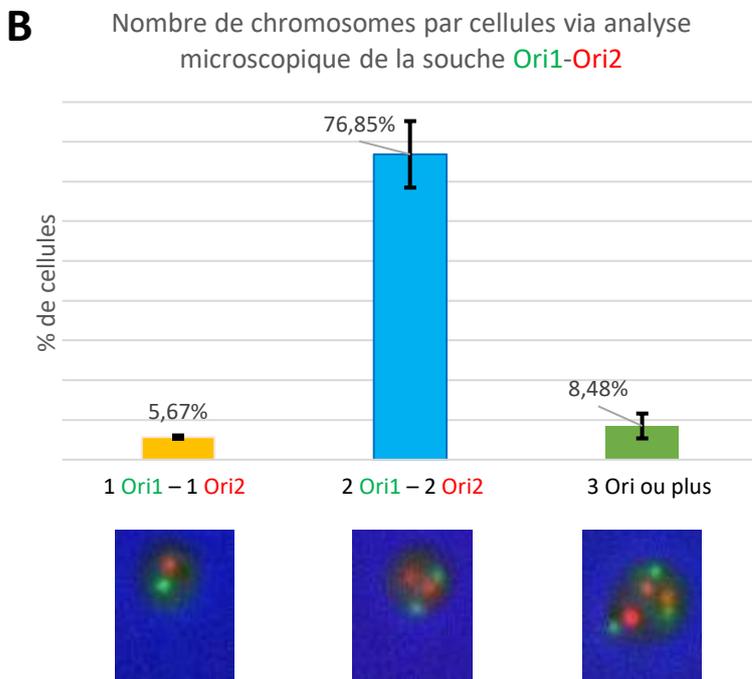
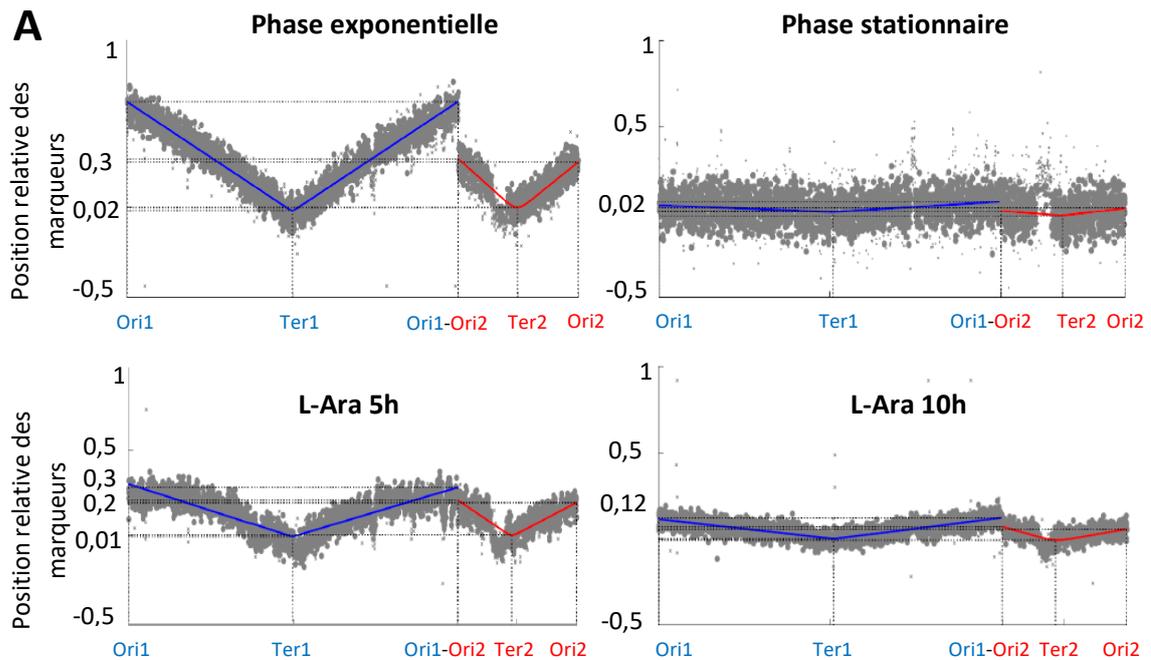
2.1 Contenu génétique des cellules non prolifératives : sphéroplates et phase stationnaire

Comme décrit dans l'introduction, les liens entre le génome et le reste de la cellule sont prépondérants à l'organisation intracellulaire. Nous avons considéré qu'il était donc nécessaire d'établir le contenu génomique des cellules dans ces deux états non prolifératifs. Pour cela, nous avons utilisé une combinaison de techniques : la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et le MFA-séquençage massif.

La cytométrie en flux permet, pour un grand nombre de cellules (ici 100.000 dans chaque conditions), de déterminer-la quantité d'ADN par cellule, révélée par l'émission de fluorescence de l'iodure de propidium incorporée dans l'ADN. Son intensité est exprimée en équivalent génome. Contrairement aux techniques utilisées ensuite (Microscopie et MFA), la cytométrie ne permet pas de connaître la nature du contenu génomique donc ni de savoir si le programme de réplication est arrêté à un endroit précis du génome, ni s'il s'effectue normalement, de manière bidirectionnelle de l'origine unique vers le terminus.

Par une analyse de cytométrie, on observe bien que le contenu génomique d'une population de cellule en phase stationnaire est en très grande majorité de 1eq. génome/cellule. Cela est compatible avec l'absence de réplication et l'arrêt programmé des cellules à un stade précis du cycle : juste après division cellulaire et avant initiation de la réplication (figure 45 C). Le profil du contenu génomique d'une population de cellule en phase exponentielle cultivée en M9 est compris entre 1 et 2 éq. genome/cellule (figure 45 C). La période B (période pré-initiation de la réplication) et la période D (post réplication) n'étant pas de durée fortement différente dans le milieu utilisé, on observe bien que la proportion de cellule contenant 2 eq.genome/cellule est environ la moitié de celle n'en contenant qu'un. La proportion de cellules ayant un contenu intermediaire entre 1 et 2, correspondant aux cellules en cours de réplication, représente environ la moitié de la population.

Figure 45 : MFA- Proportion relative de chaque paire de base du génome



(A) Expérience d'Analyse de Fréquence des Marqueurs (MFA), les reads obtenus après séquençage sont alignés sur le génome, le chromosome 1 est représenté en bleu et le chromosome 2 en rouge. Les résultats représentent les alignements pour les phases exp stat et après traitement au L-Ara pour 5 et 10h. **(B)** Comptage réalisé après photos prises sur la souche EGV 346 traitée 8h au L-Ara, les moyennes ont été effectuées sur 3 comptages indépendants comprenant 500 cellules par comptage. Un exemple de chaque catégorie est montré. **(C)** Expérience de cytométrie en flux réalisée sur une souche sauvage traitée à l'iodure de propidium. Les cellules traitées au L-Ara ont été analysé après 1,5 et 7h. L'expérience a été réalisé une fois sur une moyenne de 10 000 cellules par conditions.

La quantité de matériel génomique a été mesurée à différents temps après l'addition de 0,2% L-Ara. On constate que le profil de ce contenu est déjà fortement modifié 1h après l'addition du L-Ara puisque la proportion majoritaire correspond maintenant à des cellules contenant 2 eq. génomes. Le reste de la population est équitablement réparti entre 1 et 2. Le profil continue à évoluer jusqu'à l'obtention d'une population de cellules presque pure contenant 2 eq. genome. L'addition de 0.2% arabinose semble provoquer l'arrêt des cellules à un stade différent de celui de la phase stationnaire, la réplication semble pouvoir finir le cycle en cours mais ne pas être réinitiée et la cellule n'est pas capable de se diviser.

Par microscopie à fluorescence, ces résultats sont confirmés par l'analyse du nombre de foci fluorescent correspondant au locus ori1 (origine de réplication du chromosome 1) et au locus ori2 (origine de réplication du chromosome 2) (figure 45 B). Un double système de marquage a donc été introduit dans la souche N16961 (Mat & Met). 8h après l'addition de L-Ara, la proportion de cellules contenant 2-ori1 et 2-ori2 est devenue majoritaire (76%) alors qu'elle représentait moins de 5-10% en phase exponentielle (Résultats non montrés comparables à David et al, 2014).

MFA : Sachant que la population est relativement homogène, nous avons décidé d'analyser l'évolution du programme de réplication après addition de L-Ara en analysant la nature du contenu génomique à la paire de base (pb) près par MFA (Marker Frequency Analysis), technique basée sur le séquençage massif à haut niveau de couverture, permettant d'avoir la fréquence relative de chaque pb du génome (figure 45 A).

Dans une culture de cellules asynchrones en croissance exponentielle, la proportion de loci proche de l'origine de réplication est plus forte que les loci localisés en aval jusqu'à une proportion minimale proche du terminus. Si on représente la fréquence de lecture des loci sur un axe des abscisses ayant les deux cotés de l'ori à ses extrémités, on obtient un profil en forme de V avec le point d'inflexion coïncidant avec le terminus de réplication. On observe cela pour le chromosome 1 et pour le chromosome 2 (figure 45 A). Par contre, en phase stationnaire, le profil devient plat puisque toutes les cellules contiennent autant de copies de chaque loci. 10h après ajout de L-Ara, alors que les cellules sont des sphéroplastés, on constate que le profil devient quasiment aussi plat que celui obtenu en phase stationnaire. Par contre, après 5h, le profi est déjà bien écrasé mais montre une sorte de rupture dans la progressivité du programme de réplication : les deux premiers quarts du genome proche de

l'ori1 montrent un profil plat puis les deux autres quarts proche du terminus montrent un profil en V, avec une pente plus faible que celle observée en phase exponentielle. Ces résultats confirment et affinent les interprétations faites des résultats de cytométrie: la réplication ne s'arrête pas instantanément après ajout de L-Ara, mais semble progresser lentement (plus de 5h pour achever le cycle alors que 40 mins suffisent en phase exponentielle) jusqu'au terminus pour finalement ne pas être capable d'être réinitiée. Les sphéroplastés obtenus ne sont pas en réplication active et contiennent principalement 2 copies complètes du génome.

2.2. Caractérisation de l'organisation intracellulaire des cellules non prolifératives : Sphéroplastés et phase stationnaire

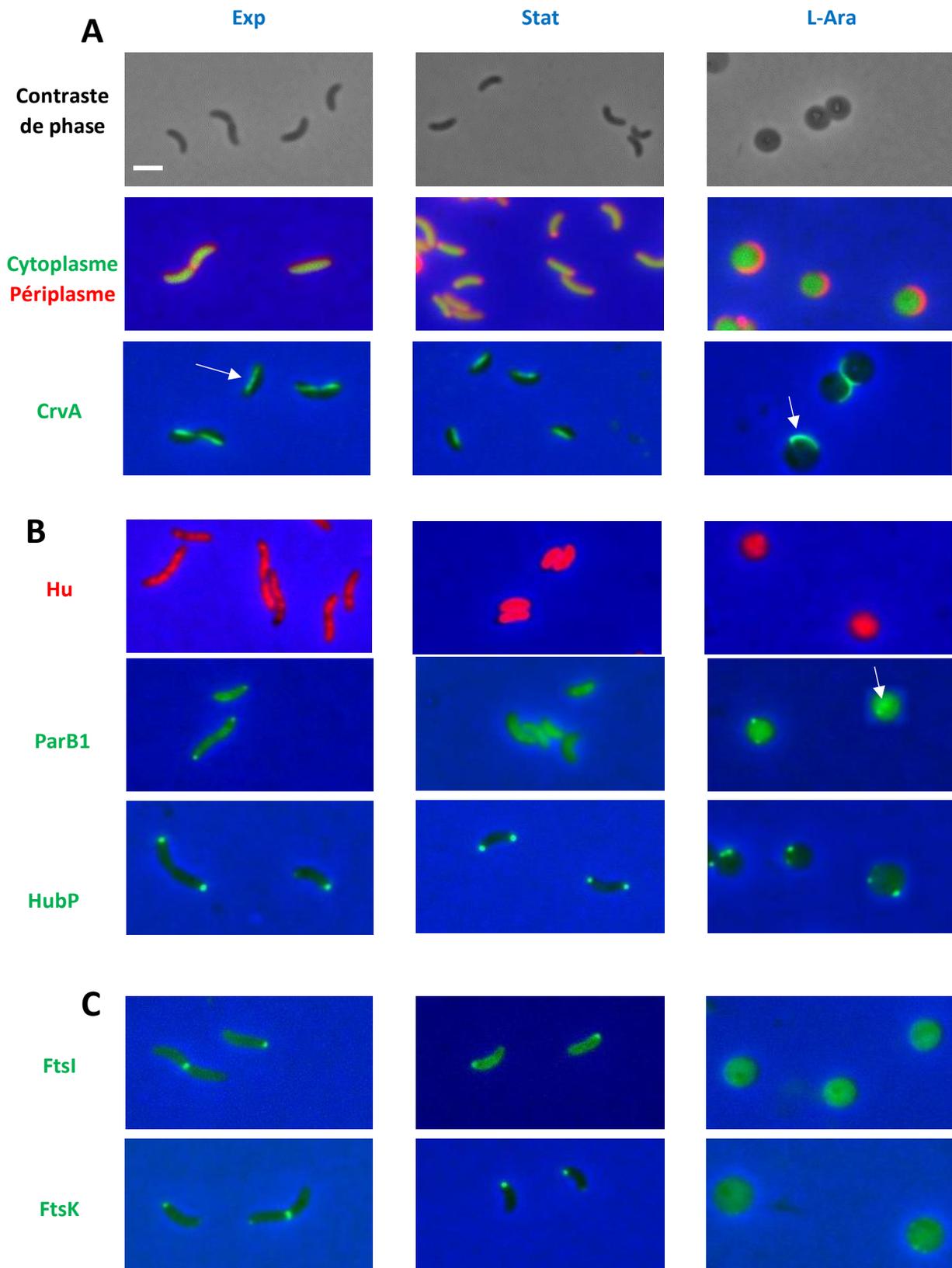
2.2.1 Perte de l'intégrité de la paroi

La paroi et les membranes sont responsables de la forme et permettent des processus essentiels tels que les échanges entre le cytoplasme et le milieu extérieur. L'intégrité de la paroi est assurée par des liens protéiques et du peptidoglycane entre la membrane interne et la membrane externe, maintenant un espace périplasmique précis. Dans le chapitre 1, nous avons montré que la quantité de peptidoglycane dans les sphéroplastés L-Ara induits était très réduite par rapport à celle dans les cellules exponentielles (<10%). Afin de savoir si l'organisation paroi/membranes était toujours en place, au moins partiellement, l'espace cytoplasmique a été visualisé à l'aide d'une protéine GFP exprimée dans le cytoplasme et l'espace périplasmique à l'aide d'une protéine mCherry exprimée dans le périplasma.

Dans les cellules exponentielles ou stationnaires, on observe bien un volume « vert » cytoplasmique prépondérant entouré d'un espace « rouge » périplasmique relativement étroit (figure 46 A). On peut néanmoins noter que l'espace périplasmique aux pôles des cellules en phase stationnaire est plus important.

Dans les sphéroplastés L-Ara induits, on observe que le disque du cytoplasme (vert) est significativement plus petit (20%) que le disque du périplasma (rouge) et qu'ils ne sont pas concentriques. Le bord des deux cercles semblent coïncider sur environ la moitié du disque cytoplasmique alors que le long de l'autre moitié les deux bords sont très éloignés créant un espace périplasmique important (en forme de croissant de lune).

Figure 46 : Intégrité de la paroi (A), organisation du génome (B) et de la machinerie de division (C) de *V. cholerae* dans différentes conditions.



Snapshots de *Vibrio cholerae* dans différentes conditions, exp : phase exponentielle (culture de nuit diluée à DO 0,02 observée après 2h à 30°C en milieu M9-MM), stat : phase stationnaire correspond à une culture de nuit en M9-MM et L-Ara : traitement de 8h au L-Ara. L'échelle est représentée par un trait blanc correspond à 2µm. **(A)** Souche sauvage EPV50, Cytoplasme-Periplasme EGV616, CrvA EGV600. **(B)** HU EPV231, ParB1 EGV72, HubP EPV453. **(C)** FtsI EPV432, FtsK EGV34.

La courbure des cellules de *V. cholerae* est due à un type de cytosquelette particulier, la protéine CrvA. Cette protéine est exprimée dans le périplasma et crée une forme incurvée en induisant, au niveau de sa localisation (bande longitudinale), un retard de croissance du peptidoglycane. La localisation de CrvA, visualisée par fusion traductionnelle avec la GFP, est systématiquement du « côté » du croissant de lune périplasmique (figure 46 A).

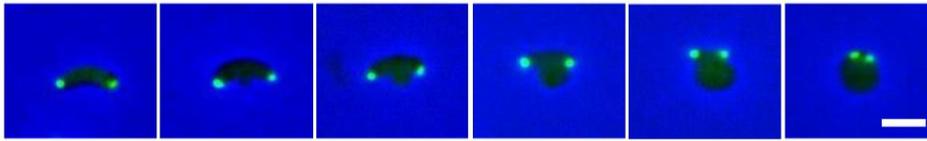
2.2.2 Organisation du génome

Dans le chapitre 1, nous avons montré que les cellules en phase stationnaire contiennent une seule copie du génome non répliatif et les sphéroplastes contiennent très majoritairement deux génomes complets également non répliatifs.

La localisation du contenu génomique a été observée par l'utilisation de l'allele du gène *hupA* fusionnée à la mCherry (Figure 46 B). *hupA* code pour la protéine HU qui est exprimée en grande quantité (>3000 molécules par cellules) et qui est connue comme une « Nucleoid Associated Protein » NAP c'est-à-dire qu'elle s'associe au nucleoid de manière relativement aspécifique. Sa localisation permet donc de révéler indirectement la localisation du ou des nucleoids. Le signal mCherry est d'intensité assez similaire dans les sphéroplastes et dans les cellules en phase exponentielle. Le génome est également reparti dans l'ensemble des cellules en phase stationnaire. Il faut cependant noter que le signal apparait plus intense. Cela pourrait être dû à la diminution du volume cellulaire dans cet état, l'expression de protéines associées au nucleoid durant cette phase stationnaire pourrait également contraindre la compaction du génome. Par contre, le signal est homogène sur l'ensemble de la zone cytoplasmique dans les trois conditions. Dans les sphéroplastes, il ne semble pas y avoir d'individualisation entre les deux copies de génomes. Les protéines d'organisation du chromosome pourraient être inactivées et conduirent à des entremêlements entre chromosomes. Un système permettant de bien répartir les deux types de chromosomes (ch1 et ch2) et d'individualiser un jeu complet de génome pourrait être nécessaire lors l'étape de rétablissement prolifératif

Les protéines permettant l'ancrage entre le pôle et le chromosome 1 sont HubP (pôle) et ParB1 (chr1). On observe bien 2 foci de HubP et 2 foci de ParB1 par sphéroplastes (figure 46 B). Ainsi, il apparait que les deux chromosomes 1 seraient ancrés aux « anciens » pôles dans les sphéroplastes. Les deux foci HubP ou ParB1 peuvent être plus ou moins proche l'un de

Figure 47 : Localisation de HubP durant l'entrée en forme sphéroplaste



l'autre. Cette variabilité pourrait être due à la localisation de la boursoflure initiant le processus de sphéroplastisation (Figure 47).

Nous avons supposé que la perte d'intégrité de la paroi (croissant de lune périplasmique) est liée à la perte du peptidoglycane nécessaire aux interactions entre membrane interne et membrane externe. De plus, nous avons observé que les deux foci HubP dans les sphéroplastiques sont les deux foci déjà présents dans la cellule avant sphéroplastisation. Ainsi, l'accumulation de cette protéine transmembranaire liant les deux membranes perdue et pourrait empêcher le décollement des membranes. La co-visualisation du signal périplasmique et de HubP confirme cette hypothèse puisqu'il y a bien exclusion entre les deux ; HubP n'est jamais localisé dans la zone de décollement (Figure 48).

Figure 48 : Observation d'une souche périplasme/HubP

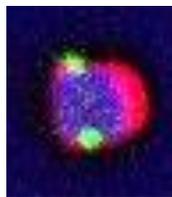


Photo représentative de l'exclusion entre le décollement des membranes (le périplasme en rouge) et la protéine HubP (en vert). Souche AGV003

2.2.3 Machinerie de division

La localisation de protéines impliquées dans la division cellulaire : FtsK (recrutement précoce) et FtsI (recrutement tardif) a été observé (Figure 46 C). Pour les cellules en phase exponentielle deux situations se distinguent. Les cellules sur le point de se diviser présentent

un signal au centre alors que les cellules nouvellement formées présentent un signal au niveau du nouveau pôle. Les cellules en phase stationnaire ne se divisant pas, on peut uniquement observer une localisation polaire des protéines de la division. En revanche, aucune accumulation de signal à un endroit particulier n'est observée dans les sphéroplastes L-Ara induits.

Résumé du chapitre 2 et discussion

Cette caractérisation « diagnostic rapide » révèle que les cellules en phase stationnaire ont conservé les éléments d'organisation présents durant la phase exponentielle : 1 génome bien réparti et organisé, une répartition normale du périplasme, une localisation précise des facteurs de polarité et de division ; alors que les sphéroplastes ont perdu de nombreux éléments cruciaux : la polarité cellulaire, l'intégrité de la paroi, la localisation de la machinerie de division, l'individualisation des deux copies de génomes.

Contrairement à la phase stationnaire, le retour à l'état prolifératif des sphéroplastes semble nécessiter d'établir *de novo* une organisation intracellulaire et pariétale : régénérer la paroi et la forme de la cellule, repositionner les machineries de division, individualiser des jeux complets de génome (voir [figure 49](#)).

Figure 49 : Récapitulatif résultats chapitre 2

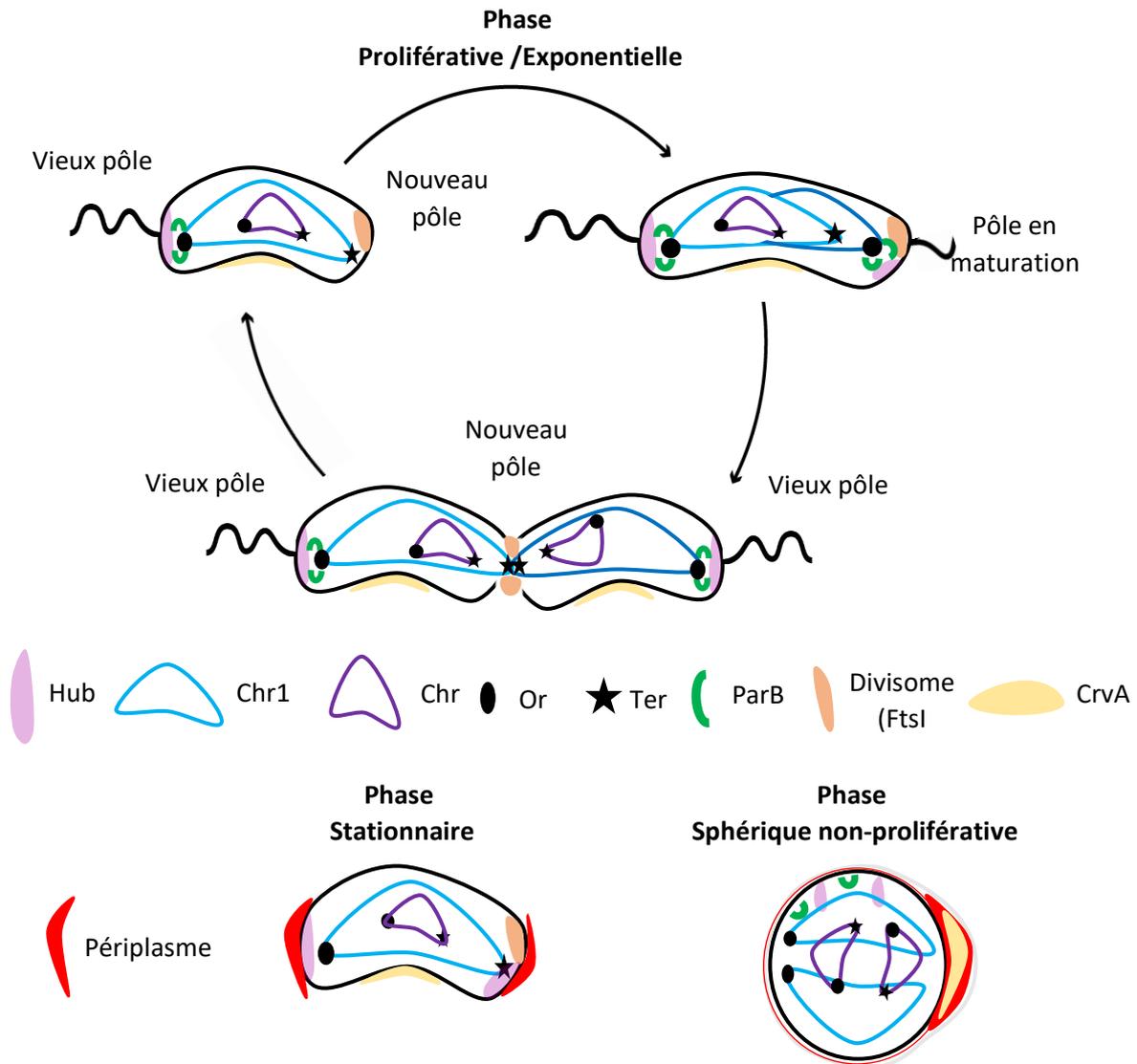
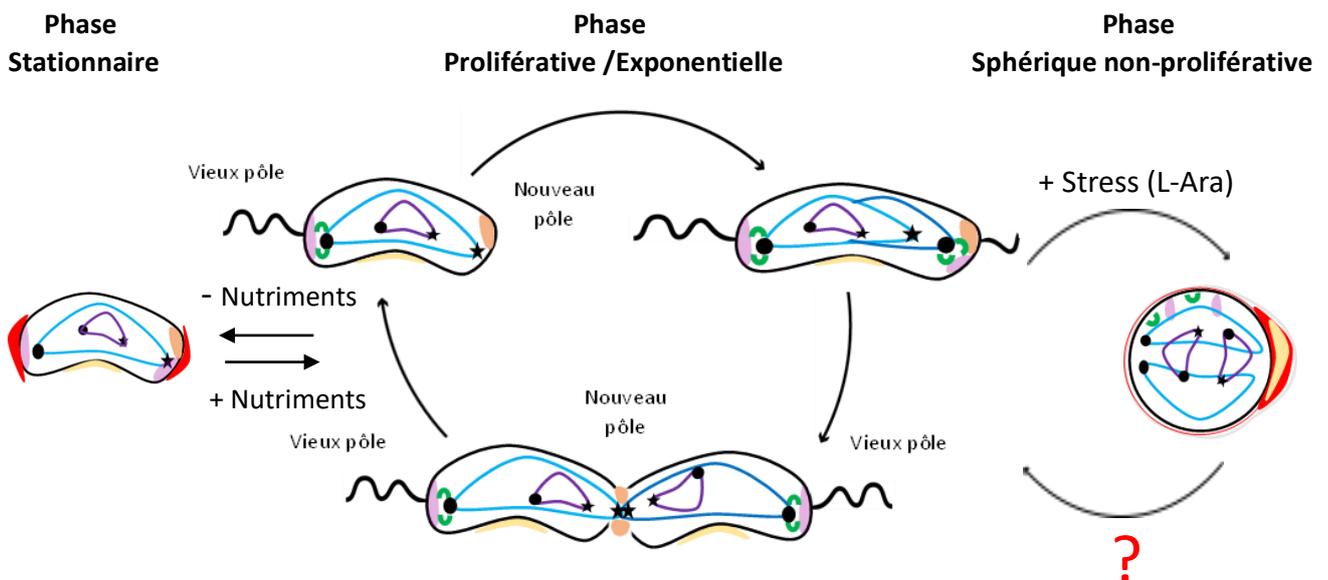


Schéma récapitulatif de l'organisation intra-cellulaire des phases exp, stat et sphérique par L-Ara. Par soucis de lisibilité la membrane externe et le périplasme ne sont pas montrés sur le cycle prolifératif mais le sont pour la phase sphérique et stat.

Chapitre 3 : Etablissement *de novo* de la forme proliférative après sphéroplastisation induite au L-Ara

Les sphéroplast L-Ara induits présentent une organisation cellulaire altérée pour de nombreux éléments clés mais sont capables de retrouver un état prolifératif (voir chapitre 1 et 2). Dans ce chapitre 3, le but est de décrire le processus d'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire permettant aux sphéroplast de retrouver un état prolifératif (Figure 50).

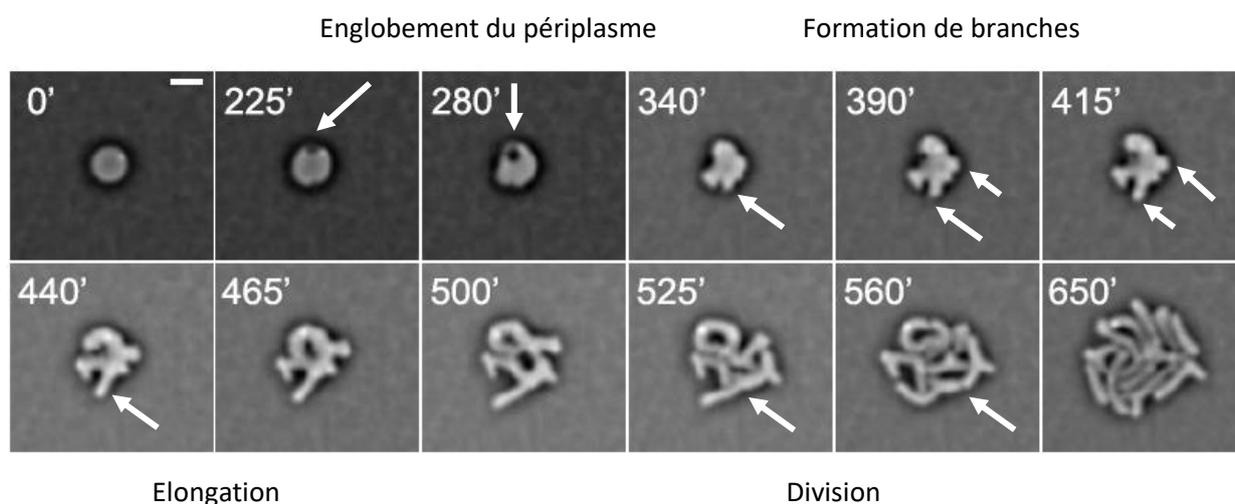
Figure 50 : Schéma récapitulatif du chapitre 1 et 2 et objectif du chapitre 3



3.1 Le processus de rétablissement prolifératif suit une succession d'étapes

Comme vu dans le chapitre 1, le phénotype induit par le traitement au L-Ara doit être réversible car l'ensemble des sphéroplastes induits sont capables de former des colonies sur boîtes LB. Afin d'observer la réversibilité de ce processus, des sphéroplastes ont été déposés entre lame et lamelle sur pad d'agarose (M9-MM +1,5% agarose) et visualisés pendant environ 15h au microscope. Un exemple de réversibilité est illustré [figure 51](#).

Figure 51 : Réversibilité du phénotype L-Ara en 4 étapes successives.



Vidéo microscopie du rétablissement prolifératif d'une souche sauvage cultivée à 30°C en milieu M9-MM traitée au L-Ara 0,2% pendant 8h avant observation au microscope sur pad d'agarose. Le temps est affiché en minute et l'échelle représentée correspond à 2µm. Les étapes notables sont indiquées et les flèches blanches montrent les éléments diagnostiques.

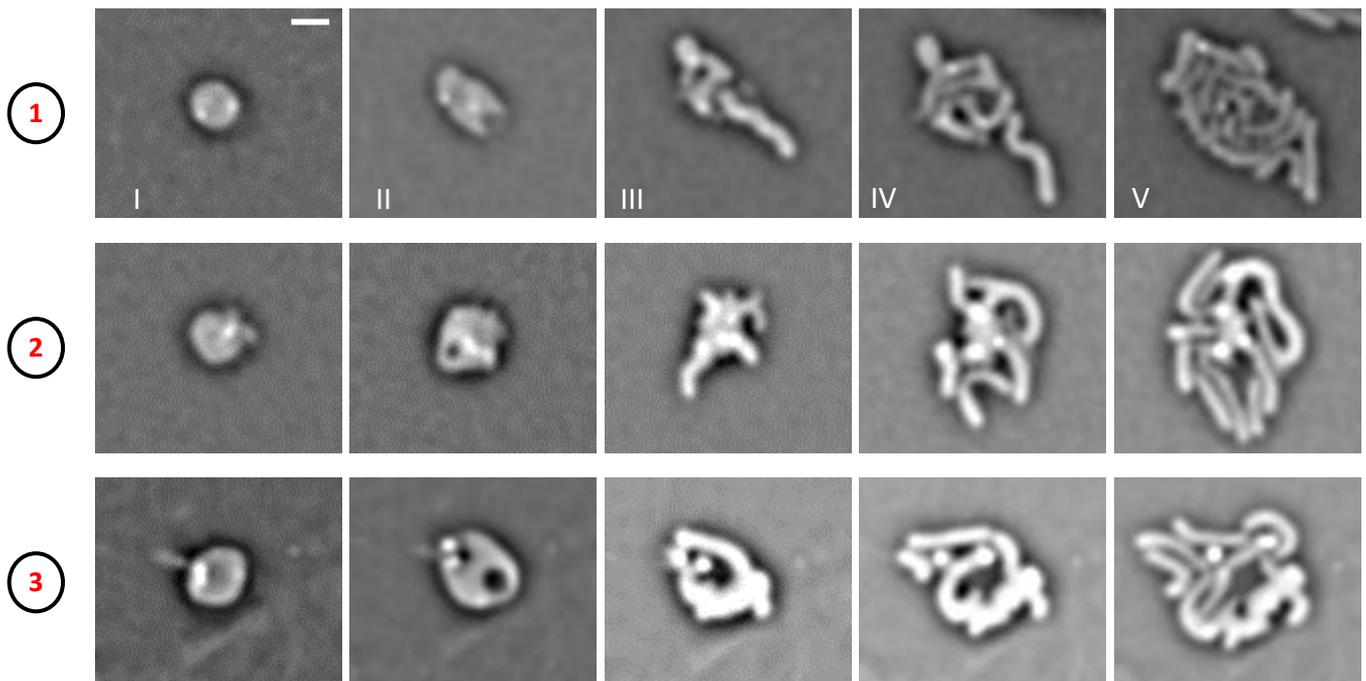
Le processus de rétablissement est initié après une durée très variable après lavage du L-Ara, entre moins d'une heure et près de 10h. Les raisons de cette variabilité n'ont pas été investiguées mais reflèterait l'asynchronie de la population à entrer dans le processus de sphéroplastisation (voir chapitre 1). Plus une cellule aurait accumulé de L-Ara ou moins elle aurait pu s'en détoxifier et plus la période avant d'initier la réversion pourrait être longue. Néanmoins, dans la grande majorité des cas observés, le processus suit les mêmes étapes :

Il est initié par l'**englobement de l'excès de l'espace périplasmique**, se caractérisant par l'apparition d'un « rond sombre » à la périphérie de la cellule. Cette étape est également corrélée à une légère augmentation de la taille de la cellule.

Le processus se poursuit par la **formation de protrusions ou « branches »** dont le nombre peut être très variable. Finalement, après **élongation** de ces branches, on observe sur celles-ci à différents endroits des événements de **division cellulaire** avec invagination générant des cellules en bâtonnets capable de proliférer normalement.

L'exemple illustré [figure 51](#) est représentatif de la succession des étapes du processus de réversion mais celui-ci est extrêmement pléiomorphique. D'autres exemples du processus ([Figure 52](#)) illustrent parfaitement la diversité morphologique de ce processus. La première étape, l'englobement du périplasma est assez similaire entre chaque exemple. La formation des branches est bien plus variable : sur l'exemple 1 panel III une seule longue branche est formée alors que, pour l'exemple 2 panel III de nombreuses branches sont formées.

Figure 52 : Exemples du processus de rétablissement prolifératif



3.2. Chorégraphie au cours de la réversion des éléments-clés connus pour le maintien de l'organisation

Afin de pouvoir comprendre l'établissement de *novo* de l'organisation, nous avons tout d'abord décrit la chorégraphie, au cours de ce processus de réversion, des différents éléments clefs qui participent et/ou caractérisent l'organisation cellulaire.

3.2.1 Contenu génomique au cours du rétablissement prolifératif

Notre première interrogation concernait la reprise de la réplication. Nous avons pour cela visualisé pendant plusieurs heures des sphéroplastes marquée au niveau de l'origine et terminus de réplication du chromosome 1 (*Ori 1/ Ter 1*) ([figure 53](#)). Comme attendu ([chapitre 2](#)), le sphéroplaste présente, au début de l'expérience, 2 foci verts et deux foci rouges puisqu'il contient deux copies complètes du génome (par soucis de visibilité nous avons ici utilisé une souche $\Delta matP$ qui permet de dissocier les deux *ter1* normalement maintenus ensemble par cette protéine). Lorsque la première étape survient (englobement du périplasme montré par une flèche blanche dans la [figure 53 panel n°2](#)), on peut noter la présence de 4 foci verts et 2 rouges signifiant une reprise de la réplication dès la première étape du retour vers la forme proliférative. Après observation de nombreux processus de rétablissement, la formation des branches intervient lorsque le nombre de génome est compris entre 4 et 8 copies.

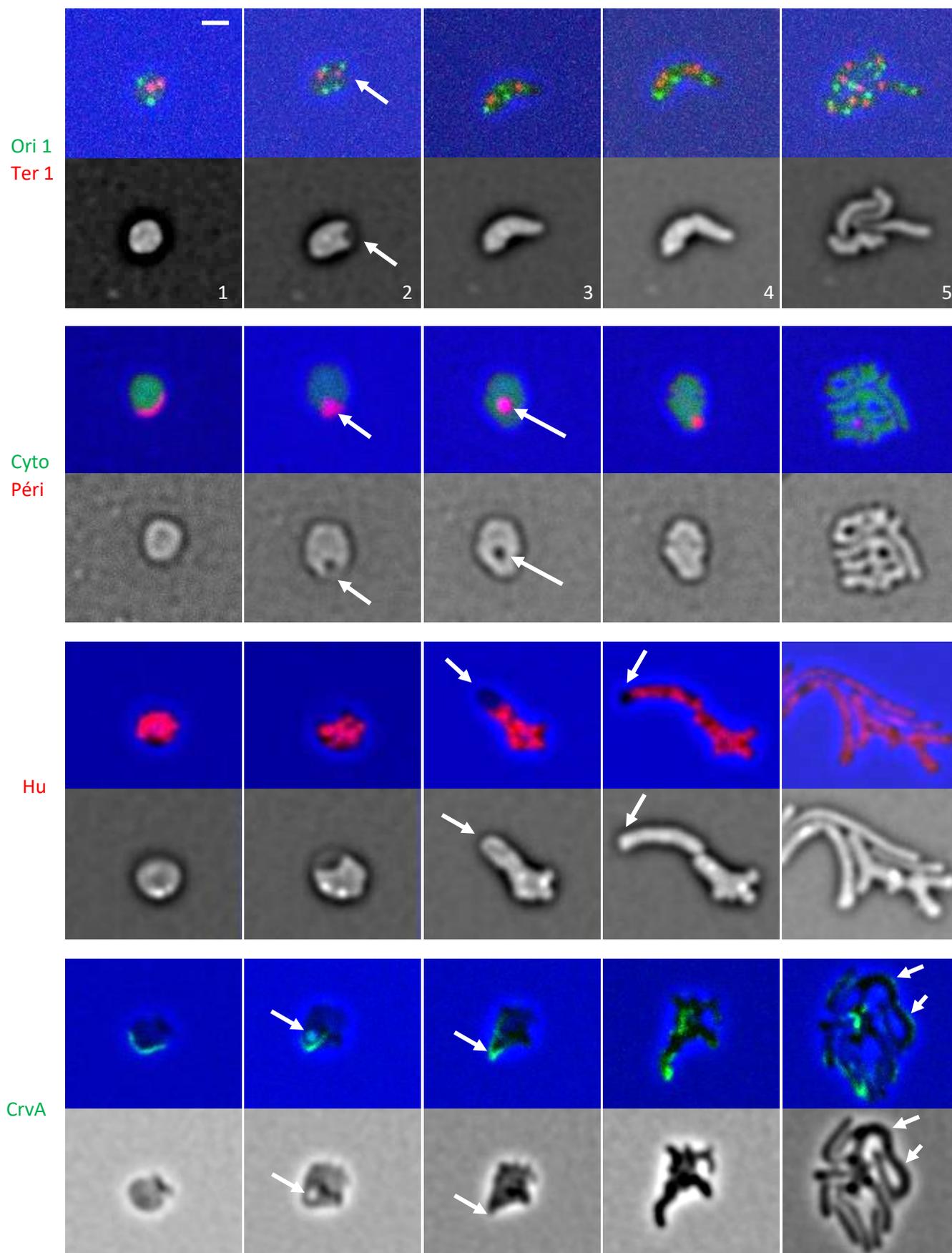
3.2.2 Gestion du périplasme durant le processus

En utilisant une protéine fluorescente localisée dans le périplasme, nous confirmons bien que la première étape du processus de réversion correspond bien à l'englobement du périplasme ([figure 53 panel n° 2 et 3 cyto/péri](#)). De même, on constate que le « rond sombre » qui concentre une proportion importante du signal périplasmique se déplace vers la périphérie, celui-ci devient alors fixe et fini par ne plus être visible au cours du temps. Nous pensons que l'excès de membrane externe doit être pris en charge avant de poursuivre le processus.

3.2.3 Localisation du nucléoïde

L'observation de la localisation de la protéine HU nous indique que le nucléoïde a besoin de temps pour remplir complètement l'espace cytoplasmique lors de la formation des branches ([figure 53 photo n°3 et 4](#)). On peut néanmoins observer qu'un premier événement de division intervient avant même l'occupation totale de l'espace cytoplasmique par le nucléoïde ([Figure 53 photo n°4](#)).

Figure 53 : Chorégraphie de différents acteurs durant le processus de retour



Vidéo-microscopie des souches EGV326 (Ori 1 Ter1 $\Delta matP$), EGV616 (cyto péri), EPV231 (Hu) et EGV600 (CrvA). Les cellules sphériques ont été déposée sur pad d'agarose (M9-MM, 1,5% agarose) après 8h d'incubation dans le M9-MM +0,2% L-Ara. L'échelle est de 2 μ m.

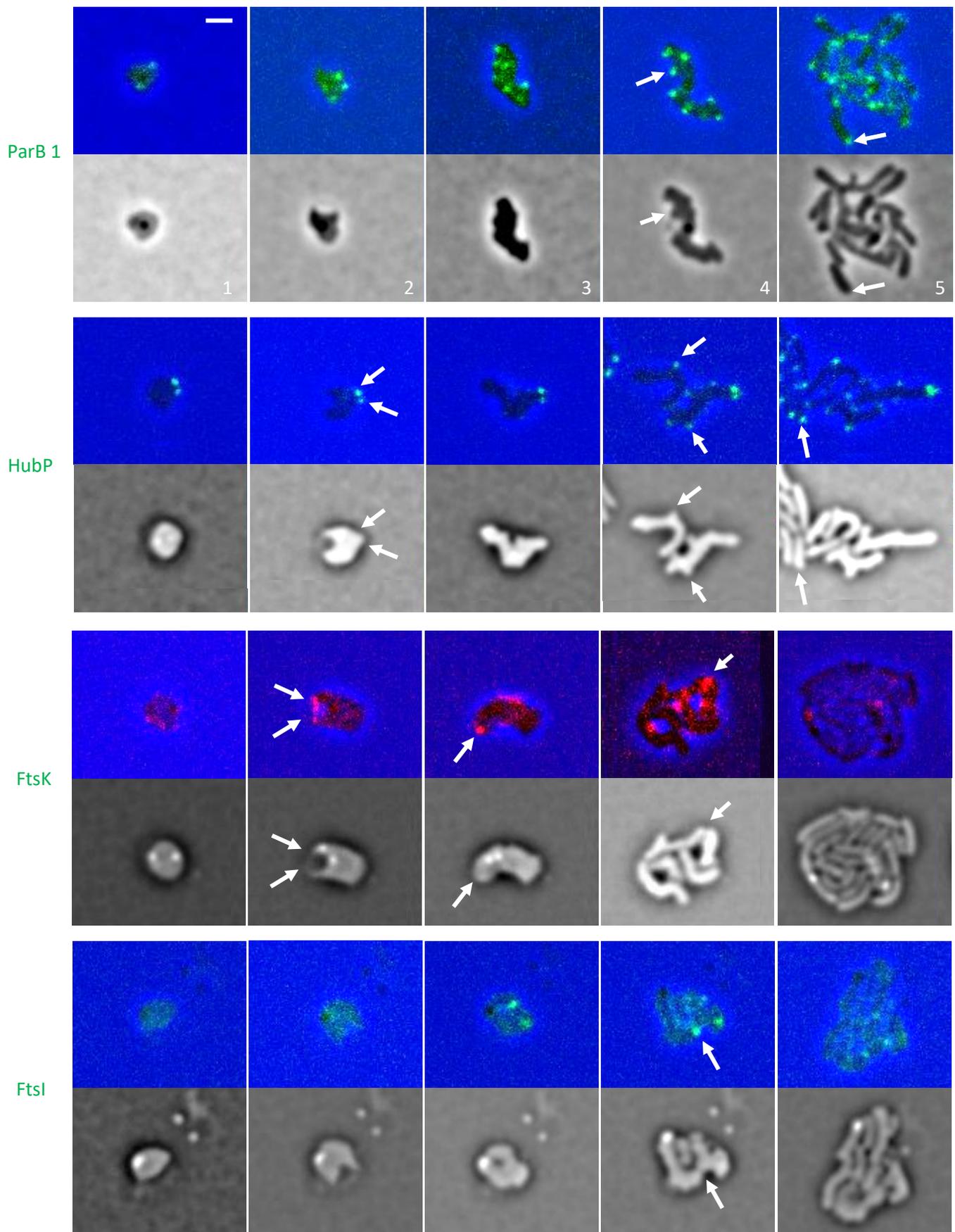
3.2.4 CrvA périplasma et forme incurvée

CrvA, la protéine responsable de l'incurvation de la membrane de *V. cholerae*, présentait la même localisation que le périplasma. Cette observation semble également se confirmer durant le processus de retour, on peut voir une concentration de la protéine en forme de croissant de lune ([figure 53 photo n°1](#)), puis une partie est invaginée durant l'englobement du périplasma ([figure 53 photo n°2](#)) avant de se concentrer à l'extrémité de la branche ([photo n°3](#)). Cette importante concentration à ce niveau se maintient pendant que la fluorescence apparaît au niveau de la face incurvée des futures nouvelles cellules ([photo n°5](#)). Il semblerait que l'accumulation de fluorescence observable sur la [photo n°3](#) ne soit par la suite pas utilisée par la cellule. On retrouve ici la même observation faite avec l'accumulation du signal du périplasma. Ces deux composés présents initialement seraient rapidement écartés au profit d'une nouvelle synthèse (dans le cas de CrvA visible dès la [photo n°4](#)).

3.2.5 Polarité et ségrégation des chromosomes

La protéine ParB1 passe de deux à 4 foci dès la première étape de réversibilité ([figure 54 photo n°1 et 2](#)). Ce nombre continue par la suite d'augmenter. En observant [l'image n°4](#), il semble que les foci ne soient pas localisés aléatoirement dans la cellule. En effet ceux-ci sont localisés au niveau de la périphérie du cytoplasme voir même dans les « branches » (flèches blanches), suggérant un potentiel rôle actif et contrôlé de la protéine. Enfin on peut voir dans la dernière image que la protéine reprend sa place originelle à l'ancien pôle dans les cellules en bâtonnet formées.

Figure 54 : Chorégraphie de différents acteurs durant le processus de retour

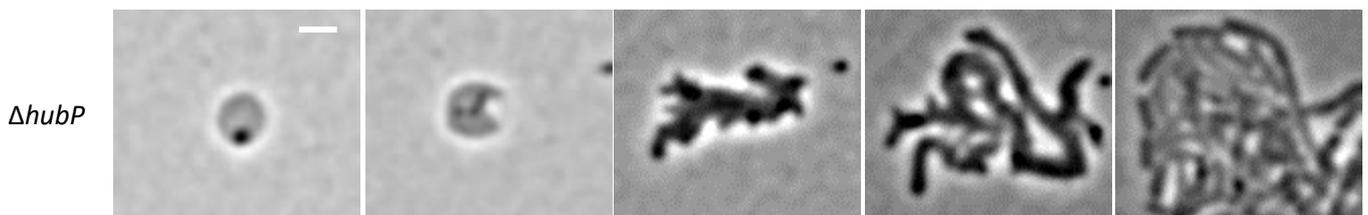


Vidéo-microscopie des souches EGV72, EPV453, EGV9 et EGV34. Les cellules sphériques ont été déposée sur pad d'agarose (M9-MM, 1,5% agarose) après 8h d'incubation dans le M9-MM +0,2% L-Ara. L'échelle est de 2 μ m.

La protéine HubP n'augmente pas son nombre de foci durant l'englobement du périplasme (contrairement à ParB1). En effet seul les 2 foci originaux sont visibles et immobiles (figure 54 photo n°2). Il faudra attendre une longue période de formation de branches et d'élongation avant de voir apparaitre des foci au niveau de l'extrémités de ces branches (photo n°4). De manière intéressante les protéines sont toujours localisées au niveau des extrémités des branches, puis ces branches s'allongent avant de se diviser permettant aux cellules en bâtonnets de présenter à nouveau un foci au niveau de l'ancien pôle tout comme ParB1 (photo n°5).

La chorégraphie de la protéine HubP, suggère une potentielle implication de cette protéine dans la formation des branches. Le processus de rétablissement a donc été analysé dans une souche délétée pour le gène *hubP* (Figure 55). La délétion de HubP n'a eu d'impact sur la formation des branches durant le processus, ni sur la viabilité du processus en général.

Figure 55 : Rétablissement prolifératif d'une souche $\Delta hubP$



Vidéo-microscopie de la souche EGV61. Les cellules sphériques ont été déposée sur pad d'agarose (M9-MM, 1,5% agarose) après 8h d'incubation dans le M9-MM +0,2% L-Ara. L'échelle est de 2 μ m.

3.2.6 Division

La protéine FtsK comme décrit dans le chapitre précédent ne présente pas de localisation particulière dans les cellules sphériques. On peut la voir apparaitre dès l'étape de l'englobement du périplasme, à l'intérieure du cytoplasme effectuant l'invagination (figure 54 photos n°2 et 3), puis la protéine est ensuite observable au niveau des sites de division en fin de processus (photo n°4).

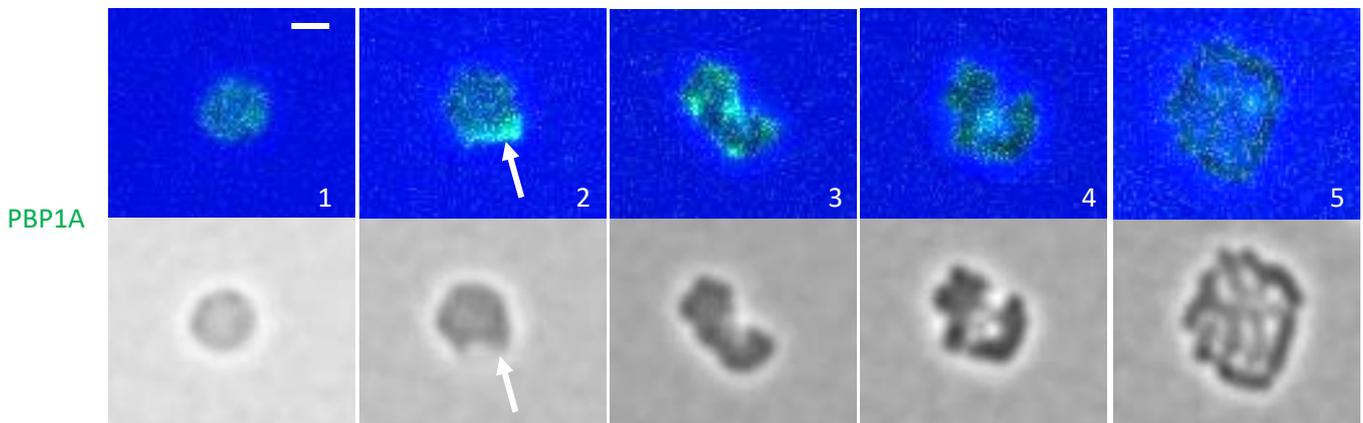
La protéine FtsI qui n'est également pas visible dans l'état sphérique apparait, contrairement à la protéine FtsK après l'étape de l'englobement du périplasme (figure 54

photo n°3). Elle se localise par la suite au niveau des sites de division (photo n°4) de manière similaire à FtsK.

3.2.7 Paroi cellulaire

Nous savons grâce aux résultats de chromatographie présentés au chapitre 1 que les cellules sphériques induites par le L-Ara possèdent une quantité significativement bien plus faible de peptidoglycane que les cellules en phase exponentielle. Nous avons donc visualisé une des protéines responsables de la synthèse du peptidoglycane chez *V. cholerae* : PBP1A afin de suivre la synthèse du peptidoglycane (voir figure 56).

Figure 56 : Rétablissement prolifératif d'une souche marquée pour la protéine PBP1A



Vidéo-microscopie de la souche EGV623. Les cellules sphériques ont été déposées sur pad d'agarose (M9-MM, 1,5% agarose) après 8h d'incubation dans le M9-MM +0,2% L-Ara. L'échelle est de 2µm.

Avant le début du rétablissement aucun foci précis n'est observable sur les cellules sphériques. Cependant au moment de l'englobement du périplasme on peut voir une très forte concentration de la protéine à ce niveau (image n°2). Après cette étape des foci sont visibles un peu partout dans la cellule (image n°3) avant de ne plus être discernable pendant le reste du processus.

Résumé du chapitre 3 et discussion

En résumé de ce chapitre nous avons pu voir que le retour vers la forme proliférative est un processus très variable quant à sa durée et la morphologie adoptée par les cellules. Malgré cela, certaines étapes sont conservées et nous ont permis de hiérarchiser l'implication de certains acteurs cellulaires durant ce processus de retour. La réplication ainsi que la synthèse de ParB1 reprennent tout d'abord en parallèle de l'englobement du périplasme qui semble impliquer les protéines FtsK ainsi qu'une forte synthèse de peptidoglycane. La protéine HubP semble ensuite se localiser au niveau des branches permettant probablement l'ancrage des chromosomes 1 via ParB1. Enfin les protéines de la division FtsK et FtsI se localisent au niveau des sites de clivages pour effectuer la division et permettent l'aboutissement du processus de retour à la forme proliférative.

Nous avons dans ce chapitre décrit les étapes importantes du processus de retour vers la forme proliférative. Il est intéressant de noter que ces étapes ont également été décrites dans l'article (Weaver et al., 2018). Dans cet article, la phase sphérique de *V. cholerae* est induite par un traitement antibiotique visant la paroi bactérienne, et le retour présente les mêmes étapes que celles que nous observons pour notre phénotype. Cela suggère que ce processus pourrait être le même dans les deux situations.

Nous avons également pu voir qu'il existe une différence de chorégraphie entre FtsK et FtsI. On sait que ces deux protéines sont normalement présentes ensemble au sein du divisome, or FtsK semble avoir un second rôle indépendant du divisome au niveau de l'englobement du périplasme.

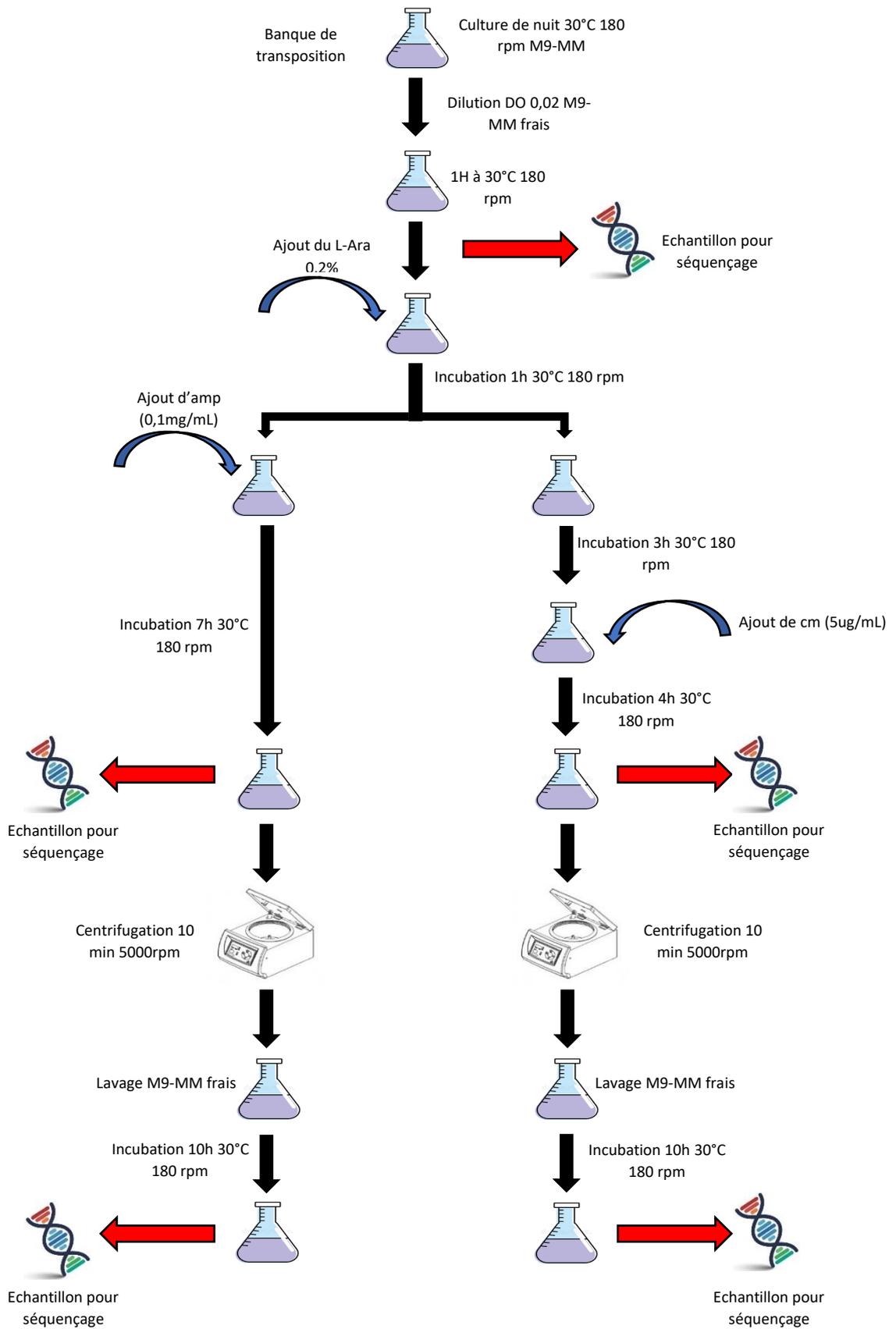
Chapitre 4 : Recherche des acteurs de l'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire (acteurs « *de novo* »)

4.1 Recherche systématique des acteurs « *de novo* » par analyse Tn-Seq post L-Ara : composition d'une banque de mutants transpositionnels après rétablissement post-traitement L-Ara

Nous avons précédemment (chapitre 1) utilisé cette technique Tn-seq qui a permis de proposer la voie catabolique illégitime du L-Ara vers un composé toxique. L'analyse d'une banque de mutants transpositionnels 8h après traitement au L-Ara a révélé la surreprésentation de certains mutants due à leur insensibilité au L-Ara. Le but est d'étudier les mutants qui seraient sous-représentés après rétablissement prolifératif post -traitement L-Ara. Cependant, les mutants L-Ara insensibles étant toujours très surreprésentés dans la banque à ce stade, 18h après traitement L-Ara, l'identification de mutants sous-représentés était très compromise. Pour régler ce problème, nous avons modifié le protocole afin de stopper spécifiquement la croissance des mutants L-Ara insensibles (Figure 57). Pour ce faire, j'ai pris avantage d'une observation que j'avais faite : les cellules traitées au L-Ara sont plus résistantes aux antibiotiques que les cellules en phase exponentielle (voir annexe n°3). Ainsi, l'ampicilline (amp) qui vise la paroi bactérienne ou le chloramphénicol (cm) qui affecte la traduction a été ajouté à la culture 1h ou 4h après ajout du L-Ara, respectivement. 8h après l'ajout du L-Ara, les cellules sont lavées pour retirer à la fois le L-Ara et l'antibiotique permettant de libérer le rétablissement prolifératif.

Nous avons donc cherché des gènes dont la fréquence de transposon diminuait entre le moment du lavage et l'échantillon pris 10h plus tard. Cette analyse a été réalisée à l'œil, via le logiciel de visualisation Artemis. L'analyse des résultats nous a permis d'établir une liste de gènes potentiellement impliqués dans le processus de retour (voir annexe n°3). Il est important de noter qu'aucune différence notable n'a été relevée entre les deux traitements antibiotiques.

Figure 57 : Schéma du crible sélectif pour le retour vers la phase proliférative



Disposant d'une banque ordonnée de mutants par transposition pour tous les gènes non essentiels de *V. cholerae*, le comportement avant, pendant et après le traitement au L-Ara a été analysé pour le mutant de chacun de gènes sélectionnés. De façon surprenante, la quasi totalité des gènes étudiés présentait des défauts morphologiques plus ou moins importants (problème de division, taille altérée etc...) (voir annexe n°3). Nous avons constaté que malgré la réduction de la représentation du transposon dans ces gènes après le processus de retour, ceux-ci sont capable revenir à un état prolifératif après traitement au L-Ara. Nous avons cependant remarqué que les mutants sélectionnés grâce à ce crible semblaient être beaucoup plus long à devenir sphérique. C'est sans doute ce délai de sphéroplastisation et donc de reprise de l'état prolifératif qui explique la sous-représentation dans la banque. Cette approche systématique n'a donc pas permis d'identifier d'acteurs « *de novo* ».

4.2 Approche par gènes candidats : Impact sur l'établissement « *de novo* » de l'inactivation d'acteurs de la maintenance de l'organisation cellulaire

L'approche systématique n'a pas permis d'identifier des acteurs clefs de l'établissement « *de novo* » de l'organisation cellulaire. Une possibilité est que ces acteurs potentiels soient déjà essentiels à la maintenance de cette organisation. Nous avons alors entrepris d'étudier l'impact de l'inactivation de différents acteurs clefs de la maintenance de l'organisation cellulaire sur l'établissement *de novo* de cette organisation.

Comme détaillée dans l'introduction, le maintien de l'organisation cellulaire est lié au cycle cellulaire : élongation de la cellule, répllication/ségrégation du génome, division cellulaire.

-1) L'élongation nécessite une bonne structuration du peptidoglycane (PG) : à la fois la capacité de synthétiser les différents éléments du PG dans le cytoplasme (GlmS, Mur etc...) à les assembler grâce à des enzymes PBPs (classe A et B) mais aussi le guidage de cette synthèse grâce au système MreBCD qui maintient ainsi la bonne forme de la cellule.

-2) La réplication / ségrégation du génome. Nous avons précédemment pu voir que les premières étapes du rétablissement de la forme proliférative est associée à une intense reprise de la réplication. Nous souhaitons donc savoir si l'absence de la reprise de ce processus pouvait interférer avec le rétablissement. Pour cela nous avons tenté d'obtenir un mutant thermosensible de la protéine d'initiation DnaA, malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir ce mutant. Concernant la ségrégation nous savons déjà que l'absence de la protéine de polarité HubP n'est pas essentielle au retour à l'état prolifératif, il en est de même pour le système ParAB1 (données non montrées).

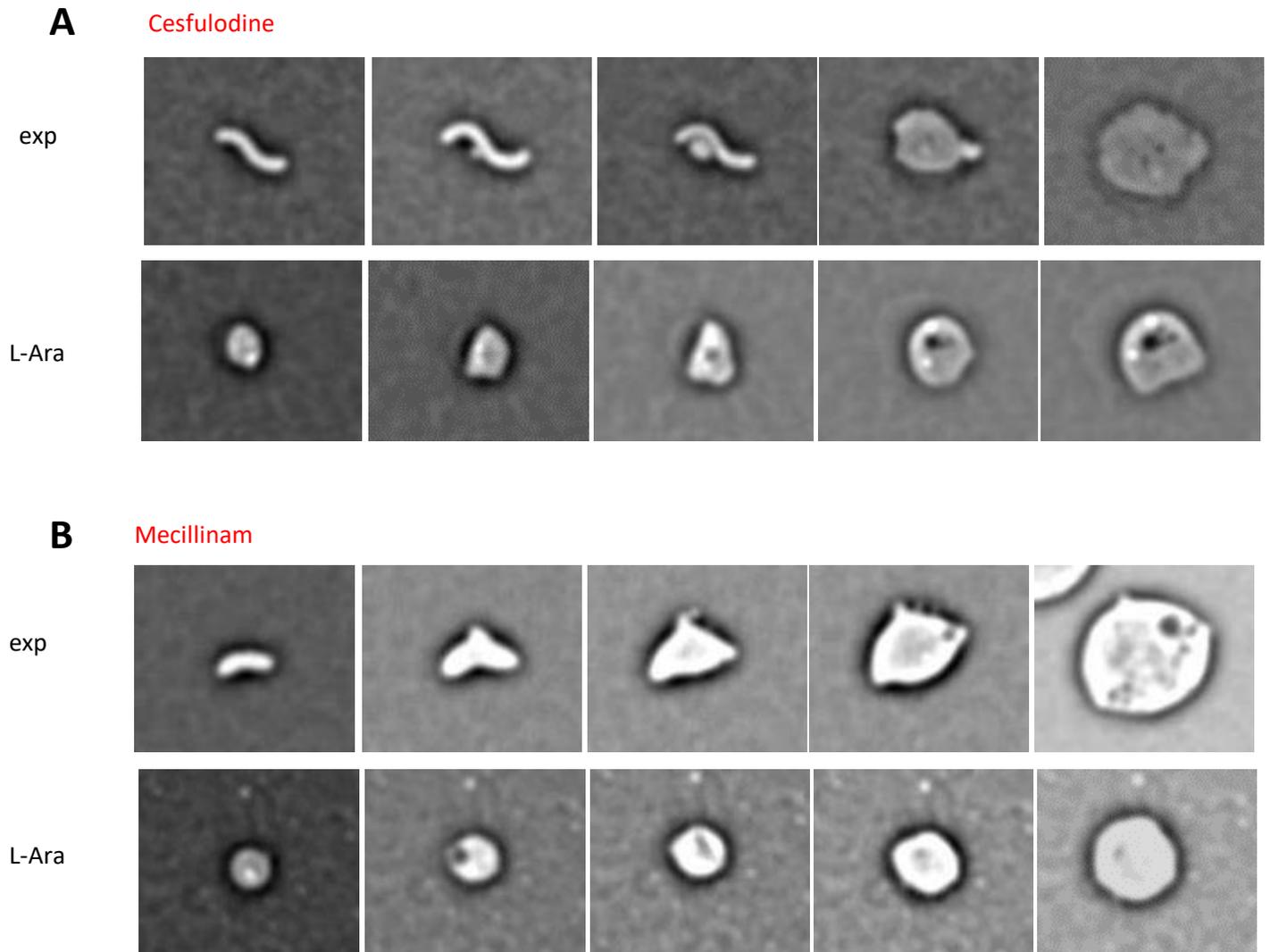
-3) La division, qui implique de nombreux acteurs aussi bien cytoplasmiques (FtsZ) que périplasmiques (FtsI). Ces deux protéines ont pu être obtenus en version thermosensibles, ce n'est cependant pas le cas pour la protéine FtsK que nous souhaitons également pouvoir retirer afin de voir son implication dans le processus de retour.

Nous avons donc inactivé des acteurs de l'élongation, du maintien de la forme et de la division soit en utilisant des antibiotiques ciblant PBP1 A/B (cefalodine), PBP2 (mecilline) ou MreB (A22). Soit en utilisant des allèles thermosensibles en conditions non-permissives (42°C au lieu de 30°C) pour FtsZ et FtsI.

4.2.1 Acteurs de l'élongation

La cefalodine est une molécule inhibant le fonctionnement des PBP de classe A, correspondant aux protéines bifonctionnelles capables de créer les chaînes peptidiques et de sucres (PBP1 A et B). Cet antibiotique empêche donc la synthèse *de novo* de PG. Lorsqu'il est ajouté dans un pad d'agarose (M9-MM + 1,5 % agarose) sur lequel est déposé des cellules en phase exponentielle, on observe que l'élongation des cellules et leur division sont immédiatement inhibées ([figure 58 A exp](#)). On observe ensuite comme dans le cas de la sphéroplastisation induite par le L-Ara, une boursoufflure à un endroit de la paroi ([figure 58 A exp, photo n°2](#)). Cette boursoufflure s'accroît au cours du temps jusqu'à englober l'ensemble de la cellule et aboutit à l'obtention d'une cellule sphérique qui augmente en volume et finit par éclater ([figure 58 A exp, photo n°3, 4 et 5](#)).

Figure 58 : Vidéo-microscopie illustrant l'effet de la cefsulodine (A) et du mécillinam (B) sur des cellules en phase exponentielle (exp) ou des sphéropastes induits au L-Arabinose (L-Ara).



Lorsque la cefsulodine est ajoutée dans le pad d'agarose, on peut voir que le processus de rétablissement prolifératif est initié normalement avec le début de l'englobement du périplasme ([Figure 58 A L-Ara, photo n°2](#)). Cependant, on peut voir, dès la [photo n°3](#) que cette étape dure plus longtemps que la normale. De plus, le volume du périplasme commence à augmenter et son englobement ne semble plus être progresser (absence d'apparition du rond sombre). Sur les [photos n°4 et n°5](#), cette tendance s'amplifie avec une augmentation de la taille du sphéropaste. L'ajout de cette drogue empêche donc la bonne réalisation de la première étape du rétablissement prolifératif : l'englobement du périplasme. Le volume

cellulaire continuant à augmenter, on observe comme dans le cas des cellules en phase exponentielle, l'éclatement des cellules.

La mecillinam est une molécule inhibant les fonctions de la PBP de classe B monofonctionnelle PBP 2 qui est impliquée dans l'élongasome. Lorsque cette molécule inhibitrice entre en contact avec les cellules en phase exponentielle, on peut observer une modification de forme : la cellule devient plus ou moins triangulaire mais sans formation de boursoufflure ([figure 58 B exp](#)). Ces cellules déformées augmentent ensuite leur volume avant de mourir tout comme les cellules traitées à la cefsulodine.

Dans le cas du traitement des sphéroplastes au mecillinam, contrairement à la cefsulodine, on peut voir dès la [photo n°2 \(figure 58 B, L-Ara photo n°2\)](#) que les cellules sont capables de réaliser l'englobement du périplasme. Cependant, en observant la suite du processus ([photos n°3, 4 et 5](#)), aucune autre étape du retour n'est réalisée par la suite (formation et élongation de branches, division). En effet, seule une nette augmentation de volume est visible après la réalisation de l'englobement du périplasme menant, cette fois encore, à la mort cellulaire.

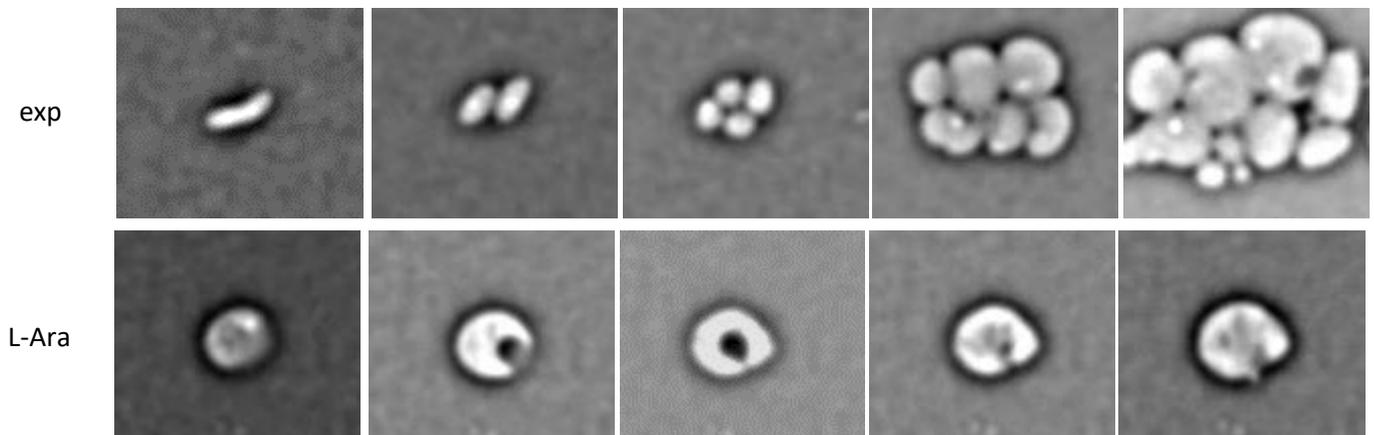
Ainsi, l'inhibition de PBP1 A/B empêche le processus de rétablissement prolifératif dès la première étape alors que l'inhibition de PBP2 stoppe le processus après la réalisation de l'englobement du périplasme. Il semble donc que cette première étape nécessite une capacité importante mais partielle de synthèse de PG alors que l'étape suivante, la formation de branche, nécessite l'ensemble des capacités de synthèse de celui-ci.

4.2.2 Acteur du maintien de la forme en bâtonnet

A22 est une molécule inhibant la fonction de la protéine MreB, protéine chargée de guider correctement l'élongasome (notamment PBP2) permettant ainsi une synthèse localisée du peptidoglycane. L'exposition à cette molécule induit l'arrondissement des bâtonnets ([Figure 59 exp, photo n°2](#)). Cependant, contrairement aux deux exemples précédents, cette molécule n'empêche pas immédiatement la division des cellules. On observe deux événements de division ([photo n°3, 4](#)) avant d'observer que les cellules

sphériques ne se divisent plus. Ensuite, leur volume augmente avant d'aboutir à des masses cellulaires difformes et mortes (photo n°5).

Figure 59 : Vidéo microscopie illustrant l'effet de A22 sur des cellules en phase exponentielle (exp) ou des sphéropastes induits au L-Arabinose (L-Ara)



En présence d'A22, les sphéropastes induits par le L-Ara sont capables d'effectuer l'englobement du périplasme, de manière très lente (Figure 59 L-Ara, photo n°2 et n°3). En revanche, aucune autre étape du rétablissement à l'état prolifératif n'est observée malgré une augmentation du volume cellulaire. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque qu'il suggère que malgré la capacité de synthèse *de novo* de PG, l'incapacité de bien guider cette synthèse due à l'inhibition de MreB semble empêcher la possibilité de formation de branchement. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec le traitement de PBP2 au mecillinam.

On peut donc proposer que la protéine MreB connue pour maintenir la forme en bâtonnet est également nécessaire à l'établissement *de novo* au niveau de la formation de branches. Il serait intéressant d'étudier si des allèles mutants de MreB connue pour supprimer l'effet de A22 en condition végétative serait également capable de supprimer l'absence de branchement en condition de rétablissement post L-Ara.

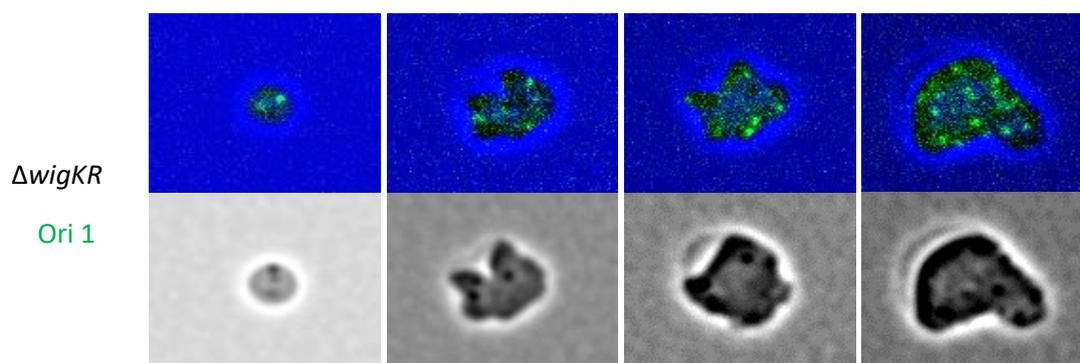
Ces trois molécules provoquent différentes d'altérations de la paroi : la cesfulodine inhibe la bonne synthèse globale du PG et aboutit à une rupture de celui-ci (aboutissant à la formation de la boursoufflure). Le mecillinam agit de manière plus localisée sur l'élongosome

empêchant la bonne organisation du PG altérant la forme de la bactérie. Ces deux molécules inhibent rapidement la division cellulaire contrairement à la troisième A22. Celle-ci empêche la synthèse localisée du PG et abouti à la formation de cellules arrondies qui finissent par mourir.

Sur des sphéroplastes, ces molécules provoquent aussi différentes conséquences : une incapacité d'englobement du périplasma c'est-à-dire l'absence de peptidoglycane suffisamment structuré (Cesfulodine) ou une incapacité de formation de branche *de novo* potentiellement due à l'incapacité d'ordonner convenablement la structure du peptidoglycane (Mecillinam et A22). Ces résultats nous renseignent sur une partie au moins des activités nécessaires aux deux premières étapes de l'établissement *de novo* de l'organisation cellulaire.

Comme vu dans l'introduction WigKR est un système à deux composants impliqués dans la détection des défauts de peptidoglycane. Le processus n'a pas encore été totalement décrit mais WigK est un senseur de l'état de l'intégrité du peptidoglycane. La dégradation du PG provoque la phosphorylation du facteur de transcription WigR qui induit une série de réponses cellulaires augmentant la synthèse des acteurs du peptidoglycane. Lorsque ce système est muté chez *V. cholerae*, on n'observe pas de phénotype en conditions normales. En revanche, les sphéroplastes deviennent incapables d'effectuer l'englobement du périplasma, le volume cellulaire augmente de façon continue, aboutissant à la mort des cellules (Figure 60). Ce système est également essentiel lors d'un retour après le traitement par des antibiotiques visant la paroi (Dörr et al., 2016a).

Figure 60 : Vidéo-microscopie de sphéroplastes $\Delta wigKR$ + marquage pour l'Ori 1 lors du retour à la forme proliférative



De plus, on remarque que, comme pour le retour en condition sauvage, l'accroissement de volume coïncide avec l'activation de la réplication du chromosome 1 et cela pour plusieurs cycles. Cette observation explique la raison pour laquelle notre technique TnSeq n'a pu identifier ces deux gènes *wigKR*. Même si le rétablissement de la prolifération n'est pas viable au niveau cellulaire, il y a tout de même prolifération du contenu génétique.

2.2.3 Acteurs de la division

Le rôle des acteurs de la division cellulaire, impliqués dans le maintien de l'organisation cellulaire a ensuite été testé. Pour cela, nous avons utilisé une souche dont la seule copie endogène du gène *ftsZ* a été remplacée par un allèle thermosensible (*ftsZts*). La même stratégie a été appliquée pour *ftsI* (*ftsIts*).

Comme attendu, le passage à température non permissive (42°C) de cellules *ftsZts* ou *ftsIts* préalablement cultivées à 30°C provoquent la filamentation des cellules (Figure 61 A et B exp). La division cellulaire devient impossible soit du fait de l'impossibilité de positionner l'ensemble de la machinerie de division (*ftsZts*) soit du fait de l'impossibilité de catalyser les réactions permettant la modification du PG pour permettre l'invagination (*ftsIts*).

L'effet du passage à 42°C sur des sphéroplastes obtenus par traitement au L-Ara à 30°C n'empêche pas le rétablissement prolifératif (figure 62 A et B L-Ara). L'englobement du périplasme ainsi que la formation de branche sont bien observés dans un intervalle de temps normal. En revanche, comme dans le cas des cellules en phase exponentielle, on observe bien de la filamentation.

En conclusion, les activités requises pour la division cellulaire ne le sont pas pour le rétablissement de novo de l'organisation cellulaire.

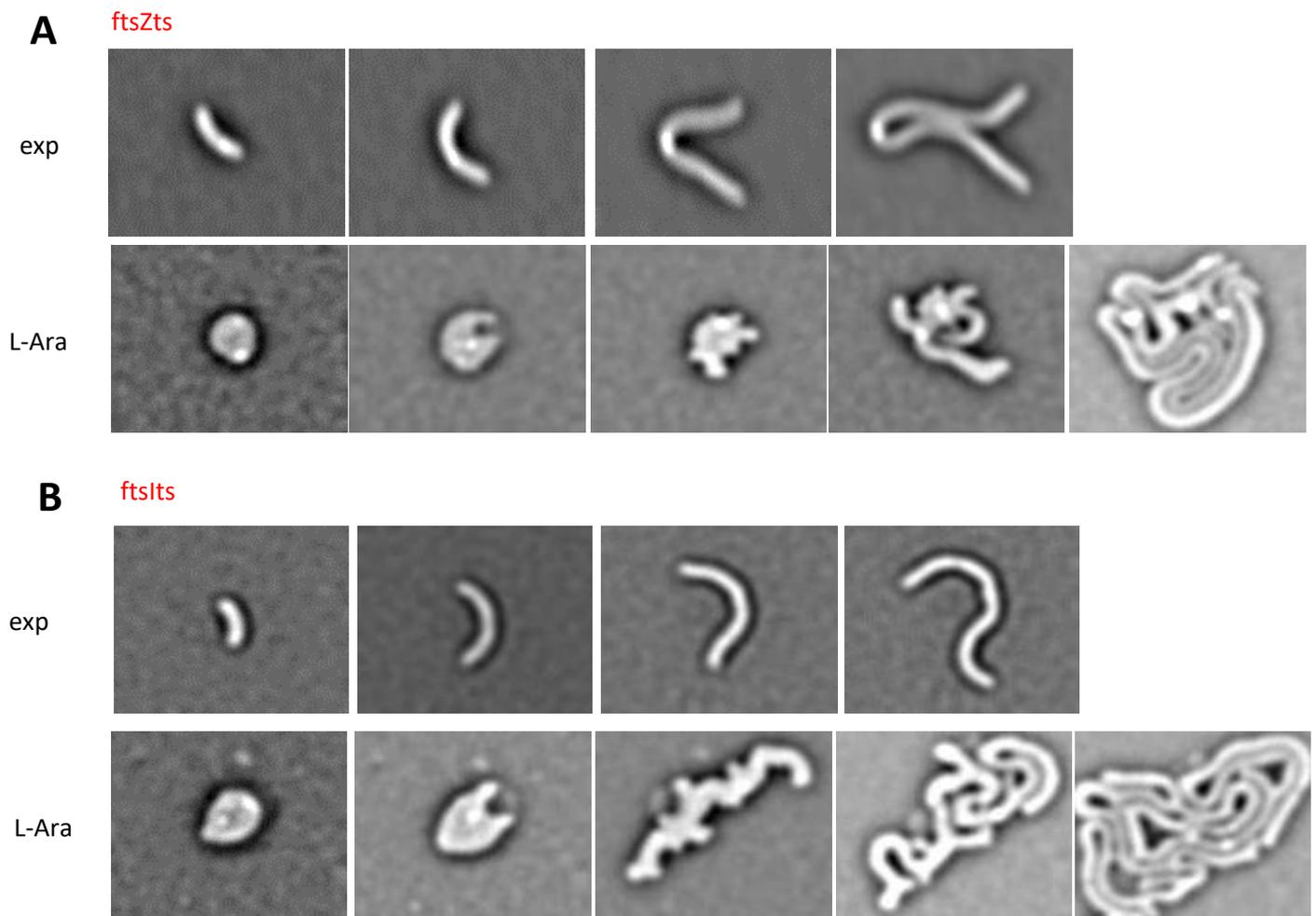


Figure 61 : Vidéo microscopie illustrant l'effet du passage à température non permissive (42°C) d'une souche *ftsZts* (A) et d'une souche *ftsIts* (B) à partir d'une culture exponentielle à 30°C (exp) ou à partir de sphéroplastés induits au L-ara à 30°C (L-Ara).

Résumé du chapitre 4 et discussion

Dans ce chapitre, nous avons eu recours à une technique de crible systématique par Tn-Seq qui n'a pas été concluante. Cependant, nous avons pu comprendre plusieurs raisons pouvant expliquer la présence de faux positifs et éventuellement être capable d'améliorer cette approche.

Grâce à une approche par gène candidat, nous avons pu révéler que les PBP de classe A ainsi que le système à deux composants WigKR sont essentiels pour réaliser la première étape du retour à la forme proliférative. De plus, nous avons montré que l'élongasome (synthèse et guidage) n'est pas requis pour cette étape d'englobement mais l'est pour la suivante : la formation de branches (Mecillinam et A22). Ces résultats sont résumés dans la [figure 62](#).

Sur l'ensemble des acteurs testés dans cette étude, seul des acteurs en lien avec le peptidoglycane ont été capable d'altérer le rétablissement de la prolifération de *V. cholerae*. Le rétablissement de l'organisation reste à être inspecté dans des conditions d'inhibition de la réplication. Nous avons vu que l'absence de la protéine HubP n'affecte pas le processus de retour, c'est également le cas pour l'absence du système ParAB1 (données non montrées). Il pourrait être intéressant d'observer le retour d'une souche dépourvues à la fois du système ParAB1 et de la protéine HubP. Le retour à l'état prolifératif a également pu être observé en absence des protéines comme SImA ou CrvA et sans phénotypes intéressants (données non montrées). Enfin nous pourrions également nous intéresser aux protéines associées au nucléoïde comme MukB.

Figure 62 : Résumé de l'utilisation et des effets des molécules inhibitrices de la paroi

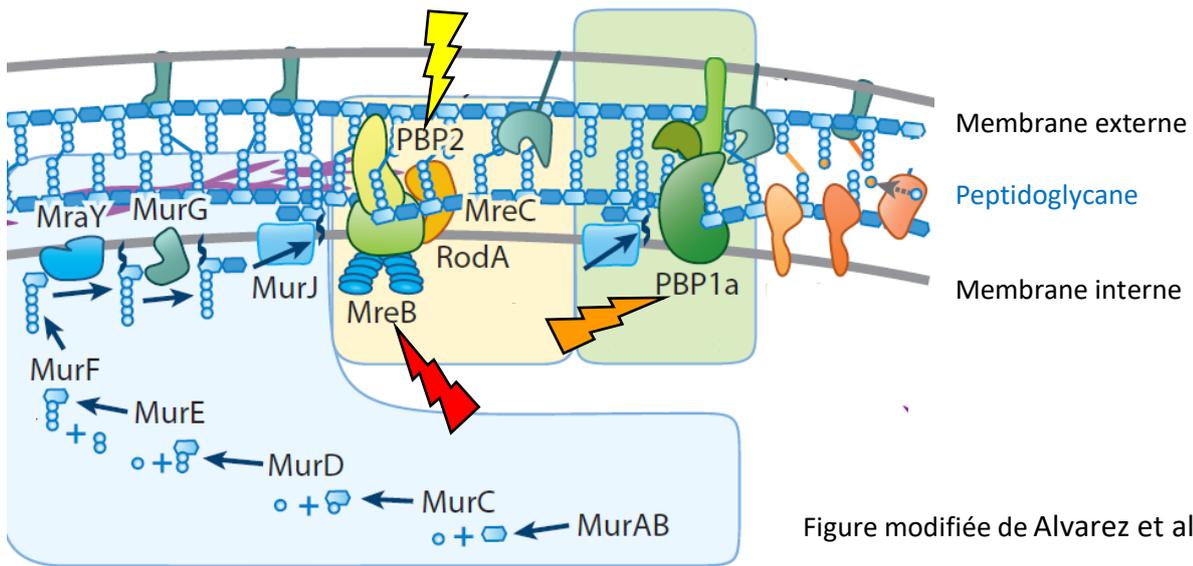


Figure modifiée de Alvarez et al., 2021



A22 = inhibition de **MreB**, permet l'englobement du périplasme mais arrêt du processus de retour après cette première étape



Mecillinam = inhibition de **PBP2**, permet l'englobement du périplasme mais arrêt du processus de retour après cette première étape



Cefsulodine = inhibition de **PBP1 A**, ne permet pas l'initiation du processus de retour

Discussion et perspectives

Grâce aux différents moyens d'échanges d'information, les bactéries sont des organismes dotés d'une incroyable capacité d'adaptation, illustrée par le panel de leurs stratégies de survie (biofilm, dormance, persistance etc..) (Rittershaus et al., 2013). Il est essentiel d'étudier l'ensemble de ces processus afin de pouvoir potentiellement les stopper et limiter l'expansion des souches multi résistantes. Il est également important de poursuivre les travaux fondamentaux améliorant nos connaissances des diverses espèces bactériennes.

Nous avons ici eu l'occasion d'entremêler ces deux aspects avec d'un côté la recherche fondamentale : l'étude de l'établissement *de novo* de l'organisation intracellulaire. Et d'un autre la recherche plus appliquée : la découverte d'un nouveau moyen d'induire un état de CWD chez *V. cholerae* qui par définition rend la bactérie résistante à nos antibiotiques visant la paroi.

L'organisation des cellules est essentielle à leur prolifération. Nous avons pu montrer que son établissement *de novo* était très fortement lié à la synthèse du peptidoglycane :

- 1) dans un premier temps, une synthèse non « guidée » afin de retrouver une paroi normale
- 2) puis, une synthèse guidée par l'élongasome qui forme ex-nihilo des branches de diamètre de plus en plus proche du diamètre normal
- 3) finalement, la synthèse guidée par le divisome achève de retrouver les cellules bâtonnets

La clef de l'organisation cellulaire pourrait être détenue par l'information de courbure contenue dans les micro-filaments de MreB. Il serait intéressant de tester les conséquences de l'expression d'une protéine MreB résistante à A22 et provenant d'une bactérie avec un diamètre cellulaire différent de celui de *V. cholerae*. Pourrions-nous créer des cellules *V. cholerae* avec un diamètre cellulaire agrandi ou diminué ?

Les mécanismes de régulation précis de la synthèse du peptidoglycane restent encore peu décrits. Le régulateur de l'expression de cette synthèse WigKR est décrit comme capable

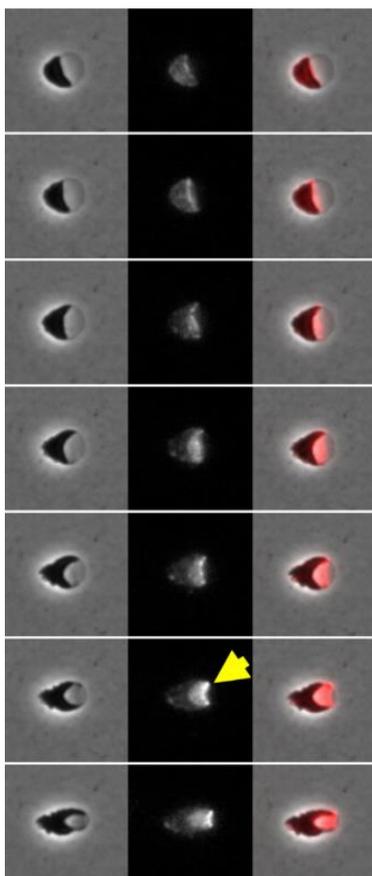
d'influer sur l'expression des acteurs impliqués à la dans la fabrication et inhibition de la production des précurseurs et assembleurs du peptidoglycane(Dörr et al., 2016b). Il semble ainsi différer du système décrit chez *B. subtilis* WalkR qui est principalement responsable d'une modulation de l'expression des enzymes capables de dégrader la paroi. Il pourrait donc être intéressant de pousser l'étude de ce système à deux composants, nous pourrions notamment observer les changements d'expression géniques lors du retour à la phase proliférative en absence de celui-ci (avant la mort des cellules).

Comparaison entre les différentes CWD de *V. cholerae*

Les sphéroplastes peuvent être obtenus chez *V. cholerae* après une longue exposition au froid, le traitement avec des molécules visant la paroi (antibiotiques, lysozyme etc...) et l'utilisation du L-Ara. L'idée de comparer ces 3 états apparaît évidente afin de déterminer si il s'agit d'un unique état aux propriétés communes (organisation cellulaire, rétablissement etc...) ou à l'inverse des cellules complètement différentes.

L'organisation cellulaire des sphéroplastes obtenus par l'exposition au froid n'a jamais été investiguée de par la nature VBNC de cet état. En effet une fois les cellules devenues sphériques il est impossible de les faire revenir à l'état prolifératif dans un délai compatible avec les observations microscopiques. Nous pouvons donc focaliser nos analyses sur les données disponibles sur les sphéroplastes obtenus par le traitement aux antibiotiques. Nous avons déjà pu voir que les étapes séquentielles du retour vers la phase proliférative (englobement du périplasma, élongation, formation de branches et division) sont partagées entre les cellules traitées aux antibiotiques et celles obtenues via L-Ara (Figure 25) (Weaver et al., 2018). La localisation des acteurs de l'organisation n'a pas été définie dans les cellules traitées aux antibiotiques, cependant la position de la protéine PBP1A a été suivit durant le retour à l'état prolifératif (Figure 63) (Weaver et al., 2018).

Figure 63 : Localisation de la protéine PBP1A durant le retour à l'état prolifératif de cellules traitées à la pénicilline



Vidéo microscopie du retour à l'état prolifératif de cellules traitées à la pénicilline G ($100 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) pendant 3h puis déposées sur pad d'agarose ne contenant pas d'antibiotiques. La souche utilisée exprime une version fluorescente de la protéine PBP1A (Weaver et al., 2018).

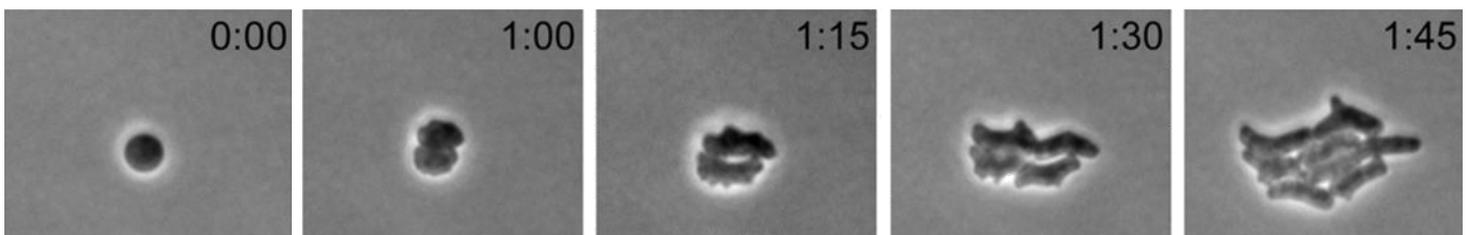
La protéine se localise de manière très intense au niveau de l'englobement du périplasme de manière similaire à ce que nous avons pu observer avec nos cellules L-Ara (Figure 56).

Le reste de l'organisation cellulaire reste encore à établir, cependant au vu de la similarité des résultats obtenus (étapes du retour à l'état prolifératif, localisation de PBP1A, essentialité de WigKR) il semblerait que les deux états CWD partagent la même voie de retour. Les cellules traitées au L-Ara pourraient donc servir de modèle d'étude car elles ont pour avantage de présenter un volume stable contrairement aux cellules traitées aux antibiotiques.

Comparaison avec d'autres CWD

Si il semble que les cellules CWD de *V. cholerae* partagent une voie de retour à l'état prolifératif commune, nous pouvons nous demander si cette voie est également similaire chez les CWD des autres bactéries. Il est facile d'obtenir des cellules CWD chez *E. coli*, en effet sa paroi est très sensible au lysosyme qui provoque sa dégradation. Les CWD ainsi obtenu peuvent ensuite être déposés sur pad d'agarose pour observation du retour à la phase proliférative (Figure 64).

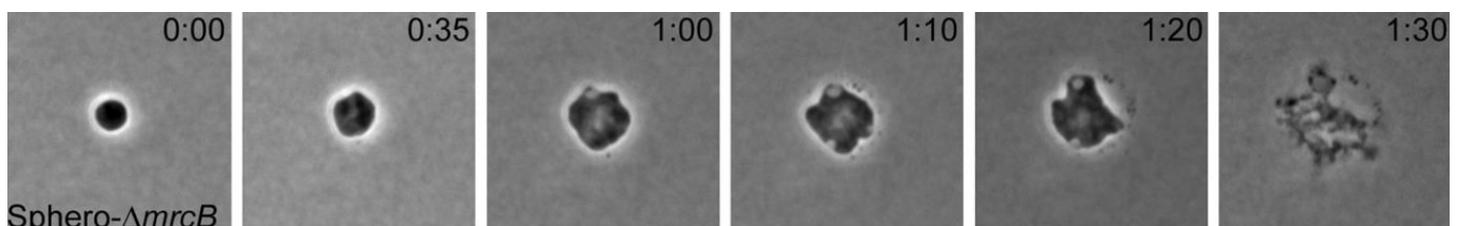
Figure 64 : Retour à la phase proliférative de cellules CWD chez *E. coli*.



Vidéo microscopie du retour à l'état prolifératif de cellules déposées sur pad d'agarose contenant un osmoprotectant (sucrose). Le temps indiqué est en h : min. (Ranjit et al., 2017).

L'apparence des sphéroplastes de *E. coli* est en tout point similaire à celle de *V. cholerae* après traitement au L-Ara. Cependant le processus de retour semble être différent pour *E. coli*, une division cellulaire a lieu après 1h d'attente et semble être la première étape du retour. Dans le cas de *V. cholerae* les divisions n'ont lieu qu'à la fin du processus (après plusieurs heures). Il semble que les cellules essayent de former des branches (1 :15) mais celles-ci ne s'élongent jamais complètement à l'inverse de celles de *V. cholerae*. Le processus de retour chez *E. coli* s'avère être beaucoup plus rapide que celui de *V. cholerae* et est fondamentalement différent de par sa réalisation. Cependant il a été montré que le retour à l'état prolifération des CWD de *E. coli* était dépendant de la protéine PBP1B (MrcB chez *E. coli*) (Figure 65) (Ranjit et al., 2017).

Figure 65 : Retour à la phase proliférative de cellules CWD chez *E. coli* en absence de PBP1B



En absence de cette protéine les cellules ne sont pas capables de se diviser comme prévu et finissent par exploser. Malgré un processus très différent chez les deux espèces la gestion de la synthèse / intégrité de la paroi semble être la clé de la compréhension du retour à phase proliférative bactérienne.

RNAseq et perspectives

A la suite de notre expérience d'RNAseq, nous nous sommes focalisés sur la drastique réduction de l'expression du gène *glmS*, il reste cependant de nombreuses données à exploiter (Annexe n°2). Au sein des gènes surexprimés 2h après traitement on observe la présence de la protéine LolB décrite comme un acteur de l'insertion des lipoprotéines dans la membrane externe des Gram- (Tanaka et al., 2001). Nous savons désormais qu'il existe un écart entre la membrane interne et externe au niveau du croissant de lune chez les cellules traitées au L-Ara. Il pourrait être intéressant si la surexpression de cette protéine joue un rôle dans ce processus.

Parmi les gènes les plus réprimés dès deux heures de traitement on retrouve deux gènes impliqués dans le métabolisme du fer. Le premier, VC0608, est responsable de l'import de celui-ci via un transporteur ABC et l'autre, VC0773, est un important sidérophore (Wyckoff et al., 1997). L'import et le stockage du fer semble donc évité à tout pris lors du traitement au L-Ara. Il est connu que le métabolisme de ces molécules est associé à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent à long terme être létales pour les cellules. Les cellules traitées au L-Ara pourraient donc être potentiellement plus sensibles à ces ROS.

Enfin, les cellules L-Ara n'augmentent pas en volume une fois les sphéroplastes formés contrairement à ceux formés par les antibiotiques (Weaver et al., 2018), cette différence pourrait s'expliquer par l'activation de différentes voies de réponses cellulaires. Nous savons par exemple que la réponse stringente bactérienne permet aux cellules d'arrêter la prolifération (réplication, division) afin de rediriger les ressources afin de favoriser la survie. Cette réponse pourrait être activée par le traitement au L-Ara mais pas par l'ajout d'antibiotiques.

Matériel & Méthodes

Culture et conservation des souches de *V. cholerae* et *E. coli*

Les cultures bactériennes de *V. cholerae* sont effectuées soit dans un milieu nutritif M9-MM (voir composition dans [l'annexe n°1](#)) auquel nous ajoutons 0.2 % de fructose et 1 ug/mL de thiamine. Soit dans un classique milieu Luria-Bertani (LB) sous agitation 180 rotations par minutes (rpm) à 30°C. Les cultures de nuit sont réalisées sur une durée d'environ 16 à 17h.

Les souches sont conservées à -80°C, pour cela une culture de nuit est mélangée à 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO) avant stockage à -80°C. Ces stocks sont ensuite striés sur boîte LB en présence ou non d'antibiotiques, conservables à température ambiante quelques jours. L'ensemble des cultures réalisé dans cette étude (sauf si précisé) a été réalisé à partir de boîtes LB fraîchement striées. La liste des antibiotiques ainsi que les concentrations utilisées pour cette étude sont détaillées dans le [tableau 4](#) de [l'annexe n°1](#).

Les souches de *E. coli* sont cultivées à 37°C 180 rpm en milieu LB. Les souches sont tout comme *V. cholerae* conservées à -80°C avec le même protocole. Les souches sont également striées sur boîte LB en présence ou absence d'antibiotiques avant utilisation.

La liste des souches utilisées pour cette étude est donnée dans le [tableau 5](#) présenté en [annexe n°1](#).

Construction de plasmides et souches mutante de *V. cholerae*

Le laboratoire utilise comme modèle un dérivé de la souche clinique de *V. cholerae* appelée N16961. En effet la souche N16961 a été modifiée afin de la rendre naturellement transformable comme décrits par Meibom et al (Meibom et al., 2005). Les plasmides sont réalisés en suivant les techniques classiques de biologie moléculaire (PCR, digestion enzymatique, ligation, transformation de *E. coli* pour amplification et purification plasmidiques). Le plasmide purifié est ensuite transformé dans *V. cholerae*. Rapidement une culture est lancée dans 5mL de LB, lorsque la densité optique (DO) atteint 0.5, 1 mL de culture

est prélevé centrifugé et resuspendu dans un milieu M9-MM-transfo (voir composition en [annexe n°1](#)). Ce mL est ensuite utilisé pour inoculer un tube contenant de la chitine, celle-ci permettra la formation de biofilm essentiel pour la transformation des bactéries (Meibom et al., 2005). Après une journée à 30°C sans agitation l'ADN à transformer est ajouté dans la culture (environ 1µg). Après une autre journée la culture est vortexée afin de briser le biofilm et les cellules sont étalées sur boîtes LB + antibiotique pour sélection. Après obtention de clones sur milieu sélectif, une PCR est réalisée pour vérification de la souche avant utilisation.

La construction des plasmides est effectuée dans des *E. coli* compétentes DH5α.

Traitement au L-Arabinose (L-Ara) de *V. cholerae*

Une culture de nuit est lancée dans du M9-MM, elle est utilisée pour ensemercer 5mL de milieu M9-MM frais à $D_0 = 0.02$. Après 1h d'incubation à 30°C 180rpm 0.2% de L-Ara sont ajoutés à la culture puis remise à incuber. Les observations microscopiques (photos et vidéo-microscopie) sont réalisées après 8h d'incubation avec le L-Ara.

Courbe de croissance et dénombrement bactérien

Les courbes de croissance sont réalisées si non précisé en milieu M9-MM à 30°C 180 rpm. La densité optique mesurée à 600nm par spectrophotomètre toutes les heures. Les courbes montrées sont les moyennes calculées sur 3 expériences indépendantes l'écart type est montré pour chaque point. La viabilité des cellules traitées au L-Ara a également été mesurée en comptant le nombre de cellules capable de former des colonies (CFU). Pour cela des prélèvements ont été effectués toutes les heures afin de réaliser des dilutions en cascades couplés à des étalements sur boîtes LB. Ces expériences ont également été réalisées en tripliquas indépendants.

Observations au microscope de *V. cholerae*

Snapshots :

Les prises d'image au microscope ont été réalisées à différents temps du cycle cellulaire bactérien. Les images prises en phase stationnaire (stat) sont obtenues suite à une culture de nuit en milieu M9-MM. Les images en phase exponentielle (exp) sont acquises lorsque qu'une culture de nuit diluée à $DO = 0.02$ dans un milieu M9-MM frais atteint $DO = 0.1$. Les cellules traitées au L-Ara sont observées après incubation de 8h avec le sucre.

Pour les photos un pad d'agarose (1% agar, eau) est déposé sur une lame de microscopie (Menzel-Gläser). 1 μ L de cellules est ensuite déposé sur le pad, celui-ci est ensuite recouvert avec une lamelle avant observation. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM6000-B avec un objectif X100 équipé d'une caméra digitale CMOS ORCA-FUSION BT C15440-20UP (Hamamatsu).

Vidéo-Microscopie :

Pour les expériences de vidéo-microscopie les cellules sont déposées sur pad d'agarose (M9-MM, agar 1,5% + molécule inhibitrice si nécessaire) puis l'acquisition est lancée pour la durée requise. La vidéo-microscopie est réalisée avec un Axio Observe spinning disk (Zeiss) via une caméra Evolve 512 EMCCD camera (Roper Scientific).

Analyse des images :

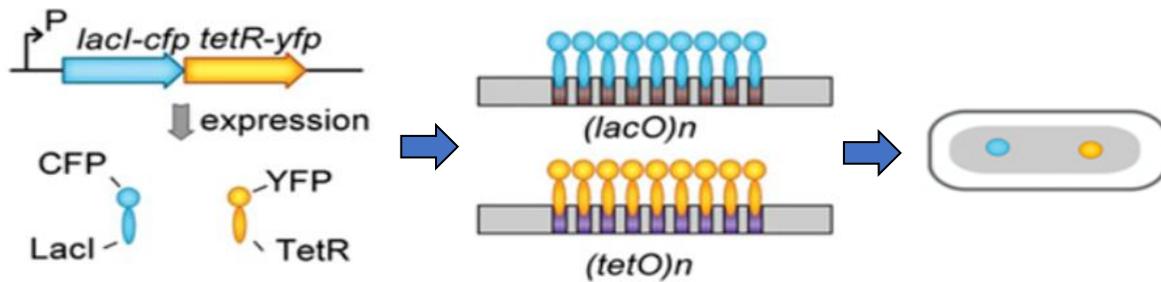
Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012), le comptage des foci de fluorescence avec le plugin cellcounter dans ce même logiciel. Les films des expériences de vidéo-microscopie sont obtenus par compilation des images via un script matlab utilisé par le laboratoire.

Techniques de marquage pour la fluorescence :

Les protéines de *V. cholerae* observées dans cette étude ont été taguées via les techniques classiques de fusion de protéine – protéine fluorescente (chaque tag est précisé dans la liste des souches voir [annexe n°1-tableau 5](#)). Dans la majorité des cas les fusions ont été gardées au locus endogène.

Les loci situés sur le chromosome (origine et terminaison de la réplication) sont observés grâce à la technique appelée Fluorescence Repressor Operator System (FROS) décrite dans (Robinett et al., 1996). Brièvement, cette technique est décrite dans la [figure 63](#) ci-dessous.

Figure 63 : Schéma représentant la technique FROS



Une protéine fluorescente est fusionnée à la séquence codante d'une protéine, ici pour exemple les protéines cfp/yfp respectivement fusionnées aux protéines lacI et tetR. Une fois exprimées dans la cellule ces protéines se fixent sur une séquence spécifique (lacO/tetO). Ces séquences peuvent être insérées à différents endroits sur le génome afin de permettre leur visualisation. Figure modifiée de (Wang et al., 2008)

Criblage par insertion de transposon couplé au séquençage haut débit (Tnseq)

La banque de transposition a été construite dans un contexte génétique sauvage et était disponible au laboratoire. Brièvement un plasmide conjugatif contenant la transposase du transposon *magellan5* marinier, un marqueur de sélection (résistance à la kanamycine) ainsi que la séquence Rd2SP essentielle pour le séquençage illumina est utilisé via conjugaison. L'expérience a été réalisée de manière qu'une seule intégration par bactérie puisse avoir lieu. Afin d'obtenir un bon recouvrement du génome l'expérience a été répétée plusieurs fois de manière indépendante puis la banque ainsi obtenue est divisée en plusieurs aliquots stockés par la suite à -80°C.

Criblage sans antibiotiques :

Des aliquots de la banque ont été décongelés sur glace afin d'inoculer environ 10^9 cellules dans 100mL de milieu M9-MM. Après 1h à 30°C 180rpm 0,2% de L-Ara sont ajoutés à la culture. Des échantillons sont prélevés et préparés pour séquençage avant l'ajout de L-Ara comme point de départ, après 8h dans le L-Ara et enfin après 18h.

Criblage avec antibiotique :

Brièvement, la banque de transposition a été traitée au L-Ara puis la culture a été scindée en deux afin de pouvoir étudier l'impact de deux antibiotiques différents. L'ampicilline

a été ajouté 1h après l'ajout du L-Ara alors que le chloramphénicol a quant à lui été ajouté 4h après l'ajout du L-Ara. 8h après l'ajout du L-Ara les deux cultures sont centrifugées (10 min 5000 rpm) puis resuspendues dans du M9-MM frais sans antibiotiques. Des échantillons sont prélevés pour séquençage avant l'ajout du L-Ara, 8h après son ajout et enfin 10h après la centrifugation.

Le séquençage a été réalisé par la plateforme dédiée de l'I2BC.

Analyse des insertions obtenues après séquençage :

Le logiciel cutadapt a été utilisé pour retirer les adaptateurs du séquençage ainsi que les séquences du transposon. Les séquences génomiques ont ensuite été alignées sur le génome via BWA comme décrit ci-après (Li and Durbin, 2010). Enfin les insertions ont été visualisées sur le logiciel Artemis (Carver et al., 2012).

Expression des gènes durant la transition morphologique induite par le L-Ara (RNAseq)

Une culture de nuit réalisée en milieu M9-MM (30°C 180rpm) de la souche sauvage est utilisée pour inoculer 2 cultures de 20mL distinctes à DO=0.02. Les deux cultures sont incubées à 30°C 180rpm. Après 1h d'incubation 0,2% de L-Ara est ajouté à l'une des cultures, la deuxième sera laissée à pousser jusqu'à DO=0.1 puis un échantillon sera prélevé pour l'extraction d'ARN de la phase exponentielle. Des échantillons de la culture traitée au L-Ara sont prélevés après 2h et 7h dans le L-Ara. Le nombre de cellules prélevées a été établi en suivant les recommandations du kit de purification d'ARN (Qiagen RNeasy mini kit) soit 5×10^8 cellules.

Après extraction des ARN avec le kit les échantillons ont été confiés à la plateforme de séquençage de l'I2BC pour séquençage ainsi que pour l'analyse des gènes différentiellement exprimés. L'analyse a été réalisée via le logiciel DESeq2 (Love et al., 2014).

Cytométrie en flux

Les cellules en phase exp ont été obtenue lorsqu'une culture de nuit en milieu M9-MM fraîchement diluée à DO 0.02 atteint la DO 0.1. Les cellules en phase stationnaires sont obtenues après une culture de nuit en milieu M9-MM. Pour les cellules traitées au L-Ara, une culture de nuit est diluée dans un milieu M9-MM frais à DO 0.02, 1h après dilution le L-Ara est ajouté à hauteur de 0.2%. Des échantillons sont ensuite prélevés pour traitement après 1,5 et 7h.

Les échantillons sont tout d'abord fixés dans l'éthanol 70% puis lavés 2 fois dans du TE filtré (10mM Tris, 1mM EDTA, ph 7,5) (10 000 rpm 5min). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 100 µL de TE + Rnase 10 µg/mL + iodure de propidium 10 µg/mL puis incubée 1h à 37°C avant d'être passées au cytomètre.

Analyse de la Fréquence des Marqueurs (MFA)

Preparation de la banque d'ADN génomique

Les cellules ont été cultivées en milieu M9-MM jusqu'à DO 0.1 (650 nm) pour la phase exponentielle, la phase stationnaire correspond à une culture de nuit. Pour le traitement au L-Ara les cellules ont été exposées début de phase exponentielle à 0.2% de L-Ara pendant 5 ou 10h. L'ADN génomique a été extrait en utilisant le kit fourni par la société sigma (GenElute® bacterial genomic DNA kit) afin d'obtenir une librairie compatible avec le séquençage illumina. La préparation des échantillons ainsi que le séquençage à été réalisé par la plateforme de séquençage de L'I2BC (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article399&lang=en>, CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

Analyse des séquences

A l'aide d'un script MATLAB rédigé par le laboratoire (accessible sur demande auprès de François-Xavier Barre, Francois-xavier.barre@i2bc.paris-saclay.fr).

Annexes

Annexe n°1

Composition des milieux – Souches utilisées – Antibiotiques utilisés

M9-MM = M9 minimal salts: KH₂PO₄ 15 g/L, NaCl 2,5g/L, Na₂HPO₄ 33,9 g/L, NH₄Cl 5 g/L et supplémenté avec 0.2 % de fructose, 1 ug/mL thiamine, 0.02% MgSO₄ ainsi que 0.002% CaCl₂

M9-MM-transformation naturelle = M9 minimal salts: KH₂PO₄ 15 g/L, NaCl 2,5g/L, Na₂HPO₄ 33,9 g/L, NH₄Cl 5 g/L et supplémenté avec 0.2 % de fructose, 1 ug/mL thiamine, 0.02% MgSO₄ ainsi que 0.1% CaCl₂

LB pour culture liquide = Fourni par la compagnie Sigma-Aldrich Yeast Extract 5 g/L, Tryptone 10 g/L, NaCl 5 g/L

LB pour boite = Fourni par la société Sigma-Aldrich 1.25% Bacto-Tryptone, 0.625% Yeast Extract, 1.25% NaCl

Tableau 4 : Liste et concentration des antibiotiques utilisés

Nom de l'antibiotique	Concentration a utiliser pour <i>E. coli</i>	Concentration a utiliser pour <i>V. cholerae</i>
Ampicilline (amp)	100µg/mL	100µg/mL
Chloramphénicol (cm)	25µg/mL	5µg/mL
Gentamycine (gen)	10µg/mL	10µg/mL
Kanamycine (kan)	50µg/mL	50µg/mL
Zeocine (zeo)	25µg/mL	25µg/mL
A22	10µg/mL	10µg/mL
Mecillinam	10µg/mL	10µg/mL
Cefsulodine	1mg/mL	1mg/mL

Tableau 5 : Liste et description des souches utilisées

Nom de la souche	Génotype	Phénotype-description
Souche sauvage	N16961 ChapR ΔlacZ	
EGV 326	N16961 ChapR ΔlacZ ΔmatP::amp Δprophages (Plac::lacI-RFPT-YGFP-parBpMT1) parST1 @ ori1 : 0,05 Mb	Marquage de l'origine et terminus de réplication du chromosome 1 dans un contexte ΔmatP

	(53355 bp) LacOarray -Kan @ ter1 : 1,52 Mb (1525700 bp) with dif1	
EPV 453	N16961 ChapR ΔlacZ PhubP::HubP-msfGFPmut3	Protéine HubP marquée
EGV 034	N16961 ChapR ΔlacZ PftsK::FtsK-YGFP-zeo	Protéine FtsK marquée
EPV 231	N16961 ChapR ΔlacZ (Plac::HUα-RFPT-FRT-zeo-FRT)	Protéine Hu marquée
EPV 390	N16961 ChapR ΔlacZ::arr2 FtsZ84 (mutation Gly106 to Ser: GGT to AGC)	Mutant thermosensible de la protéine FtsZ
AGV 003	N16961 ChapR ΔlacZ PhubP-HubP-msfGFPmut3 (Pzn::ssDsbA-mCherry-FRT-zeo-FRT)	Protéine HubP marquée ainsi que le périplasme
EGV 623	N16961 ChapR ΔlacZ Pbbp1a::PBP1a-sfGFP	Marquage de la protéine PBP1A
EPV 432	N16961 ChapR ΔlacZ::arr2 ftsI23 mutant	Mutant thermosensible de la protéine FtsI
EGV 522	N16961 ChapR ΔlacZ (Plac::YGFP-zeo) strong SD	Marquage du cytoplasme
EGV 626	N16961 ChapR PhubP::hubP-RFPT-spec ΔLacZ (Plac::lacI-YGFP-FRT-zeo-FRT) LacOarray -Kan @ ori1 : 0,05 Mb (53355 bp)	Protéine HubP taguée ainsi que l'origine de réplication du chromosome 1
EGV 600	N16961 ChapR ΔlacZ PcrvA::crvA-sfGFP	Protéine CrvA taguée
EGV 346	N16961 ChapR ΔlacZ (Plac::lacI-RFPT-YGFP-parBpMT1) parST1 @ ori1 : 0,05 Mb (53355 bp) lacOarray -Kan @ ori2 : 1,05 Mb (1048462 bp)	Origine de réplication du chromosome 1 et 2 taguées
EGV 61	N16961 ChapR ΔlacZ ΔhubP::zeo-FRT	Souche délétée hubP
EGV 515	N16961 ChapR ΔlacZ ΔwigKR::aad1	Souche délétée pour le système a deux composants WigKR
EEV 029	N16961 ChapR Cre ΔlacZ ara inducible FTR-zeo-FRT	Souche utilisée pour le TnSeq
EGV 217	MCH1 ChapR ΔLacZ (Pbad::YGFP-slmA-zeo)	Analyse du peptidoglycane

Annexe n°2

Résultats du RNAseq

Les tableaux ci-dessous comprennent les 200 gènes les plus surexprimés et réprimés obtenus dans nos 2 conditions (L-Ara 2h et L-Ara 7h). La fonction putative est indiquée lorsque possible.

L'ensemble des résultats sont disponibles sur demande auprès de François-Xavier Barre (françois-xavier.barre@i2bc.paris-saclay.fr).

Liste des gènes réprimés après 2h de traitement au L-Ara

N° et fonction potentielle du gène (1)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (2)	Log2
VC0608 (iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein)	-7.632	VC2213 (outer membrane protein OmpA)	-3.639
VC0487 (GlmS)	-6.414	VC1175 (hypothetical protein)	-3.608
VC0773 (vibriobactin-specific isochorismate synthase)	-4.528	VC2509 (hypothetical protein)	-3.594
VC0162 (ketol-acid reductoisomerase)	-4.421	VCA0517	-3.584
VC1704 (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase)	-4.404	VC1592 (conserved hypothetical protein)	-3.550
VC0991 (asparagine synthetase B, glutamine-hydrolyzing)	-4.395	VC2210 (vibriobactin utilization protein ViuB)	-3.543
VCA0607	-4.307	VC1173 (anthranilate synthase component II)	-3.513
VC0772 (vibriobactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase)	-4.257	VC2508 (ornithine carbamoyltransferase)	-3.511
VC1174 (anthranilate synthase component I)	-4.162	VCA0224	-3.499
VC2659 (fumarate reductase, 13 kDa hydrophobic protein)	-4.137	VC1593 (GGDEF family protein)	-3.497
VC1705 (hypothetical protein)	-4.077	VCA0625 ()	-3.353
VC0163 (conserved hypothetical protein)	-4.013	VCA0518	-3.334
VCA0657	-3.963	VC0493 (hypothetical protein)	-3.319
VC0176 (transcriptional regulator, putative)	-3.910	VC0175 (deoxycytidylate deaminase-related protein)	-3.259
VC0992 (glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB)	-3.890	VCA0036 (sst, sodium/dicarboxylate symporter)	-3.201
VC2749 (nitrogen regulation protein NR(I))	-3.888	VC1172 (anthranilate phosphoribosyltransferase)	-3.197
VCA0904	-3.862	VCA0610	-3.175
VCA0977	-3.735	VC1191 (hypothetical protein)	-3.169
VC2746 (glutamate--ammonia ligase)	-3.727	VC2361 (autonomous glycyl radical cofactor GrcA)	-3.167
VC0775 (vibriobactin synthesis protein, putative)	-3.68	VCA0976	-3.163
VC0276(phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase)	-3.678	VC2748 (nitrogen regulation protein)	-3.128
VC2712 (xanthine/uracil permease family protein)	-3.6486	VC0052 (phosphoribosylaminoimidazole)	-3.126

N° et fonction potentielle du gène (3)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (4)	Log2
VCA0880	-3.103	VC1193 (hypothetical protein)	-2.679
VC2211 (ferric vibriobactin receptor)	-3.067	VCA0881	-2.656

VC1810 (hypothetical protein)	-3.056	VCA0205	-2.631
VC2646 (phosphoenolpyruvate carboxylase)	-3.056	VCA0108	-2.625
VC0880 (conserved hypothetical protein)	-3.045	VC0275 (phosphoribosylamine--glycine ligase)	-2.612
VC2658 (fumarate reductase)	-3.030	VC1854 (ompT, porin)	-2.593
VC0051 (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit)	-3.012	VC1844 (cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I)	-2.583
VCA0609	-2.979	VC2636 (transcriptional regulator, LysR family)	-2.582
VC1698 (conserved hypothetical protein)	-2.978	VC0715 (NADPH-flavin oxidoreductase)	-2.570
VC2747 (hypothetical protein)	-2.970	VCA0611	-2.569
VC1171 (indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerase)	-2.970	VCA0107	-2.559
VC2212 (hypothetical protein)	-2.954	VCA0984	-2.558
VC1176 (hypothetical protein)	-2.94	VC0091 (O-methyltransferase-related protein)	-2.555
VCA0516 ()	-2.937	VC1229 (conserved hypothetical protein)	-2.545
VCA0983	-2.937	VC1699 (hypothetical protein)	-2.544
VCA0652 (DUF3069)	-2.924	VC0339 (phosphatidylserine decarboxylase)	-2.539
VC2227 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase)	-2.903	VC1845 (RuvB)	-2.539
VC1170 (tryptophan synthase, beta subunit)	-2.895	VCA0248	-2.521
VCA0563	-2.870	VC0977 (conserved hypothetical protein)	-2.504
VC0179 (hypothetical protein)	-2.832	VC0776 (ferric vibriobactin ABC transporter, periplasmic ferric vibriobactin-binding protein)	-2.497
VCA0862	-2.829	VCA0564	-2.492
VC0492 (hypothetical protein)	-2.802	VCA0283	-2.484
VC2694 (superoxide dismutase, Mn)	-2.785	VC1591 (oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family)	-2.473
VC2228 (hypothetical protein)	-2.782	VCA1060	-2.468
VC2037 (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)	-2.775	VC1566 (conserved hypothetical protein)	-2.460
VCA0235	-2.760	VCA0951	-2.457
VC2104 (hypothetical protein)	-2.760	VCA0281	-2.455
VC2562 (2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase)	-2.697	VC2144 (flagellin FlaE)	-2.449
VCA0576 (heme transport protein)	-2.695	VCA0348	-2.431
VC0218 (rpmB, ribosomal protein L28)	-2.682	VC0842 (conserved hypothetical protein)	-2.430

N° et fonction potentielle du gène (5)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (6)	Log2
---	-------------	---	-------------

VC1190 (phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase, putative)	-2.429	VCA0234	-2.190
VC1481 (MatP)	-2.423	VC0870 (IS1004 transposase)	-2.188
VCA0291 (Int14)	-2.422	VC1739 (hypothetical protein)	-2.168
VC1627 (nhaA, Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein)	-2.420	VC2481 (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase)	-2.157
VC1567 (conserved hypothetical protein)	-2.416	VCA0632	-2.151
VCA0236	-2.406	VC0841 (accessory colonization factor AcfC)	-2.149
VCA0882	-2.398	VC0057 (conserved hypothetical protein)	-2.147
VCA0233	-2.378	VC0217 (DNA repair protein RadC)	-2.144
VCA0109	-2.377	VCA0290 (rplT)	-2.137
VC1700 (intracellular separation protein A)	-2.376	VCA0101	-2.124
VC2706 (conserved hypothetical protein)	-2.372	VC2378 (conserved hypothetical protein)	-2.123
VCA0863	-2.371	VC1755 (conserved hypothetical protein)	-2.117
VCA0368	-2.369	VC1688 (hypothetical protein)	-2.112
VC0216 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.359	VC0270 (ROK family protein)	-2.106
VC1944 (PvcB protein)	-2.356	VC2711(RecG)	-2.102
VCA0633	-2.331	VC0180 (conserved hypothetical protein)	-2.100
VC2501 (aminopeptidase A/I)	-2.328	VCA0286	-2.098
VC2357 (hypothetical protein)	-2.327	VCA1027	-2.093
VC0873 (conserved hypothetical protein)	-2.307	VC1569 (hypothetical protein)	-2.092
VCA0569	-2.299	VC0076 (universal stress protein A)	-2.089
VCA0972	-2.282	VCA0577	-2.081
VCA0359	-2.277	VC0997 (glutaminyl-tRNA synthetase)	-2.075
VC0516 (phage integrase)	-2.248	VCA0503	-2.072
VCA0573	-2.236	VC0995 (PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIABC component)	-2.061
VC0534 (RNA polymerase sigma-38 factor)	-2.229	VC2300 (ampG protein, putative)	-2.053
VC1729 (hypothetical protein)	-2.216	VCA0367	-2.044
VC1231 (cytidine deaminase)	-2.205	VCA0113	-2.039
VC1706 (transcriptional activator MetR)	-2.203	VC0996 (hypothetical protein)	-2.039
VC1573 (FumC, fumarate hydratase, class II)	-2.198	VCA0289 (rpml)	-2.039
VC1568 (ABC transporter, ATP-binding protein)	-2.195	VCA0975	-2.034

N° et fonction potentielle du gène (7)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (8)	Log2
VC0863 (conserved hypothetical protein)	-2.033	VCA0969	-1.908
VC2385 (RNA-directed DNA polymerase)	-2.027	VCA0612 (large-conductance mechanosensitive channel MscL)	-1.907
VC0123 (cyaY protein)	-2.018	VC2388	-1.899
VCA0279	-2.011	VC2717 (hypothetical protein)	-1.896
VC2187 (flagellin FlaC)	-2.010	VCA0124	-1.896
VC2642 (argininosuccinate synthase)	-2.000	VC1754 (paraquat-inducible protein B)	-1.891
VC1011 (endonuclease III)	-2.000		
VCA0631	-1.985		
VC0864	-1.981		
VCA0088	-1.974		
VCA0749	-1.964		
VC2498	-1.964		
VC0283	-1.963		
VC2329	-1.962		
VC0869	-1.956		
VC2682	-1.950		
VC1005	-1.947		
VC2386	-1.944		
VCA0010	-1.942		
VCA1047	-1.932		
VCA1035	-1.929		
VC0140 (hypothetical protein)	-1.928		
VC0178	-1.927		
VCA0614	-1.923		
VC1829	-1.922		
VC0976	-1.921		
VCA0537	-1.919		
VC0941	-1.918		
VC1775	-1.914		
VC0250 (iron-containing alcohol dehydrogenase family protein RfbM)	-1.908		

Liste des gènes surexprimés après 2h de traitement au L-Ara

N° et fonction potentielle du gène (1)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (2)	Log2
VCA0139 (DUF3316 hypothetical protein)	5.164	VC1517 (hypothetical protein)	3.421
VC1820 (PTS system, fructose-specific IIA component)	4.642	VC1648 (hypothetical protein)	3.421
VCA0721 (hypothetical protein)	4.508	VC1651 (response regulator VieB)	3.419
VCA0826 (hypothetical protein)	4.317	VC1597 (multidrug transporter, putative)	3.412
VC1020 (hypothetical protein)	4.154	VC0583 (pseudogene)	3.390
VCA0035 (PgpB, phosphatidylglycerophosphatase B)	4.101	VC1821 (PTS system, fructose-specific IIBC component)	3.372
VC1596 (galactose-1-phosphate uridylyltransferase)	3.980	VCA0080 (GGDEF family protein)	3.359
VC1339 (hypothetical protein)	3.974	VC1163 (hypothetical protein)	3.339
VC1616 (glutaredoxin, putative)	3.917	VC0738 (hypothetical protein)	3.250
VC2181 (outer membrane lipoprotein LolB)	3.915	VCA0935 (hypothetical protein)	3.248
VCA0034 (hypothetical protein)	3.907	VC1333 (hypothetical protein)	3.232
VC1819 (aldehyde dehydrogenase)	3.895	VCA0029 (transcriptional regulator, putative)	3.215
VC1399 (chemotaxis protein methyltransferase CheR)	3.850	VCA0865 (hemagglutinin/protease)	3.189
VC1515 (chaperone, formate dehydrogenase-specific, putative)	3.797	VC1383 (hypothetical protein)	3.179
VC1595 (galactokinase)	3.793	VCA0870 (D-alanyl-D-alanine endopeptidase)	3.080
VC0635 (hypothetical protein)	3.7705	VC2400 (UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase)	3.073
VC1327 (galactoside ABC transporter, ATP-binding protein)	3.763	VC2691 (periplasmic protein cpxP)	3.063
VC2214 (glutamyl-tRNA synthetase)	3.707	VC1707 (hypothetical protein)	3.035
VC1340 (prpE protein)	3.628	VC2637 (peroxiredoxin family protein/glutaredoxin)	3.024
VC1514 (hypothetical protein)	3.618	VC2401 (UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase)	3.017
VC1063 (acyl-CoA thioesterase II)	3.551	VC1827 (mannose-6-phosphate isomerase)	2.994
VC1400 (hypothetical protein)	3.539	VC2405 (ddlA, UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase)	2.989
VCA0089 (hypothetical protein)	3.538	VC1334 (hypothetical protein)	2.975
VC1398 (chemotaxis protein CheY)	3.530	VC1401 (protein-glutamate methylesterase CheB)	2.948
VC1328 (galactoside ABC transporter, permease protein)	3.487	VC2424 (type IV pilus assembly protein PilB)	2.930
VC0739 (S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase)	3.479	VC2192 (flagellar protein FlgJ)	2.918
VCA0962 (hypothetical protein)	3.444	VC1332 (hypothetical protein)	2.902
VC1516 (iron-sulfur cluster-binding protein)	3.424	VC2406 (MurE)	2.891

N° et fonction potentielle du gène (3)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (4)	Log2
VC1406 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.865	VC1935 (CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase)	2.580
VCA0868 (hypothetical protein)	2.865	VCA0215 (hypothetical protein)	2.579
VCA0732 (SipA, Stress-inducible protein A)	2.837	VCA0701 (hypothetical protein)	2.550
VC1162 (hypothetical protein)	2.837	VCA1090 (chemotaxis protein CheD, putative)	2.544
VC2105 (hypothetical protein)	2.821	VC1930 (hypothetical protein)	2.528
VC1326 (hypothetical protein)	2.817	VCA1086 (response regulator)	2.527
VC0949 (rodA)	2.812	VC1963 (hypothetical protein)	2.527
VC0634 (transcription elongation factor GreA)	2.799	VCA0722 (hypothetical protein)	2.524
VCA0031 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.796	VC1341 (acetyltransferase, putative)	2.506
VC0157 (IvaP, alkaline serine protease)	2.796	VCA0939 (sensory box/GGDEF family protein)	2.501
VCA0030 (hypothetical protein)	2.790	VCA0733 (hypothetical protein)	2.497
VC1329 (opacity protein-related protein)	2.773	VC1954 (hypothetical protein)	2.473
VC1407 (ATP-dependent RNA helicase RhIE)	2.770	VCA0668 (hypothetical protein)	2.459
VCA1056 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.739	VCA0821 (hypothetical protein)	2.457
VC0737 (acetoin utilization protein AcuB, putative)	2.734	VC1290 (DNA polymerase III, epsilon subunit, putative)	2.457
VC0790 (transcriptional regulator CitB)	2.685	VC1346 (hypothetical protein)	2.449
VCA0645 (hypothetical protein)	2.680	VC0736 (isocitrate lyase)	2.446
VCA0032 (hypothetical protein)	2.673	VC0606 (nitrogen regulatory protein P-II)	2.444
VC1313 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.663	VCA0813 (aminopeptidase)	2.440
VC1030 (hypothetical protein)	2.652	VC1512 (formate dehydrogenase, iron-sulfur subunit)	2.433
VC2667 (DUF3135)	2.651	VC1345 (oxidoreductase, putative)	2.427
VC1518 (DUF3305)	2.631	VC1449 (hypothetical protein)	2.417
VC2548 (TamA)	2.629	VC1952 (chitinase)	2.414
VC1161 (gonadoliberin III-related protein)	2.628	VCA0060 (hypothetical protein)	2.407
VC2705 (sodium/solute symporter, putative)	2.625	VC2648 (hypothetical protein)	2.399
VC2402 (ftsW)	2.612	VC2757 (hypothetical protein)	2.396
VC1338 (aconitate hydratase 1)	2.608	VC0981 (hypothetical protein)	2.388
VCA0272 (hypothetical protein)	2.600	VC0605 (hypothetical protein)	2.378
VC0080 (hypothetical protein)	2.598	VC0911 (trehalose-6-phosphate hydrolase)	2.371
VC2407 (ftsI)	2.597	VC1529 (hypothetical protein)	2.368

N° et fonction potentielle du gène (5)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (6)	Log2
VCA0723 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase)	2.361	VCA0166 (cold shock transcriptional regulator CspA)	2.202
VC1397 (chemotaxis protein CheA)	2.359	VC0604 (aconitate hydratase 2)	2.201
VCA0210 (response regulator, putative)	2.350	VCt054 ("tRNA-Tyr" tRNA-Tyr-5)	2.196
VC2547 (TamB)	2.347	VC2704 (hypothetical protein)	2.196
VCA0008 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.346	VCA0257 (sensor histidine kinase)	2.183
VCA1088 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.318	VC1562 (beta-lactamase-related protein)	2.183
VC1137 (phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase)	2.314	VCA0546 (hypothetical protein)	2.174
VC1826 (PTS system, fructose-specific IIBC component)	2.314	VC2403 (MurD, UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase)	2.169
VC1652 (response regulator VieA)	2.312	VC1647 (hypothetical protein)	2.163
VC0447 (DnaJ-related protein)	2.302	VCA0093 (hypothetical protein)	2.163
VC0428 (hypothetical protein)	2.286	VCA0271 (DNA binding protein)	2.161
VCt051 ("tRNA-Tyr" tRNA-Tyr-2)	2.284	VC1840 (hypothetical protein)	2.156
VC1405 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.276	VC1574 (hypothetical protein)	2.151
VCA0268 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.267	VC1929 (C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein)	2.151
VC1404 (hypothetical protein)	2.257	VC1560 (catalase/peroxidase)	2.145
VCA1024 (hypothetical protein)	2.256	VC2423 (fimbrial protein)	2.142
VCA1091 (chemotaxis protein methyltransferase CheR)	2.252	VC1646 (hypothetical protein)	2.141
VC0602 (penicillin-binding protein 1B)	2.251	VCA1014 (hypothetical protein)	2.137
VCA0138 (hypothetical protein)	2.251	VC1136 (amidotransferase HisH)	2.127
VC1493 (hypothetical protein)	2.251	VC1492 (hypothetical protein)	2.115
VC0134 (hypothetical protein)	2.250	VCA0246 (UlaA or SgaT protein)	2.115
VCA0269 (decarboxylase, group II)	2.246	VC0347 (hfq, host factor-I)	2.114
VCt052 ("tRNA-Tyr" tRNA-Tyr-3)	2.243	VC0912 (hypothetical protein)	2.112
VC2317 (hypothetical protein)	2.242	VCt053 ("tRNA-Tyr" tRNA-Tyr-4)	2.111
VC0429 (hypothetical protein)	2.221	VC1839 (TolQ, Tol-Pal system)	2.108
VC1394 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.220	VCA0923 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.107
VCA1087 (anti-sigma F factor antagonist, putative)	2.217	VC2336 (methionyl-tRNA synthetase-related protein)	2.104
VC0511 (hypothetical protein)	2.213	VC2404 (MraY, phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase)	2.100

N° et fonction potentielle du gène (7)	Log2		
VCA0583 (hypothetical protein)	2.098		
VC1134 (histidinol-phosphate aminotransferase)	2.097		
VC1842 (hypothetical protein)	2.094		
VC2201 (chemotaxis protein methyltransferase CheR)	2.093		
VC2473 (hypothetical protein)	2.093		
VC2178 (hemK protein)	2.087		
VC0697 (hypothetical protein)	2.082		
VC1138 (imidazoleglycerol-phosphate synthase, cyclase subunit)	2.081		
VC1402 (purine-binding chemotaxis protein Chew, putative)	2.071		
VCA0212 (hypothetical protein)	2.052		
VC1931 (hypothetical protein)	2.048		
VC1841 (hypothetical protein)	2.045		
VCA1095 (chemotaxis protein CheA)	2.032		
VC1075 (hypothetical protein)	2.013		
VC2484 (long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative)	2.013		
VC0913 (hypothetical protein)	2.008		
VC0766 (exodeoxyribonuclease VII, large subunit)	2.007		
VC1403 (methyl-accepting chemotaxis protein)	2.005		
VC1336 (carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase)	2.000		
VCA1007 hypo	1.998		
VC1509	1.993		
VCA0541	1.992		
VC2179	1.990		
VC1594	1.986		
VCA1108	1.985		
VC2194	1.982		
VC0032 (ComM-like protein)	1.981		
VC1323	1.979		

Liste des gènes réprimés après 7h de traitement au L-Ara

N° et fonction potentielle du gène (1)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (2)	Log2
VCA0881 (hypothetical protein)	-6.482	VC2357 (hypothetical protein)	-3.104
VCA0880 (hypothetical protein)	-6.462	VC0775 (vibriobactin synthesis protein, putative)	-3.098
VCA0882 (hypothetical protein)	-6.272	VC2162 (permease PerM, putative)	-3.071
VCA0879 (hypothetical protein)	-6.143	VC1698 (conserved hypothetical protein)	-3.064
VC1249 (hypothetical protein)	-4.335	VC0276 (phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	-3.063
VCA0883 (hypothetical protein)	-4.134	VC0785 (hypothetical protein)	-3.037
VCA0884 (hypothetical protein)	-4.043	VC1643 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-3.035
VCA0224 (hypothetical protein)	-3.909	VC2544 (fructose-1,6-bisphosphatase)	-3.032
VCA0738 (hypothetical protein)	-3.894	VCA0516 (PTS system, fructose-specific IIBC component)	-3.031
VC0608 (iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein)	-3.749	VC1644 (hypothetical protein)	-3.021
VC0773 (vibriobactin-specific isochorismate synthase)	-3.605	VC2562 (2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase)	-3.016
VCA0904 (permease)	-3.584	VC2749 (nitrogen regulation protein NR(I))	-3.014
VCA0625 (TonB receptor-related protein)	-3.520	VCA0867 (outer membrane protein OmpW)	-3.001
VC0487 (GlmS)	-3.474	VC1874 (conserved hypothetical protein)	-2.983
VC1044 (hypothetical protein)	-3.382	VC1362 (amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein)	-2.965
VCA0981 (hypothetical protein)	-3.322	VCA0965 (GGDEF family protein)	-2.950
VC2704 (hypothetical protein)	-3.279	VC2378 (conserved hypothetical protein)	-2.915
VCA0691 (acetoacetyl-CoA reductase)	-3.255	VCA0984 (L-lactate dehydrogenase)	-2.903
VCA0690 (acetyl-CoA acetyltransferase)	-3.229	VCA0017 (hcp protein)	-2.876
VC0176 (transcriptional regulator, putative)	-3.217	VC0992 (glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB, putative)	-2.869
VCA0699 (glucose-1-phosphate adenylyltransferase)	-3.207	VC2361 (autonomous glycyl radical cofactor GrcA)	-2.857
VC0493 (hypothetical protein)	-3.181	VC2144 (flagellin FlaE)	-2.851
VC0492 (hypothetical protein)	-3.173	VC2712 (xanthine/uracil permease family protein)	-2.850
VC0772 (vibriobactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase)	-3.160	VCA0689 (conserved hypothetical protein)	-2.835
VCA0518 (PTS system, fructose-specific IIA/FPR component)	-3.157	VCA0980 (hypothetical protein)	-2.811
VCA0517 (1-phosphofructokinase)	-3.127	VCA0036 (sst, sodium/dicarboxylate symporter)	-2.774
VC1225 (hypothetical protein)	-3.125	VC1174 (anthranilate synthase component I)	-2.773
VCA0983 (L-lactate permease, putative)	-3.113	VC2161 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.771

N° et fonction potentielle du gène (3)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (4)	Log2
VC0900 (GGDEF family protein)	-2.770	VC0216 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.560
VC1873 (conserved hypothetical protein)	-2.767	VCA0979 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.559
VCA0895 (chemotactic transducer-related protein)	-2.760	VCA0344 (hypothetical protein)	-2.557
VCA0611 (hypothetical protein)	-2.754	VC1361 (amino acid ABC transporter, permease protein)	-2.544
VCA0772 (tyrosine-specific transport protein)	-2.751	VCA0659 (protein F-related protein)	-2.537
VCA0798 (CbbY family protein)	-2.736	VCA0848 (diguanylate cyclase)	-2.536
VC1699 (hypothetical protein)	-2.734	VC2659 (fumarate reductase, 13 kDa hydrophobic protein)	-2.533
VC2507 (conserved hypothetical protein)	-2.690	VCA0607 (regulator of nucleoside diphosphate kinase)	-2.526
VC0051 (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit)	-2.686	VC2228 (hypothetical protein)	-2.523
VCA0205 (C4-dicarboxylate transporter, anaerobic)	-2.678	VCA0639 (AcrA/AcrE family protein)	-2.514
VC0977 (conserved hypothetical protein)	-2.675	VC0218 (rpmB, ribosomal protein L28)	-2.510
VC0283 (hypothetical protein)	-2.654	VC0052 (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit)	-2.504
VC2014 (conserved hypothetical protein)	-2.647	VCA0652 (DUF3069)	-2.503
VCA0802 (conserved hypothetical protein)	-2.644	VC0991 (asparagine synthetase B, glutamine-hydrolyzing)	-2.503
VC2013 (PTS system, glucose-specific IIBC component)	-2.641	VC1700 (intracellular septation protein A)	-2.500
VC1231 (cytidine deaminase)	-2.637	VC2198 (FlgD, basal-body rod modification protein)	-2.496
VC2543 (hypothetical protein)	-2.629	VCA0612 (large-conductance mechanosensitive channel MscL)	-2.486
VCA0281 (integrase, putative)	-2.628	VC2636 (transcriptional regulator, LysR family)	-2.485
VC1872 (conserved hypothetical protein)	-2.613	VC2227 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase)	-2.482
VCA0862 (long-chain fatty acid transport protein)	-2.612	VC0076 (universal stress protein A)	-2.479
VCA0657 (aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase)	-2.609	VC1704 (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase)	-2.473
VC0339 (phosphatidylserine decarboxylase)	-2.608	VCA0345 (conserved hypothetical protein)	-2.472
VC0175 (deoxycytidylate deaminase-related protein)	-2.606	VC2717 (hypothetical protein)	-2.468
VC2037 (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)	-2.595	VCA0773 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.441
VCA0248 (hypothetical protein)	-2.593	VCA0682 (transcriptional regulator UhpA)	-2.435
VC0784 (sodium/alanine symporter)	-2.581	VCA0101 (hypothetical protein)	-2.429
VC0217 (DNA repair protein RadC)	-2.577	VCA1085 (hypothetical protein)	-2.425
VCA0906 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.572	VC2104 (hypothetical protein)	-2.421

N° et fonction potentielle du gène (5)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (6)	Log2
VC1854 (ompT, porin)	-2.420	VCA0905 (hypothetical protein)	-2.231
VC2501 (aminopeptidase A/I)	-2.396	VCA1039 (amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein)	-2.219
VC2187 (flagellin FlaC)	-2.393	VCA0283 (hypothetical protein)	-2.219
VC0666 (hypothetical protein)	-2.391	VC1755 (conserved hypothetical protein)	-2.219
VC1173 (anthranilate synthase component II)	-2.388	VCA0978 (amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein, putative)	-2.215
VCA0610 (sigma cross-reacting protein 27A)	-2.377	VC0899 (conserved hypothetical protein)	-2.207
VC1282 (PTS system, cellobiose-specific IIC component)	-2.367	VC0534 (RNA polymerase sigma-38 factor)	-2.199
VCA0903 (hypothetical protein)	-2.364	VCA0157 (NADH dehydrogenase, putative)	-2.197
VC0491 (hypothetical protein)	-2.361	VC1229 (conserved hypothetical protein)	-2.191
VC0995 (PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIBC component)	-2.360	VCA0576 (heme transport protein HutA)	-2.188
VCA0573 (DamX-related protein)	-2.357	VCA0544 (hypothetical protein)	-2.184
VC2145 (tyrA protein)	-2.345	VCA0697 (sensory box/GGDEF family protein)	-2.175
VC1191 (hypothetical protein)	-2.333	VC0282 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.160
VCA1019 (hypothetical protein)	-2.330	VC1206 (histidine utilization repressor)	-2.147
VCA0176 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.308	VC1065 (methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase-related protein)	-2.135
VC0185 (transposase, putative)	-2.305	VCA0609 (hypothetical protein)	-2.132
VC1709 (zinc protease, insulinase family)	-2.295	VC2143 (flagellin FlaD)	-2.122
VC2388 (hypothetical protein)	-2.295	VC0553 (conserved hypothetical protein)	-2.095
VCA1060 (3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase)	-2.291	VC2210 (vibriobactin utilization protein ViuB)	-2.095
VC1908 (hypothetical protein)	-2.272	VCA0037 (hypothetical protein)	-2.087
VC2705 (sodium/solute symporter, putative)	-2.262	VC0514 (conserved hypothetical protein)	-2.085
VC2126 (flagellar motor switch protein FliM)	-2.259	VC1937 (conserved hypothetical protein)	-2.080
VCA0439 (microcin immunity protein MccF)	-2.251	VC0270 (ROK family protein)	-2.074
VCA0156 (hypothetical protein)	-2.248	VCA0969 (pirin-related protein)	-2.072
VC2189 (hypothetical protein)	-2.247	VC1043	-2.068
VCA0523 (aminotransferase, class II)	-2.244	VC1172 (anthranilate phosphoribosyltransferase)	-2.068
VC2199 (FlgC, flagellar basal-body rod protein)	-2.244	VC0430 (immunogenic protein)	-2.065
VC2699 (C4-dicarboxylate transporter, anaerobic)	-2.234	VC0976 (conserved hypothetical protein)	-2.057

N° et fonction potentielle du gène (7)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (8)	Log2
VCA0830 (transcriptional regulator, LysR family)	-2.056	VC1934	-1.941
VCA0633 (glpM protein)	-2.054	VC2341	-1.934
VCA0988 (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2.053	VCA0195 (hypothetical protein)	-1.931
VCA0563 (NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit)	-2.052	VC1082	-1.931
VCA0863 (lipase, putative)	-2.052		
VC2175 (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase)	-2.051		
VCA0025 (transporter, NadC family)	-2.047		
VC1855 (ATP-dependent helicase, DinG family)	-2.043		
VC0081 (conserved hypothetical protein)	-2.040		
VCA0698 (hypothetical protein)	-2.040		
VC1265 (cytochrome)	-2.031		
VCA0368 (hypothetical protein)	-2.032		
VCA0975 (ATP-dependent protease LA-related protein)	-2.017		
VC2223 (pseudouridine synthase family 1 protein)	-2.015		
VC0075 (MadN protein)	-2.005		
VC1601 (hypothetical protein)	-1.989		
VCA1027	-1.984		
VC0275	-1.982		
VC2754	-1.982		
VC0516 (phage integrase)	-1.978		
VC0909	-1.977		
VC0941	-1.974		
VCA0720	-1.973		
VC2300	-1.970		
VC1205	-1.969		
VC0162 (ketol-acid reductoisomerase)	-1.963		
VC2502	-1.954		
VC1090	-1.952		

Liste des gènes surexprimés après 7h de traitement au L-Ara

N° et fonction potentielle du gène (1)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (2)	Log2
VCA0139 (DUF3316 hypothetical protein)	6.5289	VC0387 (hypothetical protein)	4.043
VC0157 (IvaP, alkaline serine protease/hydrolase)	6.192	VC0388 (hypothetical protein)	4.032
VC1227 (56 aa, hypothetical protein)	5.448	VC2406 (MurE, UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate—2, 6-diaminopimelate ligase)	4.011
VCA0733 (50aa, hypothetical protein)	5.382	VCA0985 (oxidoreductase/iron-sulfur cluster-binding protein)	4.009
VC2637 (peroxiredoxin family protein/glutaredoxin)	5.371	VC1744 (hypothetical protein)	3.952
VCA0732 (SipA, Stress-inducible protein A)	5.189	VC2434 (hypothetical protein)	3.947
VCA0967 (34aa, hypothetical protein)	5.130	VCA0030 (hypothetical protein)	3.944
VCA0821 (68aa, hypothetical protein)	4.9609	VC2547 (TamB)	3.914
VC0885 (100aa, hypothetical protein)	4.947	VC0949 (rodA, rod shape-determining protein)	3.914
VCA0721 (103aa, hypothetical protein)	4.918	VC2559 (sulfate adenylate transferase, subunit 1)	3.865
VCA0035 (PgpB, phosphatidylglycerophosphatase B)	4.857	VC2166 (Trp repressor-binding protein)	3.835
VCA0968 (31aa, hypothetical protein)	4.842	VC2165 (arsenate reductase)	3.820
VCA0966 (98aa, hypothetical protein)	4.719	VC0386 (phosphoadenosine phosphosulfate reductase)	3.808
VCA0029 (transcriptional regulator, putative)	4.471	VC2484 (long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative)	3.802
VC2393 (55aa, hypothetical protein)	4.405	VCA0170 (hypothetical protein)	3.797
VCA0551 (76aa, hypothetical protein)	4.367	VC0354 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type)	3.749
VC1743 (341aa, hypothetical protein)	4.318	VC2466 (sigma-E factor negative regulatory protein RseA)	3.720
VC1947 (transcriptional regulator, LysR family)	4.299	VC0542 (CinA-related protein)	3.688
VC1930 (31aa, hypothetical protein)	4.273	VCr010 ("16Sd" 16S ribosomal RNA)	3.677
VC2405 (ddIA, UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanyl ligase)	4.268	VC2731 (general secretion pathway protein F)	3.646
VC1697 (276aa, hypothetical protein)	4.267	VC2407 (ftsI)	3.622
VCA0169 (203aa, hypothetical protein)	4.255	VC0420 (AmsA family protein)	3.596
VC2401 (UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase)	4.229	VCA0175 (MoxR-related protein)	3.584
VC0583 (pseudogene)	4.225	VC0675 (thymidylate synthase)	3.579
VC2400 (UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase)	4.133	VCA0820 (groEL)	3.572
VC2558 (adenylylsulfate kinase)	4.130	VC2728 (general secretion pathway protein I)	3.544
VCA0962 (hypothetical protein)	4.126	VC2417 (recJ, single-stranded-DNA-specific exonuclease)	3.541
VC1228 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2)	4.072	VC1237 (nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase)	3.534

N° et fonction potentielle du gène (3)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (4)	Log2
VC0602 (pbp1b)	3.530	VC0541 (sulfate ABC transporter, ATP-binding protein)	3.304
VC1596 (galactose-1-phosphate uridylyltransferase)	3.525	VC1163 (hypothetical protein)	3.289
VC2727 (general secretion pathway protein J)	3.518	VCA0125 (hypothetical protein DUF3012)	3.288
VC1948 (hypothetical protein)	3.514	VC2548 (TamA)	3.283
VCA0819 (chaperonin, 10 Kd subunit)	3.494	VC2525 (hypothetical protein)	3.274
VC2741 (hypothetical protein)	3.487	VC2740 (hypothetical protein)	3.262
VC1639 (sensor histidine kinase, induces SipA)	3.483	VC0603 (surface protein)	3.258
VCA0159 (universal stress protein uspA)	3.477	VC1747 (hypothetical protein)	3.245
VC1949 (pyoverdine biosynthesis protein PvcA)	3.476	VC2253 (hypothetical protein)	3.227
VCA0174 (hypothetical protein)	3.464	VCA0723 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase)	3.214
VCA0845 (hypothetical protein)	3.461	VC2732 (general secretion pathway protein E)	3.208
VC1189 (hypothetical protein)	3.457	VC2528 (ABC transporter, ATP-binding protein)	3.205
VCA0168 (hypothetical protein)	3.456	VC1339 (hypothetical protein)	3.205
VC2402 (ftsW)	3.446	VC2465 (sigma-E factor regulatory protein RseB)	3.189
VC2418 (thiol:disulfide interchange protein DsbC)	3.419	VC1928 (C4-dicarboxylate transport protein DctQ, putative)	3.183
VC1929 (C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein)	3.411	VC2638 (pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase, class I)	3.178
VC2729 (general secretion pathway protein H)	3.406	VC2726 (general secretion pathway protein K)	3.172
VC1931 (hypothetical protein)	3.405	VC1715 (mukE)	3.168
VC0543 (recA)	3.398	VC2167 (hypothetical protein)	3.162
VC0421 (hypothetical protein)	3.383	VC0674 (prolipoprotein diacylglycerol transferase)	3.138
VC1595 (galactokinase)	3.376	VC1714 (mukB)	3.132
VC0948 (rIpA)	3.374	VC0385 (sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component)	3.128
VC1296 (phosphomethylpyrimidine kinase)	3.371	VC2252 (yaeT, surface antigen)	3.127
VC1161 (gonadoliberin III-related protein)	3.353	VC2419 (xerD)	3.116
VCA0272 (hypothetical protein)	3.353	VC2254 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase)	3.098
VC2433 (cyclic AMP phosphodiesterase)	3.352	VC0445 (survival protein SurA)	3.080
VCA0171 (hypothetical protein)	3.326	VC1959 (minC)	3.079
VC1321 (hypothetical protein)	3.322	VC2251 (outer membrane protein OmpH)	3.076

N° et fonction potentielle du gène (5)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (6)	Log2
VCA0166 (cold shock transcriptional regulator CspA)	3.075	VCA0546 (hypothetical protein)	2.841
VC2524 (hypothetical protein)	3.071	VC0511	2.833
VC1421 (hypothetical protein)	3.065	VC1957 (hypothetical protein)	2.833
VC1597 (multidrug transporter, putative)	3.040	VC1340 (prpE protein)	2.830
VC2164 (hypothetical protein)	3.023	VC1449 (hypothetical protein)	2.826
VCA0271 (DNA binding protein)	2.993	VC0762 (hypothetical protein)	2.824
VC0131 (hypothetical protein)	2.992	VC1252 (competence damage protein CinA, putative)	2.820
VC2404 (MraY, phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase)	2.976	VC0981 (VC0981)	2.819
VC2514 (UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase)	2.974	VC2517 (MlaC, phospholipid transport)	2.814
VC2527 (hypothetical protein)	2.967	VC0567	2.808
VC0695 (phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, tyr-sensitive)	2.967	VC0448	2.804
VC0940 (hypothetical protein)	2.964	VCt014 ("tRNA-Thr"tRNA-Thr-2)	2.800
VC2757 (hypothetical protein)	2.958	VC1590 (IlvM, acetolactate synthase)	2.798
VC0763 (GTP-binding protein)	2.950	VC1717 (smtA protein)	2.791
VC2730 (general secretion pathway protein G)	2.949	VCA0180 (peptidase T)	2.789
VC0422 (tldD protein)	2.940	VC1716 (MukF)	2.785
VC2408 (ftsL)	2.939	VCA0138 (hypothetical protein)	2.777
VC2377 (glutamate synthase, small subunit)	2.931	VC1839 (TolQ, Tol-Pal system)	2.777
VC2725 (general secretion pathway protein L)	2.930	VC2452 (RumA, TrmA family RNA methyltransferase)	2.763
VC2432 (hypothetical protein)	2.925	VCA0158 (hypothetical protein)	2.762
VC2403 (MurD, UDP-N-acetylmuramoylalanine—D-glutamate ligase)	2.908	VC2724 (cholera toxin secretion protein EpsM)	2.745
VC0540 (sulfate ABC transporter, permease protein)	2.900	VC2041 (hypothetical protein)	2.737
VC1958 (hypothetical protein)	2.894	VC1515 (chaperone, formate dehydrogenase-specific, putative)	2.733
VCA0140 (chitin binding domain)	2.890	VC2516 (MlaB, phospholipid transport)	2.713
VC0950 (pbp2)	2.879	VCA0257 (sensor histidine kinase)	2.702
VC1162 (hypothetical protein)	2.857	VC2560 (sulfate adenylate transferase, subunit 2)	2.699
VCA0167 (hypothetical protein)	2.851	VC1927 (C4-dicarboxylate transport protein)	2.698
VC1486 (ABC transporter, ATP-binding protein)	2.846	VC2546 (hypothetical protein)	2.693

N° et fonction potentielle du gène (7)	Log2	N° et fonction potentielle du gène (8)	Log2
VC2518 (MlaD, phospholipid transport)	2.688	VCA0258 (wigKR paralogue operon)	2.505
VC0132 (lipoprotein)	2.684	VC2561 (uroporphyrin-III C-methyltransferase)	2.496
VCA0172 (hypothetical protein)	2.683	VC1840 (hypothetical protein)	2.495
VCA0453 (hypothetical protein)	2.682		
VC2366 (s-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase)	2.665		
VC1517 (hypothetical protein)	2.659		
VC2367 (hypothetical protein)	2.653		
VC2515 (BoIA/YrbA family protein)	2.628		
VC1274 (hypothetical protein)	2.627		
VCA0566 (wigR)	2.618		
VC0268 (hypothetical protein)	2.611		
VC0539 (sulfate ABC transporter, permease protein)	2.608		
VC0150 (RNA polymerase sigma-32 factor RpoH)	2.600		
VCt017 ("tRNA-Thr" tRNA-Thr-3)	2.598		
VC2467 (RNA polymerase sigma-E factor)	2.595		
VC2464 (sigma-E factor regulatory protein RseC)	2.593		
VC1514 (hypothetical protein)	2.590		
VC2451 (GTP pyrophosphokinase)	2.575		
VCA1078 (transcriptional regulator, LuxR family)	2.565		
VC1516 (iron-sulfur cluster-binding protein)	2.564		
VC2691 (periplasmic protein cpxP, putative)	2.539		
VC1233 (hypothetical protein)	2.534		
VC1076 (transcriptional regulator, AraC/XylS family)	2.532		
VC0319 (birA bifunctional protein)	2.531		
VCA0722 (hypothetical protein)	2.530		
VC0627 (hesB family protein)	2.514		
VC1117 (heat shock protein HtpX)	2.512		
VC2734 (general secretion pathway protein C)	2.505		

Annexe n°3

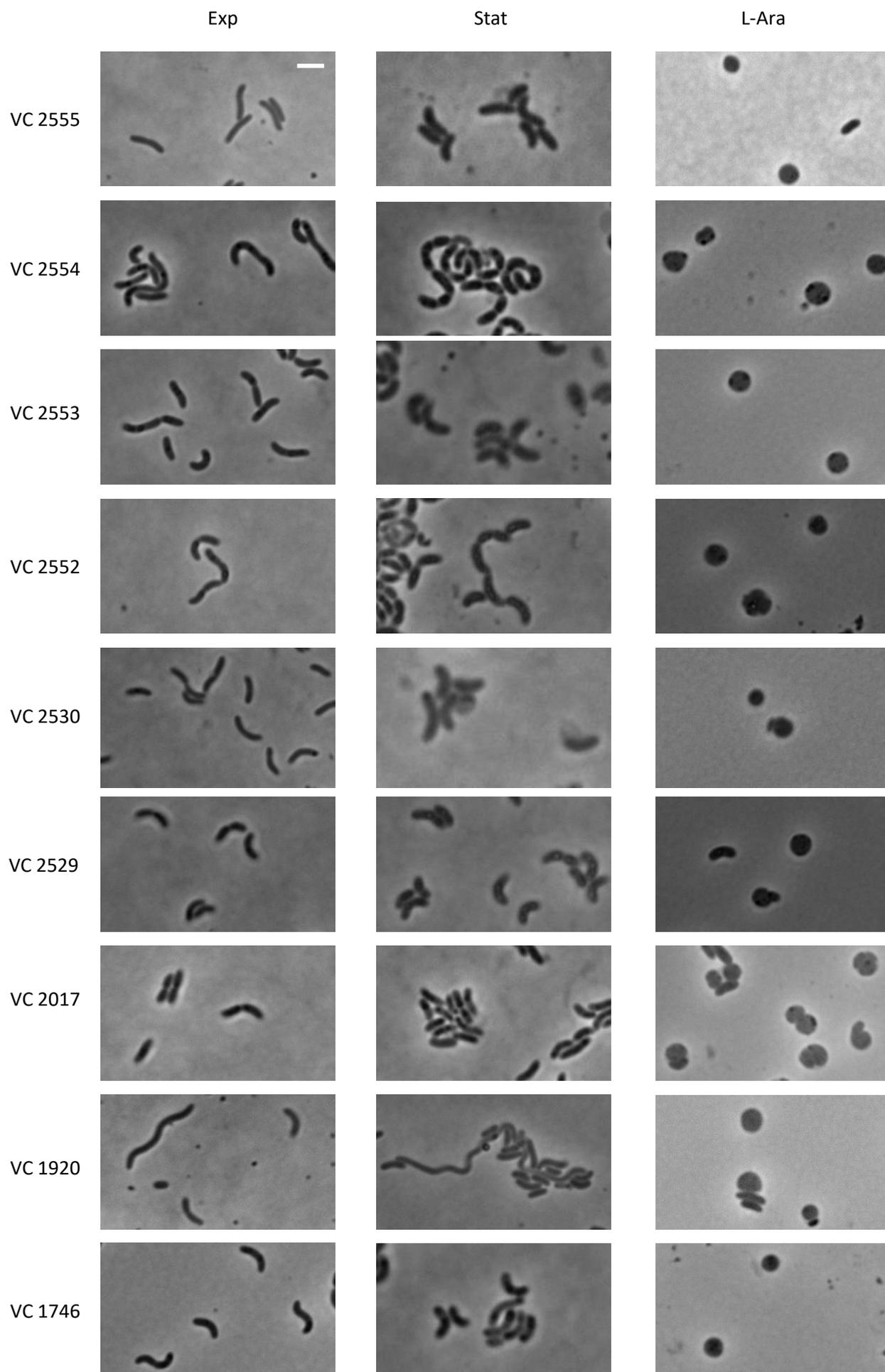
Résultats du Tn-seq + antibiotiques

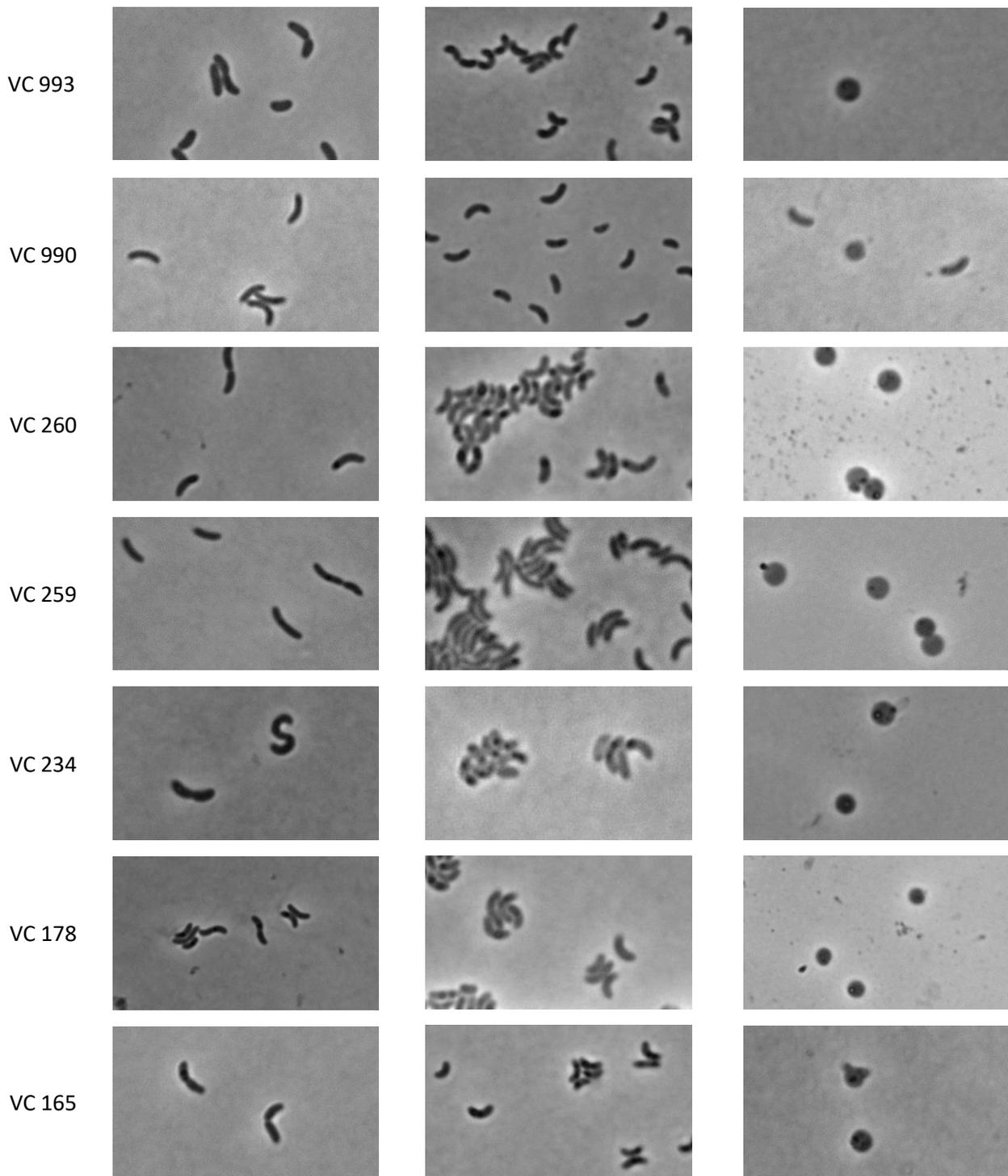
Tableau 6 : Liste des gènes sélectionnés pour leur potentielle incapacité à revenir à l'état prolifératif

N° du gène	Potentielle fonction
VC2555	DUF3299 domain-containing protein
VC2554	ABC transporter permease
VC2553	ABC transporter ATP-binding protein
VC2552	DUF2796 domain-containing protein
VC2530	ribosome hibernation promoting factor
VC2529	RNA polymerase sigma-54 factor
VC2017	MltG
VC1920	ATP dependent protease LA, Lon
VC1746	TetR/AcrR family transcriptional regulator
VC993	N-acetylglucosamine-6P-responsive transcriptional repressor NagC
VC990	transcription/translation regulatory transformer protein RfaH
VC260	polysaccharide biosynthesis protein
VC259	lipopolysaccharide biosynthesis protein RfbV
VC234	glycosyl transferase
VC178	cGAMP-activated phospholipase CapV
VC165	multidrug efflux RND transporter periplasmic adapter subunit VexA

Chacun des gènes décrit dans cette liste a été étudié de façon indépendante, leur morphologie en phase exp, stat, et après traitement au L-Ara a été observé et est présenté en [figure 64](#).

Figure 64 : Caractérisation morphologique et sensibilité au L-Ara des mutants testés





Le retour à l'état prolifératif de ces mutants a été contrôlé par l'observation de la formation de colonies après incubation à 30 °C de cellules déposées sur pad d'agarose + M9-MM. Les mutants étaient tous capables de revenir à l'état prolifératif.

La résistance aux antibiotiques des cellules traitées au L-Ara a été mesurée par étalement sur boîtes LB après différents traitements. Les résultats sont présentés en [tableau 7](#).

Tableau 7 : Dénombrement sur boîtes après traitement au chloramphénicol

Condition expérimentale	-1	-2	-3	-4
cm sur culture non traitée au L-Ara	21	1	0	0
cm sur culture traitée au L-Ara pendant 1h	nc	nc	80	2
cm sur culture traitée au L-Ara pendant 2h	nc	nc	390	77
cm sur culture traitée au L-Ara pendant 3h	nc	nc	nc	154

Une culture de nuit a été réalisée en milieu M9-MM a été diluée dans du milieu frais a DO : 0.02, après une heure à 30°C le L-Ara est ajouté ou non. Le cm est ensuite ajouté à différentes heures. Des échantillons des différentes cultures ont ensuite été étalés sur boîtes LB pour dénombrement. Nc signifie non-comptable soit un tapis bactérien sur la boîte.

On peut voir que le cm est capable de pratiquement tuer l'intégralité de la population non traitée au L-Ara, alors que celle traitée ne serai ce que 1h montre une différence de dénombrement de plus de 2 log. La même tendance est observée pour les cultures traitées plus longtemps au L-Ara. Il est intéressant de noter que L-Ara provoque donc une résistance aux antibiotiques avant même la transition morphologique, ce qui va une nouvelle fois vers l'hypothèse d'un arrêt métabolique soudain.

Annexe n°4

Article publié



L-Arabinose Induces the Formation of Viable Nonproliferating Spheroplasts in *Vibrio cholerae*

 Elena Espinosa,^a Sandra Daniel,^a Sara B. Hernández,^b Anthony Goudin,^a
 Felipe Cava,^b François-Xavier Barre,^a
 Elisa Galli^a

^aInstitute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

^bThe Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå, Sweden

Elena Espinosa and Sandra Daniel contributed equally to this work. Author order was determined in order of decreasing seniority.

ABSTRACT *Vibrio cholerae*, the agent of the deadly human disease cholera, propagates as a curved rod-shaped bacterium in warm waters. It is sensitive to cold but persists in cold waters in the form of viable but nondividing coccoidal-shaped cells. Additionally, *V. cholerae* is able to form nonproliferating spherical cells in response to cell wall damage. It was recently reported that L-arabinose, a component of the hemicellulose and pectin of terrestrial plants, stops the growth of *V. cholerae*. Here, we show that L-arabinose induces the formation of spheroplasts that lose the ability to divide and stop growing in volume over time. However, they remain viable, and upon removal of L-arabinose, they start expanding in volume, form branched structures, and give rise to cells with a normal morphology after a few divisions. We further show that WigKR, a histidine kinase/response regulator pair implicated in the induction of high-level expression of cell wall synthetic genes, prevents the lysis of the spheroplasts during growth restart. Finally, we show that the physiological perturbations result from the import and catabolic processing of L-arabinose by the *V. cholerae* homolog of the *Escherichia coli* galactose transport and catabolic system. Taken together, our results suggest that the formation of nongrowing spherical cells is a common response of vibrios exposed to detrimental conditions. They also permit us to define conditions preventing any physiological perturbation of *V. cholerae* when using L-arabinose to induce gene expression from the tightly regulated promoter of the *Escherichia coli* *araBAD* operon.

IMPORTANCE *Vibrio* spp., among other bacteria, form transient cell wall-deficient forms as a response to different stresses and revert to proliferating rods when permissive conditions have been restored. Such cellular forms have been associated with antimicrobial tolerance, chronic infections, and environmental dispersion. The effect of L-Ara on *V. cholerae* could provide an easily tractable model to study the ability of vibrios to form viable reversible spheroplasts. Indeed, the quick transition to spheroplasts and reversion to proliferating rods by addition or removal of L-Ara are ideal to understand the genetic program governing this physiological state and the spatial rearrangements of the cellular machineries during cell shape transitions.

KEYWORDS *Vibrio cholerae*, spheroplasts, growth arrest, L-arabinose

Cholera is an acute diarrheal disease caused by ingestion of food or water contaminated with *Vibrio cholerae*, a curved rod-shaped bacterium that propagates in warm briny and salty waters. Cold stops *V. cholerae* proliferation. However, the bacterium has the ability to persist for months in cold water under the form of coccoid bodies and return to growth when the sea temperature rises (1–3). Similarly, *V. cholerae* is known to persist under a spherical form in biofilms (4) and to survive exposure to antibiotics inhibiting cell wall synthesis under the form of spheroplasts, i.e., a spherical cell in which the cell wall has been partially or completely removed (5).

Citation Espinosa E, Daniel S, Hernández SB, Goudin A, Cava F, Barre F-X, Galli E. 2021. L-Arabinose induces the formation of viable nonproliferating spheroplasts in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 87:e02305-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02305-20>.

Editor Jeremy D. Semrau, University of Michigan-Ann Arbor

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to François-Xavier Barre, francois-xavier.barre@i2bc.paris-saclay.fr, or Elisa Galli, elisa.galli@i2bc.paris-saclay.fr.

Received 18 September 2020

Accepted 13 December 2020

Accepted manuscript posted online 18 December 2020

Published 12 February 2021

The high propagation rate of *V. cholerae* and its capacity to survive unfavorable growth conditions have led to several pandemics, which have caused and are still causing major socioeconomic perturbations (6). Seven cholera pandemics have been recorded since the beginning of the 18th century. Isolates of the current on-going pandemic, which started over 50 years ago, are rapidly drifting (7–11). It is suspected that the constant appearance of new atypical pathogenic variants of *V. cholerae* will eventually lead to a more virulent strain that will start a new pandemic, which motivated extensive research on the physiology of the bacterium and its evolution toward pathogenicity (7–11). The use of a tightly regulated high-level expression-inducible system based on the regulation of the promoter of the *Escherichia coli* *araBAD* operon by the AraC regulator, known as the P_{BAD} system (12), played an instrumental role in many *V. cholerae* studies (13). The AraBAD enzymes allow *E. coli* to exploit L-arabinose (L-Ara), a component of the hemicellulose and pectin of terrestrial plants, as a carbon and energy source (14). AraC acts both as a positive and a negative regulator, repressing P_{BAD} in the absence of L-Ara and activating its transcription when bound to it (14). *V. cholerae* lacks a bona fide arabinose import and metabolization pathway. Nevertheless, the *E. coli* P_{BAD} system proved to be very effective in *V. cholerae*, which suggested that L-Ara was imported in the cytoplasm of the cells. However, we and others recently reported that L-Ara could interfere with the growth of *V. cholerae* (15, 16), calling for a better understanding of the impact of L-Ara on the physiology of this bacterium.

Here, we show that *V. cholerae* cells stop dividing or elongating and lose their characteristic curved rod cell shape in the presence of >1% (wt/vol) and >0.1% (wt/vol) L-Ara in rich and poor media, respectively. *V. cholerae* cells become spherical and morphologically similar to spheroplasts obtained by exposure to cell wall targeting antibiotics (5) or to coccoid bodies formed in cold temperatures (1, 2, 17). We further found that mutants with impaired physiology are more sensitive to the presence of L-Ara, morphologically transitioning to spheroplasts with as little as 0.01% (wt/vol) L-Ara in poor media. We show that the spheroplasts induced by L-Ara are able to revert to exponentially growing rods in only a few generations when L-Ara is removed, demonstrating that they remain viable. Finally, we demonstrate that L-Ara is imported and processed by the *V. cholerae* homologs of the *E. coli* galactose transport and catabolic enzymes and that one of its by-products perturbs the physiology of the cell by entering the glycolysis pathway. Taken together, these results suggest that formation of spherical cells might be a general physiological response of vibrios when they are faced with detrimental conditions. From a technical point of view, they permit us to define conditions that allow the use of the P_{BAD} expression system in *V. cholerae* while preventing any perturbation of the physiological state of the cells.

RESULTS

L-Arabinose induces the formation of nondividing spherical cells. To study the effect of L-Ara on cell morphology and growth, we added increasing concentrations of L-Ara to wild-type *V. cholerae* strain N16961 in the early exponential phase in different liquid media. Cells grown in M9-minimal media (MM) appeared with a wild-type rod shape in the absence or up to 0.02% (wt/vol) L-Ara, but >90% of the cells became spherical in few hours in the presence of 0.1% (wt/vol) L-Ara (Fig. 1A). In cultures grown in M9-MM supplemented with Casamino Acids (CAAs), spherical cells started to appear at 0.2% (wt/vol) L-Ara, and the majority of the cells became spherical at 0.5% (wt/vol) L-Ara. In LB, the concentration of L-Ara had to be increased up to 1% (wt/vol) to induce morphological changes (Fig. 1A). The spherical shape of L-Ara-treated cells resembles that of nonproliferative cells obtained by treating *V. cholerae* cells with cell wall-targeting antibiotics (5) or by incubating them at 4°C (2, 4), even though at cold temperatures cells appear to be smaller (Fig. 1B).

In parallel to microscopic inspection, we followed the optical density of cell cultures over time. In all tested media, L-Ara had a detrimental effect on cell proliferation at the same concentrations at which it induced the formation of spherical cells (see Fig. S1 in the supplemental material). Cell growth was inhibited shortly after the addition of L-

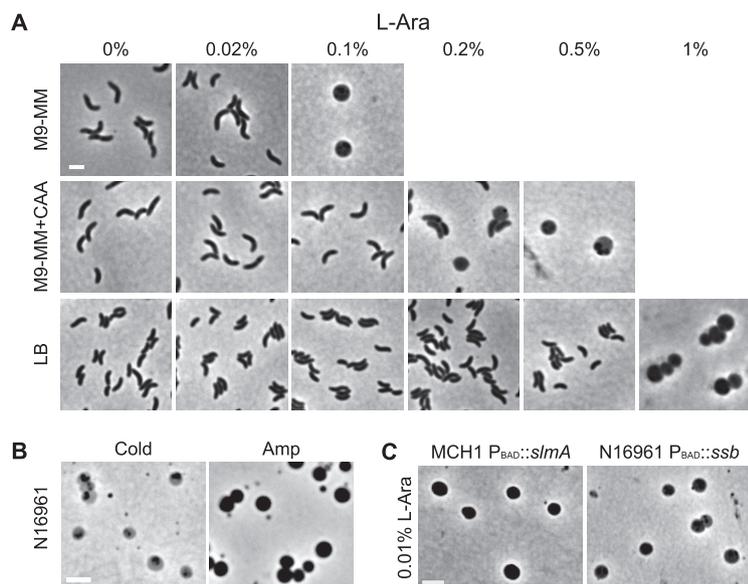


FIG 1 L-Ara induces loss of rod shape. (A) Phase contrast images of *V. cholerae* N16961 cells (strain EPV50) grown at 30°C in the indicated media with increasing concentrations of L-Ara. (B) Phase contrast images of *V. cholerae* N16961 cells (strain EPV50) incubated in M9-MM at 4°C for 6 weeks (left panel) and grown in LB with 100 μM ampicillin (Amp) at 30°C (right panel). (C) Phase contrast images of *V. cholerae* strain EGV299 (MCH1 $P_{BAD}::YGFP-slmA$) and EGV300 (N16961 $P_{BAD}::ssb-YGFP$) cells grown in M9-MM at 30°C in the presence of 0.01% (wt/vol) L-Ara. Scale bars = 2 μm.

Ara, at an optical density at which cells would have otherwise kept growing exponentially, indicating that L-Ara induced a rapid metabolic arrest (Fig. S1).

V. cholerae is known to be sensitive to high concentrations of several carbon sources, including glucose (18). None of the 8 other commonly used carbon sources had similar effects on cell shape and growth, including D-arabinose (Table 1; see Fig. S2 in the supplemental material).

The L-Ara phenotype was not restricted to N16961, a strain isolated in Bangladesh in the 1970s, but it was shared among the most prominent pandemic *V. cholerae* serotype O1 El Tor strains, such as C6706, isolated in a cholera outbreak in Peru in the 1990s, and E7946, isolated in Bahrain in 1978. A *V. cholerae* non-O1 non-139 strain was similarly affected by L-Ara exposure (see Fig. S3 in the supplemental material).

Mutants with impaired physiology are more sensitive to L-Ara. We had previously noticed that it was impossible to use the P_{BAD} system to produce proteins of interest in a few *V. cholerae* mutants because the presence of L-Ara inhibited their growth.

TABLE 1 Carbon sources^a tested for N16961^b rod shape loss and growth inhibition

Carbon source	Attribute in the presence of indicated carbon source	
	Growth	Spherical cells ^c
D-Arabinose	+	–
L-Arabinose	–	+
L-Rhamnose	+	–
D-Glucose	+	–
D-Galactose	+	–
Glycerol	+	–
D-Sucrose	+	–
D-Xylose	+	–
Succinate	+	–

^aThey were added to M9-MM at a concentration of 0.2% (wt/vol), with the exception of glycerol at 10% (vol/vol).

^bStrain EPV50.

^c+, spherical shape; –, rod shape.

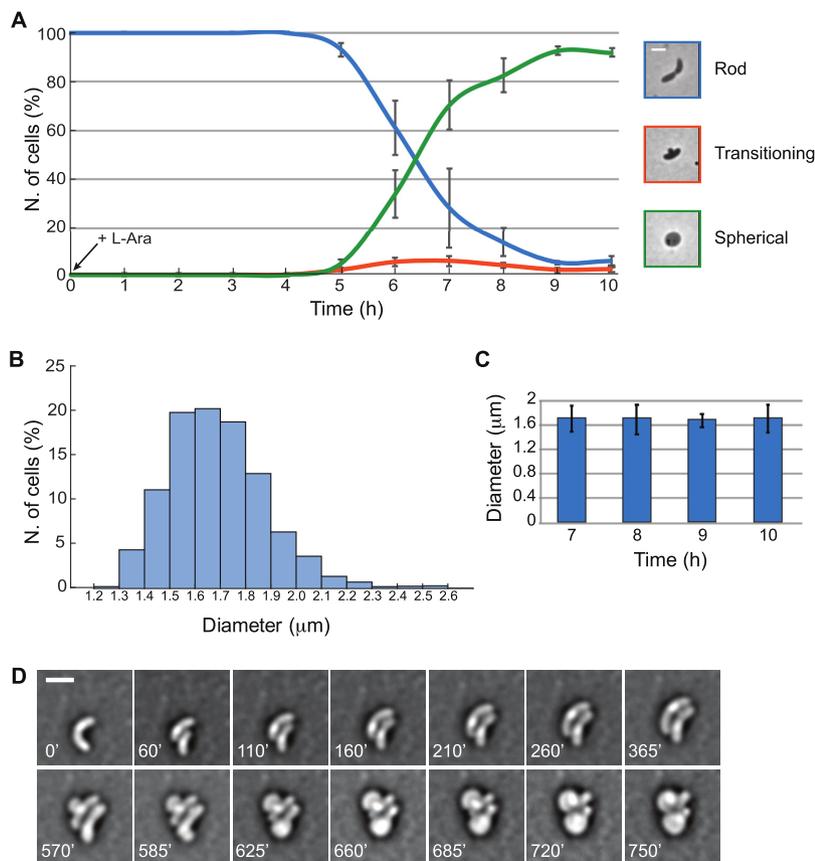


FIG 2 Dynamics of the transition to spherical cells. Cells of *V. cholerae* strain EPV50 were grown in M9-MM at 30°C. L-Ara was added at a concentration of 0.2% (wt/vol) when indicated. (A) Kinetics of *V. cholerae* morphological change from rods to spherical cells. Cell shape was inspected at the microscope every hour after L-Ara addition. A representative image for each cell category (rod, transitioning, and spherical) is represented. The mean of three independent replicates and the standard deviation are represented. (B) Diameter distribution of *V. cholerae* spherical cells treated with L-Ara for 10 hours. (C) Average diameter of *V. cholerae* spherical cells over time. Mean of three independent replicates and the standard deviation are represented. (D) Transition from rods to spherical forms. EPV50 cells were mounted on a M9-MM agarose pad containing 0.2% (wt/vol) L-Ara. Bright-field still images from time-lapse microscopy experiments. Images were taken every 5 minutes for 12.5 hours. Scale bars = 2 μm.

The above results prompted us to revisit the phenotype of two of those mutants whose growth was completely arrested by the addition of as little as 0.01% (wt/vol) L-Ara in M9-MM, namely, a N16961 strain carrying two copies of the *ssb* gene, which encodes an essential single-strand DNA binding protein implicated in the regulation of replication, transcription, and homologous recombination repair (19); and a derivative of the MCH1 monochromosomal strain, in which the SlmA nucleoid occlusion protein was overproduced (20). In both cases, we observed that 0.01% (wt/vol) L-Ara was sufficient to induce the formation of spherical cells in the entire cell population (Fig. 1C).

Dynamics of the transition to spherical cells at the population level. To visually inspect the morphological transition at the population level over time, we collected cell samples every hour for 10 hours after L-Ara addition and examined them under a microscope. Cells were divided in three categories based on their shape, as follows: cells with a rod shape; cells composed of a rod and a small or large irregular bulge protruding from the cell wall, which we refer to as bleb; and cells with a spherical shape (Fig. 2A). In cell cultures grown at 30°C, spherical cells started to appear after 5 hours and comprised 90% of the cell population after 9 hours. The sharp increase in the proportion of spherical cells in the population corresponded to an equally fast decline in rod-shaped cells, which dropped to less than 10% of the cell population at the end of the experiment. Blebbing cells appeared around 4 hours after L-Ara addition. Blebs were

TABLE 2 Results for L-Ara-treated and nontreated *V. cholerae* cells^a

Parameter	Mean \pm SD for <i>V. cholerae</i> cells ^c	
	Nontreated	L-Ara treated
Muropeptide group ^b		
Monomers (%) [*]	48.1 \pm 0.6	40.2 \pm 3.2
Dimers (%)	43.1 \pm 1.9	47.2 \pm 3.1
Trimers (%)	8.8 \pm 2.5	12.6 \pm 4.8
Anhydro-muropeptides (%) [*]	14.8 \pm 2.3	21.9 \pm 3.7
DAP-DAP cross-linked muropeptides (%) [*]	4.9 \pm 0.7	7.5 \pm 0.9
Peptidoglycan feature		
Total cross-linkage (%) [*]	37.7 \pm 1.4	47.2 \pm 5.0
Glycan chain length [*]	11.7 \pm 1.4	7.5 \pm 1.1

^aStrain EGV217.^b*, $P < 0.05$ (t test with a two-tailed distribution).^cValues are the means and standard deviations of three independent experiments.

randomly located on the surface of the cells. In particular, there was no preference for midcell or cell pole locations (see Fig. S4 in the supplemental material). Cells with protruding blebs never represented more than 5% of the entire cell population and almost disappeared at the end of the time course, which suggested that they corresponded to a transient state between the rod and the spherical state. We refer to them as transitioning cells. Taken together, these results suggest that a few hours are required after growth arrest before morphological transition. However, once transition is initiated, the formation of spherical cells is very fast.

In a similar time course experiment performed at 37°C, cells appeared to respond faster to L-Ara. The first blebs appeared 3 hours after L-Ara addition, and after 5 hours, about 40% of the cell population had completed transition to spherical bodies (see Fig. S5 in the supplemental material).

The size of the spherical cells was heterogeneous, and the diameter of the majority of cells was comprised between 1.5 and 1.8 μm (Fig. 2B). The average diameter of the spherical cells did not change between the 7-, 8-, 9-, and 10-hour time points after L-Ara addition, suggesting that once formed, spherical cells neither decreased nor increased in volume (Fig. 2C). Based on the measured dimensions of spherical and rod-shaped cells, we estimate that the cell volume of spherical cells is around 2.5 times bigger than that of exponentially growing rod cells.

Dynamics of the transition to spherical cells at the single-cell level. We performed time-lapse video-microscopy experiments to inspect the transition process from rod to sphere at the single-cell level (Fig. 2D; see Movie S1 in the supplemental material). All the observed cells displayed the same transition pattern. After exposure to L-Ara, a single bleb appeared at the bacterial cell surface. As the bleb increased in size, the original cell was assimilated into the forming sphere until the original rod shape was completely lost. The time when a bleb became visible on the cell surface and its location varied from cell to cell. However, once started, completion of the morphological change was comparable in all cells, with the exception of a few rare cells that lysed during the process (see Movie S2 in the supplemental material). On an agarose M9-MM pad, blebbing cells transitioned to spheres in around 2 to 3 hours at 30°C (Fig. 2D and Movie S1).

L-Ara-induced spherical cells are cell wall deficient. The spherical shape of L-Ara-treated cells is similar to cell wall-deficient forms that have completely or almost entirely lost the peptidoglycan (PG) layer, which suggested a process of cell wall degradation or a PG remodeling mechanism (21). To verify this point, we compared the PG content and composition of *V. cholerae* exponentially growing cells and L-Ara-induced nondividing spherical cells (Table 2). To limit contamination by the PG of cells that had not completely transformed into spheres in the presence of L-Ara, we used MCH1 cells expressing an additional copy of *SlmA* because they fully transitioned to spherical cells in the presence of as little as 0.01% (wt/vol) L-Ara (Fig. 1C).

The PG of exponentially growing cells and cells that had completely transitioned to spheres after the addition of 0.1% (wt/vol) L-Ara was extracted and submitted to ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analysis (see Fig. S6A in the supplemental material). The area of the UPLC profiles showed that the amount of PG per cell in L-Ara-treated bacteria was around 10 times lower than the amount present in rod-shaped cells (Fig. S6B). In addition, we found that glycan chains were twice as short in L-Ara-treated cells than that in untreated cells. The length of glycan chains is calculated based on the number of anhydro-muropeptides (22), which results from the activity of lytic transglycosylases (23, 24). Therefore, the observed reduction in the average glycan chain length suggests an increase of lytic transglycosylase activity in the presence of L-Ara. Finally, we observed that the amount of diaminopimelic acid (DAP)-DAP cross-linked muropeptides significantly increased in L-Ara-treated cells. Taken together, these results indicate that cell wall metabolism is perturbed after L-Ara exposure and that spherical cells are almost completely deprived of the PG layer, which corresponds to the definition of a spheroplast.

L-Ara-induced spheroplasts are viable. To evaluate if L-Ara had a detrimental effect on cell viability, we estimated the number of viable bacteria in a time course experiment. A culture of N16961 cells was split in two after 2 hours of growth, and L-Ara was added to one of the two halves. The number of viable cells in each culture was determined by plating aliquots onto LB plates and counting the number of colonies. Viable cell count kinetics (represented as CFU) showed that L-Ara addition had an immediate inhibitory effect on cell proliferation but did not cause a corresponding decline in cell viability (Fig. 3A). Indeed, 75% of the number of cells before L-Ara addition gave rise to colonies after a 10-hour incubation with L-Ara (Fig. 3B).

Time-lapse video microscopy was performed to determine how nonproliferating spherical cells could return to proliferation and recover a curved rod shape after L-Ara removal. Single-cell analyses showed that reversion to proliferating rods started with the elongation of the spheroplasts, which was followed by the formation of multiple protrusions on their surface (Fig. 3C; see Movie S3 in the supplemental material). The protrusions elongated outward, giving rise to branched cells. Curved rod-shaped cells were recovered after a few division events. The time required to initiate elongation greatly differed from cell to cell; the recovery process started almost immediately after the removal of L-Ara in some cells but took a few hours to initiate in others. However, the time between the initiation of the recovery process and its completion was similar for all the cells. On an agarose M9-MM pad at 30°C, cells transitioned from elongating spheres to symmetrically dividing rods in around 4 to 5 hours. It was not necessary to add osmoprotectants in liquid or on agarose pads to avoid the lysis of spherical cells before and after the initiation of the proliferation recovery process.

Time-lapse video microscopy observations further suggested that the overall 25% loss of CFU after 10 hours of L-Ara treatment (Fig. 3B) was accounted for by the number of cells that lysed during the transition to spheroplasts after the addition of L-Ara (Movie S2) and by those that lysed during the recovery process after L-Ara removal (see Movie S4 in the supplemental material).

wigKR is essential for the recovery of cells after L-Ara treatment. The histidine kinase/response regulator pair WigKR (also known as VxrAB) is thought to induce a higher expression of the full set of cell wall synthetic genes in response to cell wall damage (25). It was previously reported that WigKR was essential for the recovery of cell shape and the return to proliferation of *V. cholerae* cells treated with cell wall targeting antibiotics (25), which prompted us to inspect the effect of L-Ara on Δ wigKR cells. We observed no differences in the growth arrest and formation of spherical cells of the Δ wigKR strain in the presence of L-Ara (see Fig. S7A in the supplemental material). As observed before, spherical cell formation initiated from a single bleb randomly distributed on the surface of the cell. However, Δ wigKR spherical cells immediately started to grow in diameter when L-Ara was removed, expanding continuously in size until they exploded (Fig. 3D; see Movie S5 in the supplemental material). On the contrary, Δ wigKR cells that had not yet transitioned to spheroplasts were able to return to

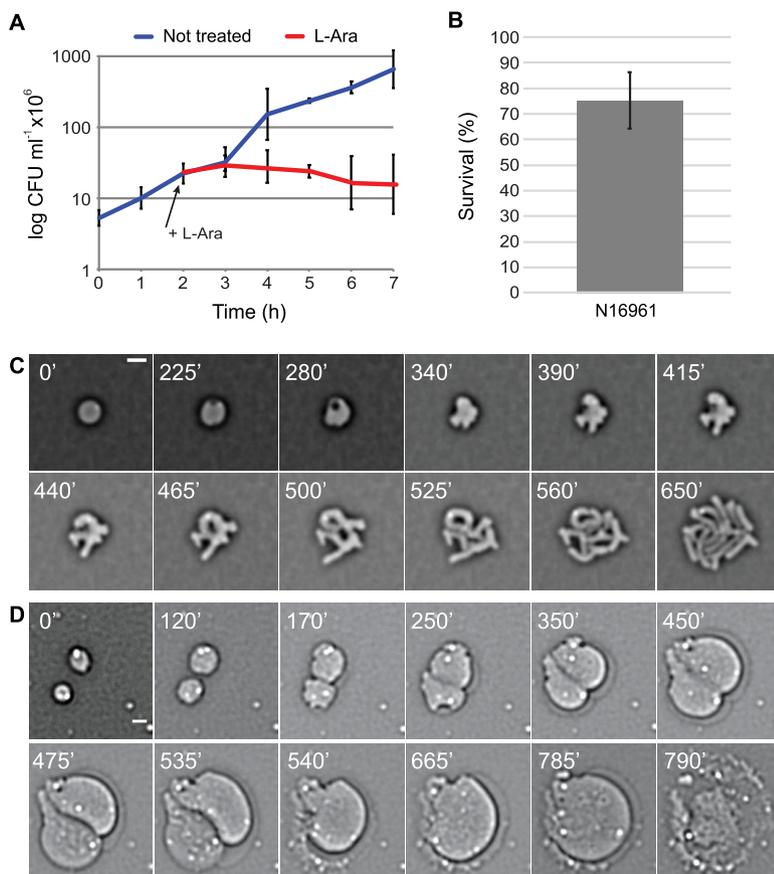


FIG 3 Recovery of growth and rod shape. Cells were grown in M9-MM at 30°C. L-Ara was added at a concentration of 0.2% (wt/vol) when indicated. Viable colony count (CFU) of *V. cholerae* cells (strain EPV50) grown with and without L-Ara over time (A) and after 10 hours (B). The mean of three independent replicates and the standard deviation are represented. In the time-lapse experiments, cells were grown in M9-MM + 0.2% (wt/vol) L-Ara until they became spherical and then were mounted on a M9-MM agarose pad in the absence of L-Ara. Bright-field still images were taken every 5 minutes for 14 hours. (C) N16961 cell (strain EPV50) rod shape recovery. (D) Spherical $\Delta wigKR$ cells (strain EGV515) are not able to recover rod shape. Scale bars = 2 μ m.

a proliferative state without any obvious defect (see Movie 6 in the supplemental material). After a 10-hour incubation with L-Ara, only 10% of the $\Delta wigKR$ cells could still form colonies, which corresponded to the proportion of cells that had not started transitioning to spheres (Fig. S7B). Taken together, these results suggest that the histidine kinase/response regulator pair WigKR plays an essential role in the recovery of the L-Ara-induced spheroplasts.

Identification of genes required for L-Ara sensitivity. In contrast to cell wall-targeting antibiotics, growth arrest and spheroplast formation were unlikely to result from the action of L-Ara on the cell surface or in the periplasm of *V. cholerae*. *V. cholerae* lacks a bona fide arabinose import and metabolism pathway, but the effectiveness of the *E. coli* P_{BAD} promoter regulation by L-Ara suggested that it was at least passively imported in the cytoplasm of this bacterium. To identify putative factors involved in the response of *V. cholerae* cells to L-Ara, we performed two complementary genetic screens.

First, we used a screen based on the enrichment of L-Ara-insensitive mutants in a cell population grown in liquid in M9-MM supplemented with 0.2% (wt/vol) L-Ara. We constructed a library of N16961 mutants with a Mariner transposon (Tn), which randomly inserts at 5'-TA-3' sites (26). We grew the library in M9-MM supplemented with 0.2% (wt/vol) L-Ara for 18 hours. Aliquots were collected before L-Ara addition and after 9 and 18 hours of incubation with L-Ara. Deep sequencing was used to determine all the positions at which the Tn was inserted in the collected libraries. We thus identified nine genetic loci in which Tn insertions were significantly overrepresented after growth

in the presence of L-Ara (Fig. 4A). The transposition frequency and insertion profile differed in the overrepresented genes (Fig. 4B). Tn insertions covered both DNA strands of the entire gene length of *vc1325*, *vc1327*, *vc1328*, *vc1595*, *vc1596*, and *vc0263*, suggesting that the product of these genes was implicated in the physiological effect of L-Ara. Tn insertions covered the entire length of a specific DNA strand of *vc0262*, suggesting that they had a polar effect on the expression of *vc0263*. The overrepresentation of Tn insertions was restricted to only one of the multiple 5'-TA-3' sites present in the entire gene length of *vc0779* and *vc2621*, suggesting that the L-Ara-insensitive phenotype could be provided by an additional suppressor mutation located at another genetic locus. The suppressor capacity of the inactivation of *vc1325*, *vc1327*, *vc1328*, *vc1595*, *vc1596*, and *vc0263* was confirmed by using the corresponding mutants in an ordered mapped Tn library of the wild-type C6706 strain (27). Inactivation of *vc1325*, *vc1327*, *vc1328*, *vc1595*, *vc1596*, and *vc0263* fully restored growth of C6706 in the presence of L-Ara (see Fig. S8 in the supplemental material).

In addition, as L-Ara-insensitive mutants presenting a growth defect cannot be identified with a screen based on growth enrichment, we decided to directly plate a random Tn insertion library on M9-MM plates containing L-Ara. To limit the number of false positives, i.e., the formation of colonies by cells still sensitive to L-Ara, we used the MCH1 strain carrying an additional copy of the *slmA* gene, which fully transitions to spheres in the presence of as little as 0.01% (wt/vol) L-Ara (Fig. 1C). Plating of the Tn insertion library on M9-MM plates containing 0.1% (wt/vol) L-Ara resulted in the formation of 11 colonies, of which 9 were confirmed to be L-Ara insensitive after reisolation on fresh L-Ara plates. Sequencing showed that they corresponded to Tn insertions in six different genes (Table 3; see Fig. S9 in the supplemental material), of which five had already been detected in the growth enrichment screen (*vc1325*, *vc1327*, *vc1328*, *vc1596*, and *vc0263*). In addition, three independent Tn hits were obtained in *vc2689*. The strain corresponding to the inactivation of *vc2689* was missing in the ordered mapped Tn library of the wild-type *V. cholerae* C6706 strain (27). Therefore, we directly engineered the mutation in the N16961 wild-type background to confirm that its inactivation suppressed the effect of L-Ara (Fig. S8). L-Ara reduced the growth rate of *vc2689* mutants (Fig. S8). However, microscopic inspection revealed a majority of rod-shaped cells and a few isolated spherical cells, suggesting that L-Ara sensitivity was reduced even though it was not completely suppressed.

DISCUSSION

It was recently reported that L-Ara inhibited the proliferation of *V. cholerae* (15, 16). Here, we show that it is associated with a change in the morphology of the cells from a curved rod shape to a spherical form (Fig. 1). The spherical cells lose the ability to divide and stop growing in volume over time, suggesting a major metabolic arrest (Fig. 2). We found that L-Ara-induced spherical cells are spheroplasts, i.e., they have almost completely lost their cell wall (Table 2 and Fig. S6). Nevertheless, they remain viable, and once L-Ara is removed from the environment, they resume proliferation and revert to the original cell shape after a few divisions (Fig. 3).

Metabolism arrest is linked to the processing of L-Ara by the galactose pathway. We found that the addition of L-Ara almost immediately stopped *V. cholerae* proliferation under both fast- and slow-growing conditions, in contrast to the addition of 8 other commonly used carbon sources (Fig. 1 and Table 1). *V. cholerae* lacks a bona fide L-Ara import and degradation pathway. However, the effectiveness of the regulation of the *E. coli* P_{BAD} promoter in *V. cholerae* suggested that it was at least passively imported in the cytoplasm of the bacterium, where it interfered with the metabolism. We performed 2 genetic screens to determine which cellular processes might be involved in the action of L-Ara.

We identified 7 genes whose inactivation suppressed the sensitivity to L-Ara (Fig. 4 and Table 3). Of those 7 genes, 6 can be directly (*vc1325*, *vc1327*, *vc1328*, *vc1596*, and *vc1596*) or indirectly (*vc0263*) linked to the galactose Leloir catabolic pathway. *vc1325*, *vc1327*, and *vc1328* code for homologues of the 3 components of the *E. coli* ABC

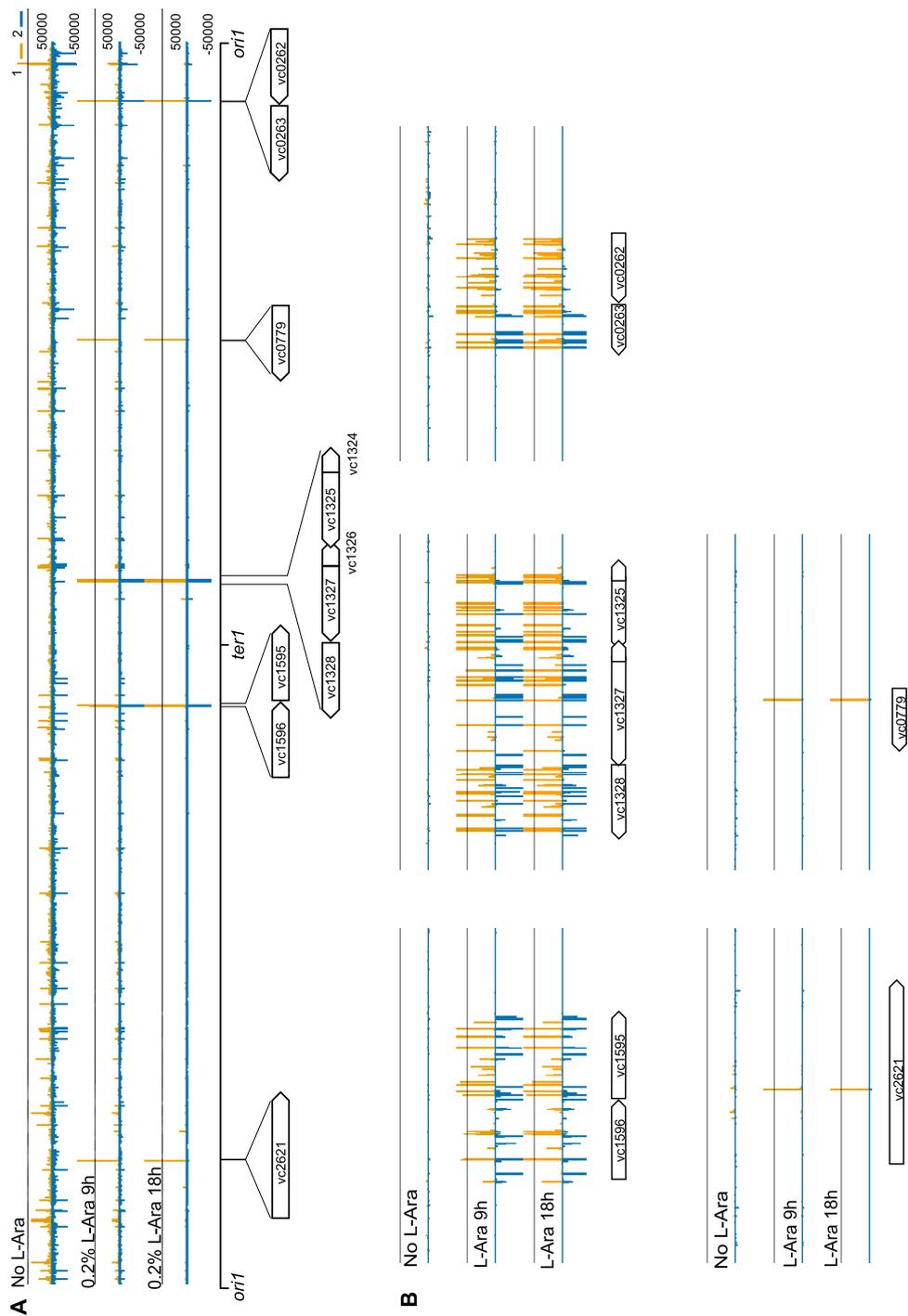


FIG 4 Transposon insertion mutants insensitive to L-Ara-induced cell growth arrest. Tn-seq profile of a transposon insertion library in an EPV50 background before (top panel) and after incubation with 0.2% (wt/vol) L-Ara (middle panel for 9 hours and bottom panel for 18 hours). Transposon insertion profile of chromosome 1 is shown in panel A. Chromosomal positions are indicated below. Regions with overrepresented transposon insertions in the presence of L-Ara are shown at the bottom and zoomed in panel B. Transposon insertions in forward and reverse orientations are indicated by orange and blue vertical lines, respectively.

TABLE 3 Suppressor mutants of L-Ara-induced growth arrest identified in a Tn-based screen^a on plate

Gene	Putative function	No. of hits
vc0263	Galactosyl-transferase	2
vc1325	Galactoside ABC transporter, periplasmic D-galactose/D-glucose binding protein	1
vc1327	Galactoside ABC transporter, ATP-binding protein	1
vc1328	Galactoside ABC transporter, permease protein	1
vc1595	Galactokinase	1
vc2689	6-Phosphofructokinase, isozyme I	3

^aThe screening was performed in *V. cholerae* strain EGV299.

galactose transport system, the periplasmic binding protein MglB, the ATP-binding protein MglA, and the integral membrane permease MglC, respectively (28, 29). *vc1595* codes for a homologue of the *E. coli* galactokinase GalK, the first enzyme in the Leloir pathway of galactose metabolism (30). *vc1596* codes for a homologue of *E. coli* GalT, the galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *vc0263* codes for a putative homologue of the enzyme initiating colanic acid synthesis in *E. coli*, WcaJ (31), which was also described to act as a galactose-1-phosphate transferase *in vitro* (32). These results suggest that L-Ara is imported in the cytoplasm of *V. cholerae* by the galactose transporter and processed by the galactose catabolic enzymes (Fig. 5). In *Sinorhizobium meliloti*, the arabinose transporter AraABC has been described to play a role in galactose uptake (33), suggesting a similarity in the activity of the arabinose and galactose transporter.

Finally, we identified the 7th suppressor gene *vc2689* that codes for a homologue of the *E. coli* 6-phosphofructokinase PfkA, a key enzyme in the glycolysis pathway (34) (Fig. 5).

Taken together, these results suggest that L-Ara arrests the metabolism of *V. cholerae* because it is mistakenly recognized as a substrate of the Leloir metabolic pathway and that through a series of enzymatic reactions it is converted into a phosphorylated sugar by-product that cannot be further metabolized (Fig. 5). Likewise, several studies previously suggested that accumulation of a phosphate ester metabolite could perturb growth. L-Ara inhibits the growth of *E. coli* *araD* mutants because of the accumulation of L-ribulose 5-phosphate (35). Galactose inhibits the growth of *E. coli* *galT* mutants because of the accumulation of galactose 1-phosphate (36, 37). Rhamnose stops the growth of *Salmonella enterica* serotype Typhi strains defective in the rhamnose degradation pathway because of the accumulation of L-rhamnulose 1-phosphate (35, 38).

L-Ara-mediated metabolic perturbation does not prevent the use of P_{BAD}. Importantly, the realization that L-Ara can perturb the metabolism of *V. cholerae* does not jeopardize previous results obtained with the *E. coli* P_{BAD} expression system in this bacterium since L-Ara concentrations lower than those that promote growth arrest and spheroplasts formation are almost always used (Fig. 1). However, our study indicates that special care should be taken in future work when using the *E. coli* P_{BAD} expression system in mutants of *V. cholerae* (Fig. 1). It also shows how metabolic artifacts linked to L-Ara can be avoided by performing experiments in cells that can import L-Ara but are insensitive to it by mutation of *vc1595*, which codes for the first enzyme probably processing L-Ara in the cytoplasm (Fig. 4 and 5).

Spheroplast formation results from an imbalance in cell wall degradation and synthesis. The analysis of the mucopeptide composition of L-Ara-treated *V. cholerae* cells showed that they still maintained a residual amount of PG whose structure was remarkably similar to that described for *E. coli* cefsulodin-induced L-forms (39). The dramatic decrease in the average chain length and corresponding increase in anhydromuropeptides hint to a higher activity of lytic transglycosylases in cleaving the PG and producing shorter chains. The increase in DAP-DAP cross-linkage, an unusual kind of cross-linkage specifically generated by L_D-transpeptidases (40), further suggests that the metabolic arrest induced by L-Ara affects penicillin binding protein (PBP) activity and stimulates transpeptidation mediated by the L_D-transpeptidase LdtA (41). Taken together, these results suggest that L-Ara promotes the formation of spheroplasts

D-galactose ABC transporter: VC1325 (1 hit), VC1327 (1 hit), VC1328 (1 hit)

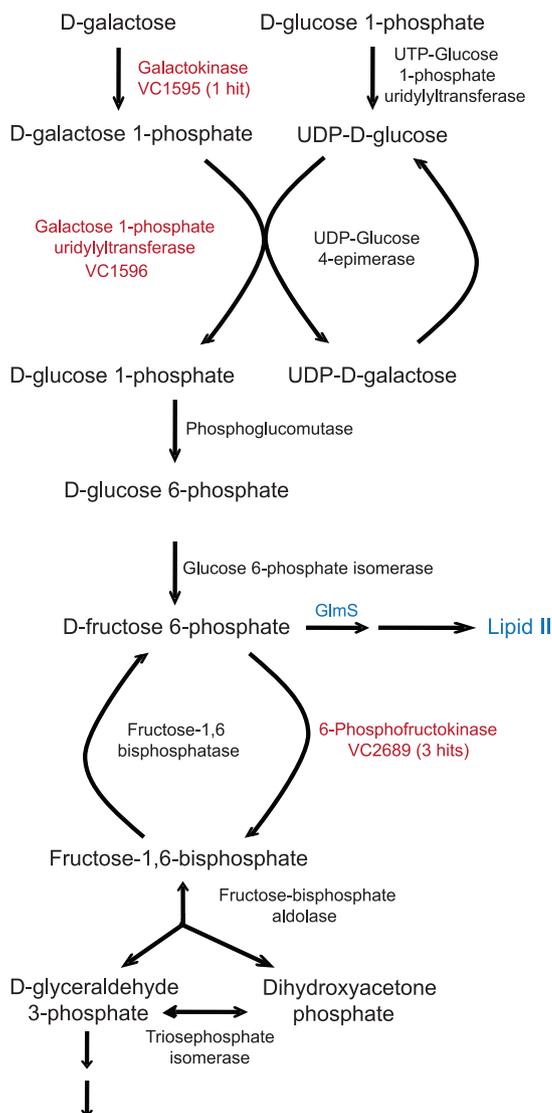


FIG 5 L-Ara-insensitive mutants. Schematic representation of the galactose and glycolytic metabolic pathways. In red are the genes identified in the Tn screens. The number of Tn insertions (hits) obtained in the screen on plate are specified in between parentheses. Depletion or replacement of D-fructose 6-phosphate by a by-product of L-Ara and/or by the poisoning of GlmS could affect lipid II synthesis (in blue) and originate cell wall-deficient cells.

because it induces a metabolic arrest that leads to an imbalance between PG synthesis and degradation. Interestingly, one of the suppressors we identified in the Tn screenings (*vc2689*) codes for a homologue of the glycolytic enzyme PfkA, whose normal metabolic substrate phosphor-sugar fructose 6-phosphate is an essential precursor for UDP-GlcNAc and subsequently lipid II and PG synthesis through the GlmS pathway (42) (Fig. 5). It suggests that the imbalance between PG synthesis and degradation might result from the depletion or replacement of phosphor-sugar fructose 6-phosphate by a by-product of L-Ara and/or by the poisoning of GlmS.

WigKR-dependent upregulation of cell wall synthesis genes is essential for recovery. Like L-Ara, antibiotics inhibiting cell wall synthesis promote the formation of viable spheroplasts that can revert to the original cell shape after a few divisions when the antibiotics are removed (5). However, in contrast to L-Ara-induced spheroplasts, *V. cholerae* cells exposed to antibiotics inhibiting cell wall synthesis grow in volume over

time, suggesting that they are not dormant (Fig. 3) (43, 44). In this regard, antibiotic-treated cells are more similar to bacterial L-forms, which can be obtained in osmotic stabilizing media in several microorganisms, including *E. coli*, by treating cells with lysozyme (45), by adding the β -lactam cefsulodin (a specific inhibitor of the penicillin binding proteins PBP1A and PBP1B) (39, 46) or by inhibiting synthesis of the lipid II cell wall precursor with fosfomycin (47).

The spheroplasts induced by the treatment of $\Delta wigKR$ cells by L-Ara increased in volume when L-Ara was removed from the growth media, demonstrating that cell metabolism was very rapidly restored (Fig. 3D). However, the expansion in volume of the cells led to lysis (Fig. 3D). These results indicate that the recovery of a constitutive level of PG synthesis was not sufficient to expand the residual amount of cell wall left in the spheroplasts to accommodate the increase in cellular material, as observed for the spheroplasts induced by cell wall-targeting antibiotics. These results fit with the idea that the histidine kinase/response regulator pair WigKR-dependent upregulation of the full set of cell wall synthetic genes is necessary for cell shape recovery of *V. cholerae* spheroplasts (25).

L-Ara sensitivity is a common feature of *Vibrio*. L-Ara-induced spheroplast formation and inhibition of cell growth are observed in clinically relevant O1 and O139 strains as well as in environmental non-O1 non-O139 strains (Fig. S3) (15).

Interestingly, it was shown that L-Ara induced biofilm formation and had an inhibitory effect on cell growth in *Vibrio fischeri* (48). No remarks were made about cell morphology. However, mutations in GalK or the galactose transporter were found to suppress the phenomenon, as observed for the action of L-Ara in *V. cholerae* (48). Thus, L-Ara sensitivity could be a phenotype shared by different species of vibrios.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and strains. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 4. Strains were rendered competent by the insertion of *hapR* by specific transposition and constructed by natural transformation. Engineered strains were confirmed by PCR. Primers are listed in Table S1 in the supplemental material.

Growth curves. If not otherwise indicated, cells were grown at 30°C in M9 minimal medium supplemented with 0.2% (wt/vol) fructose and 1 μ g/ml thiamine (M9-MM), M9-MM + 0.1% Casamino Acids (M9-MM + CAA), and Luria-Bertani broth (LB) in a 96-well microtiter plate, and the optical density at 600 nm (OD_{600}) was followed over time in a Tecan plate reader. The growth curves plotted are the average of three replicates; the standard deviation is represented for each time point. For CFU and rod-to-sphere kinetics, cells were grown in flasks in M9-MM at 30°C and 37°C; 0.2% (wt/vol) L-Ara was added when indicated. Samples were taken every hour for plating and/or microscopic inspection. Three replicates were performed for each experiment. L-Ara was added to cell cultures with an OD_{600} between 0.02 and 0.05.

L-Ara survival assay. Overnight wild-type (EPV50) and $\Delta wigKR$ (EGV515) cultures were diluted 200 times in M9-MM, followed by 2 hours of growth at 30°C before 0.2% (wt/vol) L-Ara was added. Cells were checked for transition to spherical morphology under the microscope. Serial dilutions of T_0 (before L-Ara addition) and T_{10} (after L-Ara treatment) samples were plated onto LB plates; afterward, the number of colonies was determined and used to calculate the CFU at T_0 and T_{10} . The ratio CFU T_{10} /CFU T_0 was used to calculate the percentage of cells able to survive L-Ara treatment and revert to proliferation.

Microscopy. Cells were spread onto a 1% (wt/vol) agar pad (ultrapure agarose, Invitrogen) for analysis. For snapshots, images were acquired using a DM6000-B (Leica) microscope. For time-lapse analyses, the agarose pad was made using M9-MM with 0.2% (wt/vol) L-Ara if needed, and images were acquired using an Evolve 512 EMCCD camera (Roper Scientific) attached to an Axio Observe spinning disk (Zeiss). To observe rod-to-sphere transition on agarose pads, 0.2% (wt/vol) L-Ara was added in liquid M9-MM cultures 2 hours before transferring cells on agarose pads containing L-Ara and starting microscopic imaging.

Transposon insertion deep sequencing-based screen. The Tn library was constructed in an EPV50 background, and libraries for Illumina sequencing were prepared as described by Espinosa et al. (49). Aliquots of the transposon library were thawed on ice, and $\sim 10^9$ cells were diluted into 100 ml of M9-MM and grown for 1 hour at 30°C before adding 0.2% (wt/vol) L-Ara. The culture was incubated at 30°C in a shaking incubator for an additional 18 hours. Samples for library construction and deep sequencing were collected before L-Ara addition and after 9 and 18 hours of incubation with L-Ara.

Transposon insertion sequencing analysis. Cutadapt was used to remove adapters and transposon sequences. Genome sequences were mapped using BWA as described in references 50 and 51. Transposon insertions were visualized using the Artemis browser (52).

Transposon mutagenesis screen on plate. The transposon mutagenesis was performed by conjugating the *E. coli* strain SM10 λ pir/pSC189, which carries a mini-Himar transposon associated with kanamycin resistance, with the *V. cholerae* strain EGV299. In detail, 1 ml of culture of EGV299 grown to an

TABLE 4 List of bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype or feature	Reference
Strains		
<i>V. cholerae</i> 104154	Wild-type strain, non-O1 non-O139 serogroup	Laboratory collection
<i>V. cholerae</i> C6706	Wild-type strain, O1 serogroup	Laboratory collection
<i>V. cholerae</i> E7946	Wild-type strain, O1 serogroup	Laboratory collection
<i>V. cholerae</i> EGV217	MCH1 <i>hapR</i> ⁺ Δ <i>lacZ</i> ::(P _{BAD} :: <i>YGFP-slmA-Sh ble</i>) <i>zeo</i> ^R , <i>gm</i> ^R	This study
<i>V. cholerae</i> EGV299	MCH1 <i>hapR</i> ⁺ Δ <i>lacZ</i> ::(P _{BAD} :: <i>YGFP-slmA-lacZ-Sh ble</i>) <i>zeo</i> ^R , <i>gm</i> ^R	This study
<i>V. cholerae</i> EGV300	N16961 <i>hapR</i> ⁺ Δ <i>lacZ</i> ::(P _{BAD} :: <i>ssb-YGFP-lacZ-Sh ble</i>) <i>zeo</i> ^R , <i>gm</i> ^R	This study
<i>V. cholerae</i> EGV515	N16961 <i>hapR</i> ⁺ Δ <i>lacZ wigKR</i> :: <i>aadA spec</i> ^R , <i>gm</i> ^R	This study
<i>V. cholerae</i> EPV50	N16961 <i>hapR</i> ⁺ Δ <i>lacZ gm</i> ^R	55
<i>V. cholerae</i> VC0263	C6706 with Tn-inactivated <i>vc0263</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC1325	C6706 with Tn-inactivated <i>vc1325</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC1327	C6706 with Tn-inactivated <i>vc1327</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC1328	C6706 with Tn-inactivated <i>vc1328</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC1595	C6706 with Tn-inactivated <i>vc1595</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC1596	C6706 with Tn-inactivated <i>vc1596</i> , <i>kan</i> ^R	27
<i>V. cholerae</i> VC2689	N16961 with Tn-inactivated <i>vc2689</i> , <i>kan</i> ^R	This study
<i>E. coli</i> SM10 λ <i>pir</i>	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, λ <i>pir</i> , <i>kan</i> ^R	56
Plasmids		
pEG258	P _{BAD} :: <i>YGFP-slmA-Sh ble</i> flanked by the upstream and downstream regions of <i>lacZ</i> ; ori pUC; <i>zeo</i> ^R <i>amp</i> ^R	This study
pEG348	P _{BAD} :: <i>YGFP-slmA-lacZ-Sh ble</i> flanked by the upstream and downstream regions of <i>lacZ</i> ; ori pUC; <i>zeo</i> ^R <i>amp</i> ^R	This study
pEG352	P _{BAD} :: <i>ssb-YGFP-lacZ-Sh ble</i> flanked by the upstream and downstream regions of <i>lacZ</i> ; ori pUC; <i>zeo</i> ^R <i>amp</i> ^R	This study
pEG431	<i>aadA</i> flanked by the upstream and downstream regions of <i>wigKR</i> ; ori p15a; <i>cm</i> ^R <i>spec</i> ^R	This study

OD₆₀₀ of 0.3 was mixed with 100 μ l of donor strain SM10 λ *pir* carrying the transposon donor plasmid pSC189 grown to an OD₆₀₀ of 0.5. Each mixture was pelleted, resuspended, and deposited onto a 0.45- μ m filter (Millipore) on a LB agar plate supplemented with DAP. Conjugation was carried out for 6 hours at 37°C, and then cells were pooled and plated directly onto M9-MM plates containing kanamycin and 0.1% (wt/vol) L-Ara and incubated overnight at 30°C. Eight conjugations were performed per each library. We constructed two Tn libraries of approximately 300,000 clones each. Mutants able to grow on a plate were isolated and inspected under the microscope for growth and morphology in the presence of L-Ara. An arbitrary PCR followed by DNA sequencing were performed to determine the Tn insertion site.

Peptidoglycan analysis. EGV217 overnight cultures were diluted 200 times in M9-MM and grown at 30°C. A total of 100 ml was centrifuged after 7 hours of growth and 1 liter of culture, to which 0.2% (wt/vol) L-Ara was added after 2 hours, and was harvested after a further 7 hours of incubation. Cells were checked for complete transition to spherical morphology under the microscope before harvesting. Previously described methods were followed for muropeptide isolation and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analysis (53, 54). After cell pellets with sodium dodecyl sulfate (SDS) were boiled for 2 hours, the lysates were left stirring overnight at room temperature. Cell wall material was pelleted, washed with Milli-Q (MQ) water to remove the SDS, and digested with pronase E to remove Braun's lipoprotein. Purified peptidoglycan was resuspended in MQ water and treated overnight with muramidase at 37°C. Soluble muropeptides were reduced with sodium borohydride, and the pH was then adjusted to 3.5 with phosphoric acid. Samples were injected in a UPLC system to obtain the muropeptide profiles. UPLC separation was performed on a Waters UPLC system equipped with an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (130 Å; 1.7 μ m; 2.1 mm by 150 mm; Waters) and a dual-wavelength absorbance detector using a linear gradient from buffer A (50 mM phosphate buffer [pH 4.35]) to buffer B (50 mM phosphate buffer [pH 4.95] and 15% [vol/vol] methanol) in a 28-min run with a 0.25 ml/min flow. Elution of muropeptides was detected at 204 nm. Identity of the peaks was assigned by comparison of the retention times and profiles to other chromatograms in which mass spectrometry data have been collected. The relative amounts of the muropeptides and the percentage of cross-linkage were calculated as described by Glauner et al. (22). To estimate the amount of peptidoglycan per cell, the total area of the chromatogram was normalized to the OD of the culture. All values are the means of three independent experiments.

Data availability. Transposon insertion sequencing (Tn-seq) data are available in the ArrayExpress database (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MTAB-9747.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.7 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, AVI file, 0.2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 3, AVI file, 0.2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 4, AVI file, 0.4 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 5, AVI file, 0.2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 6, AVI file, 0.5 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 7, AVI file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial support from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR19-CE35-0013-01 SurVi). Research in the Cava laboratory is supported by the Laboratory of Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), the Swedish Research Council (VR), the Knut and Alice Wallenberg Foundation (KAW), and the Kempe Foundation. S.B.H. was supported by a Martin Escudero postdoctoral fellowship.

We thank C. Possoz for helpful discussions and Y. Yamaichi for providing the ordered *V. cholerae* mapped Tn library.

REFERENCES

- Thompson FL, Austin B, Swings J. 2006. The biology of vibrios. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- Chaiyanan S, Chaiyanan S, Grim C, Maugel T, Huq A, Colwell RR. 2007. Ultrastructure of cocoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol 9:393–402. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01150.x>.
- Huq A, Colwell RR, Rahman R, Ali A, Chowdhury MA, Parveen S, Sack DA, Russek-Cohen E. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. Appl Environ Microbiol 56:2370–2373. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.8.2370-2373.1990>.
- Alam M, Sultana M, Nair GB, Siddique AK, Hasan NA, Sack RB, Sack DA, Ahmed KU, Sadique A, Watanabe H, Grim CJ, Huq A, Colwell RR. 2007. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. Proc Natl Acad Sci U S A 104:17801–17806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705599104>.
- Dörr T, Davis BM, Waldor MK. 2015. Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. PLoS Pathog 11:e1004850. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004850>.
- Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, Qadri F, Holmgren J. 2017. Cholera. Lancet 390:1539–1549. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30559-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30559-7).
- Chun J, Grim CJ, Hasan NA, Lee JH, Choi SY, Haley BJ, Taviani E, Jeon Y-S, Kim DW, Lee J-H, Brettin TS, Bruce DC, Challacombe JF, Detter JC, Han CS, Munk AC, Chertkov O, Meincke L, Saunders E, Walters RA, Huq A, Nair GB, Colwell RR. 2009. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A 106:15442–15447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907787106>.
- Weill F-X, Domman D, Njamkepo E, Tarr C, Raugier J, Fawal N, Keddy KH, Salje H, Moore S, Mukhopadhyay AK, Bercion R, Luquero FJ, Ngandjio A, Dosso M, Monakhova E, Garin B, Bouchier C, Pazzani C, Mutreja A, Grunow R, Sidikou F, Bonte L, Breurec S, Damian M, Njanpop-Lafourcade B-M, Sapriel G, Page A-L, Hamze M, Henkens M, Chowdhury G, Mengel M, Koeck J-L, Fournier J-M, Dougan G, Grimont PAD, Parkhill J, Holt KE, Piarroux R, Ramamurthy T, Quilici M-L, Thomson NR. 2017. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. Science 358:785–789. <https://doi.org/10.1126/science.aad5901>.
- Domman D, Quilici M-L, Dorman MJ, Njamkepo E, Mutreja A, Mather AE, Delgado G, Morales-Espinosa R, Grimont PAD, Lizárraga-Partida ML, Bouchier C, Aanensen DM, Kuri-Morales P, Tarr CL, Dougan G, Parkhill J, Campos J, Cravioto A, Weill F-X, Thomson NR. 2017. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. Science 358:789–793. <https://doi.org/10.1126/science.aao2136>.
- Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood JLN, Clemens JD, Czerkinsky C, Nair GB, Holmgren J, Parkhill J, Dougan G. 2011. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. Nature 477:462–465. <https://doi.org/10.1038/nature10392>.
- Kim EJ, Lee D, Moon SH, Lee CH, Kim SJ, Lee JH, Kim JO, Song M, Das B, Clemens JD, Pape JW, Nair GB, Kim DW. 2014. Molecular insights into the evolutionary pathway of *Vibrio cholerae* O1 atypical El Tor variants. PLoS Pathog 10:e1004384. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004384>.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177:4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>.
- Dalia TN, Chlebek JL, Dalia AB. 2020. A modular chromosomally integrated toolkit for ectopic gene expression in *Vibrio cholerae*. Sci Rep 10:15398. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72387-8>.
- Lee N, Francklyn C, Hamilton EP. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 84:8814–8818. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8814>.
- Golder T, Mukhopadhyay AK, Koley H, Nandy RK. 2020. Nonmetabolizable arabinose inhibits *Vibrio cholerae* growth in M9 medium with gluconate as sole carbon source. Jpn J Infect Dis 73:343–348. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.304>.
- Galli E, Espinosa E, Barre FX. August 2018. L-Arabinose and uses thereof against *Vibrio* genus bacteria. European patent EP17305197.
- Oliver JD. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 34:415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>.
- Shiba T, Hill RT, Straube WL, Colwell RR. 1995. Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. Appl Environ Microbiol 61:2583–2588. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.7.2583-2588.1995>.
- Bianco PR, Lyubchenko YL. 2017. SSB and the RecG DNA helicase: an intimate association to rescue a stalled replication fork. Protein Sci 26:638–649. <https://doi.org/10.1002/pro.3114>.
- Galli E, Poidevin M, Le Bars R, Desfontaines J-M, Muresan L, Paly E, Yamaichi Y, Barre F-X. 2016. Cell division licensing in the multi-chromosomal *Vibrio cholerae* bacterium. Nat Microbiol 1:16094. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.94>.
- Allan EJ, Hoischen C, Gumpert J. 2009. Bacterial L-forms. Adv Appl Microbiol 68:1–39. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01201-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01201-5).
- Glauner B, Höltje JV, Schwarz U. 1988. The composition of the murein of *Escherichia coli*. J Biol Chem 263:10088–10095.
- van Heijenoort J. 2011. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 75:636–663. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00022-11>.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. FEMS Microbiol Rev 32:259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>.
- Dörr T, Alvarez L, Delgado F, Davis BM, Cava F, Waldor MK. 2016. A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A 113:404–409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520333113>.
- van Opijnen T, Bodi KL, Camilli A. 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. Nat Methods 6:767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1377>.
- Cameron DE, Urbach JM, Mekalanos JJ. 2008. A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*.

- Proc Natl Acad Sci U S A 105:8736–8741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803281105>.
28. Harayama S, Bollinger J, Iino T, Hazelbauer GL. 1983. Characterization of the *mgl* operon of *Escherichia coli* by transposon mutagenesis and molecular cloning. *J Bacteriol* 153:408–415. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.408-415.1983>.
 29. Hogg RW, Voelker C, Von Carlowitz I. 1991. Nucleotide sequence and analysis of the *mgl* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 229:453–459. <https://doi.org/10.1007/BF00267469>.
 30. Kalckar HM, Kurahashi K, Jordan E. 1959. Hereditary defects in galactose metabolism in *Escherichia coli* mutants, I. Determination of enzyme activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:1776–1786. <https://doi.org/10.1073/pnas.45.12.1776>.
 31. Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* 178:4885–4893. <https://doi.org/10.1128/jb.178.16.4885-4893.1996>.
 32. Patel KB, Toh E, Fernandez XB, Hanuszkiewicz A, Hardy GG, Brun YV, Bernards MA, Valvano MA. 2012. Functional characterization of UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferases of *Escherichia coli* and *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 194:2646–2657. <https://doi.org/10.1128/JB.06052-11>.
 33. Geddes BA, Oresnik IJ. 2012. Inability to catabolize galactose leads to increased ability to compete for nodule occupancy in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 194:5044–5053. <https://doi.org/10.1128/JB.00982-12>.
 34. Babul J. 1978. Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. Purification and characterization of the nonallosteric isozyme. *J Biol Chem* 253:4350–4355.
 35. Englesberg E, Anderson RL, Weinberg R, Lee N, Hoffee P, Huttenhauer G, Boyer H. 1962. L-Arabinose-sensitive, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 84:137–146. <https://doi.org/10.1128/JB.84.1.137-146.1962>.
 36. Kurahashi K, Wahba AJ. 1958. Interference with growth of certain *Escherichia coli* mutants by galactose. *Biochim Biophys Acta* 30:298–302. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90054-4).
 37. Yarmolinsky MB, Wiesmeyer H, Kalckar HM, Jordan E. 1959. Hereditary defects in galactose metabolism in *Escherichia coli* mutants, II. Galactose-induced sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:1786–1791. <https://doi.org/10.1073/pnas.45.12.1786>.
 38. Englesberg E, Baron LS. 1959. Mutation to L-rhamnose resistance and transduction to L-rhamnose utilization in *Salmonella typhosa*. *J Bacteriol* 78:675–686. <https://doi.org/10.1128/JB.78.5.675-686.1959>.
 39. Joseleau-Petit D, Liébart J-C, Ayala JA, D'Ari R. 2007. Unstable *Escherichia coli* L forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* 189:6512–6520. <https://doi.org/10.1128/JB.00273-07>.
 40. Magnet S, Dubost L, Marie A, Arthur M, Gutmann L. 2008. Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:4782–4785. <https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>.
 41. Cava F, de Pedro MA, Lam H, Davis BM, Waldor MK. 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J* 30:3442–3453. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.246>.
 42. Milewski S. 2002. Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1597:173–192. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00318-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00318-7).
 43. Weaver AI, Murphy SG, Umans BD, Tallavajhala S, Onyekwere I, Wittels S, Shin J-H, VanNieuwenhze M, Waldor MK, Dörr T. 2018. Genetic determinants of penicillin tolerance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01326-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01326-18>.
 44. Cross T, Ransegnola B, Shin J-H, Weaver A, Fauntleroy K, VanNieuwenhze MS, Westblade LF, Dörr T. 2019. Spheroplast-mediated carbapenem tolerance in Gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00756-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00756-19>.
 45. Ranjit DK, Young KD. 2013. The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195:2452–2462. <https://doi.org/10.1128/JB.00160-13>.
 46. Cambré A, Zimmermann M, Sauer U, Viviji B, Cenens W, Michiels CW, Aertsen A, Loessner MJ, Noben J-P, Ayala JA, Lavigne R, Briers Y. 2015. Metabolite profiling and peptidoglycan analysis of transient cell wall-deficient bacteria in a new *Escherichia coli* model system. *Environ Microbiol* 17:1586–1599. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12594>.
 47. Mercier R, Kawai Y, Errington J. 2014. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *Elife* 3:e04629. <https://doi.org/10.7554/eLife.04629>.
 48. Visick KL, Quirke KP, McEwen SM. 2013. Arabinose induces pellicle formation by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* 79:2069–2080. <https://doi.org/10.1128/AEM.03526-12>.
 49. Espinosa E, Paly E, Barre F-X. 2020. High-resolution whole-genome analysis of sister-chromatid contacts. *Mol Cell* 79:857–869.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.033>.
 50. Li H, Durbin R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26:589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>.
 51. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet J* 17:10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
 52. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28:464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>.
 53. Desmarais SM, De Pedro MA, Cava F, Huang KC. 2013. Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol Microbiol* 89:1–13. <https://doi.org/10.1111/mmi.12266>.
 54. Möll A, Dörr T, Alvarez L, Davis BM, Cava F, Waldor MK. 2015. A D, D-carboxypeptidase is required for *Vibrio cholerae* halotolerance. *Environ Microbiol* 17:527–540. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12779>.
 55. David A, Demarre G, Muresan L, Paly E, Barre F-X, Possoz C. 2014. The two *Cis*-acting sites, *parS1* and *oriC1*, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I. *PLoS Genet* 10:e1004448. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004448>.
 56. Simon R, Priefer U, Puhler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* 1:784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>.

Bibliographie

- Abeles, A.L., Friedman, S.A., Austin, S.J., 1985. Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J Mol Biol* 185, 261–272. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90402-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90402-4)
- Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B., Siddique, A.K., Hasan, N.A., Sack, R.B., Sack, D.A., Ahmed, K.U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C.J., Huq, A., Colwell, R.R., 2007. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17801–17806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705599104>
- Allan, E.J., Hoischen, C., Gumpert, J., 2009. Bacterial L-forms. *Adv Appl Microbiol* 68, 1–39. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01201-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01201-5)
- Alvarez, L., Hernandez, S.B., Cava, F., 2021. Cell Wall Biology of *Vibrio cholerae*. *Annu Rev Microbiol* 75, 151–174. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-040621-122027>
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- Andersen, L.P., 2007. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. *Helicobacter* 12 Suppl 2, 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00574.x>
- Backert, S., Meyer, T.F., 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 9, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.008>
- Baek, J.H., Chatteraj, D.K., 2014. Chromosome I controls chromosome II replication in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 10, e1004184. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004184>
- Baker, T.A., Sekimizu, K., Funnell, B.E., Kornberg, A., 1986. Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell* 45, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90537-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90537-4)
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bartlett, T.M., Bratton, B.P., Duvshani, A., Miguel, A., Sheng, Y., Martin, N.R., Nguyen, J.P., Persat, A., Desmarais, S.M., VanNieuwenhze, M.S., Huang, K.C., Zhu, J., Shaevitz, J.W., Gitai, Z., 2017. A Periplasmic Polymer Curves *Vibrio cholerae* and Promotes Pathogenesis. *Cell* 168, 172–185.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.019>
- Beattie, T.R., Reyes-Lamothe, R., 2015. A Replisome’s journey through the bacterial chromosome. *Front Microbiol* 6, 562. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00562>
- Bendezú, F.O., de Boer, P.A.J., 2008. Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in *mre* and *mrd* shape mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 1792–1811. <https://doi.org/10.1128/JB.01322-07>
- Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., de Boer, P.A.J., 2009. RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J* 28, 193–204. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.264>
- Bergkessel, M., 2021. Bacterial transcription during growth arrest. *Transcription* 12, 232–249. <https://doi.org/10.1080/21541264.2021.1968761>
- Billaudeau, C., Yao, Z., Cornilleau, C., Carballido-López, R., Chastanet, A., 2019. MreB Forms Subdiffraction Nanofilaments during Active Growth in *Bacillus subtilis*. *mBio* 10, e01879-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01879-18>

- Blasco, B., Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A., 1988. Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170, 5224–5228. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5224-5228.1988>
- Campbell, A.M., 1993. Genome organization in prokaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 3, 837–844. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(93\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0959-437x(93)90002-7)
- Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., McQuillan, J.A., 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28, 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Chastanet, A., Carballido-Lopez, R., 2012. The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 1582–1606. <https://doi.org/10.2741/s354>
- Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., Bernhardt, T.G., 2011. Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3773–3778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018674108>
- Coico, R., 2005. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol Appendix 3*, Appendix 3C. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>
- Collier, J., 2019. Cell division control in *Caulobacter crescentus*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862, 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.005>
- David, A., Demarre, G., Muresan, L., Paly, E., Barre, F.-X., Possoz, C., 2014. The two Cis-acting sites, *parS1* and *oriC1*, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I. *PLoS Genet* 10, e1004448. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004448>
- De Geyter, J., Smets, D., Karamanou, S., Economou, A., 2019. Inner Membrane Translocases and Insertases. *Subcell Biochem* 92, 337–366. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_11
- Denic, M., Touati, E., De Reuse, H., 2020. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 25 Suppl 1, e12736. <https://doi.org/10.1111/hel.12736>
- Dobihal, G.S., Brunet, Y.R., Flores-Kim, J., Rudner, D.Z., 2019. Homeostatic control of cell wall hydrolysis by the WalRK two-component signaling pathway in *Bacillus subtilis*. *Elife* 8, e52088. <https://doi.org/10.7554/eLife.52088>
- Dörr, T., Alvarez, L., Delgado, F., Davis, B.M., Cava, F., Waldor, M.K., 2016a. A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 404–409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520333113>
- Dörr, T., Alvarez, L., Delgado, F., Davis, B.M., Cava, F., Waldor, M.K., 2016b. A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 404–409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520333113>
- Dörr, T., Lam, H., Alvarez, L., Cava, F., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2014a. A novel peptidoglycan binding protein crucial for PBP1A-mediated cell wall biogenesis in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 10, e1004433. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004433>
- Dörr, T., Möll, A., Chao, M.C., Cava, F., Lam, H., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2014b. Differential requirement for PBP1a and PBP1b in in vivo and in vitro fitness of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 82, 2115–2124. <https://doi.org/10.1128/IAI.00012-14>
- Draper, G.C., McLennan, N., Begg, K., Masters, M., Donachie, W.D., 1998. Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* 180, 4621–4627. <https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4621-4627.1998>
- Duderstadt, K.E., Berger, J.M., 2008. AAA+ ATPases in the initiation of DNA replication. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 163–187. <https://doi.org/10.1080/10409230802058296>
- Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., Daniel, R.A., Errington, J., 2017. RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat Microbiol* 2, 16253. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.253>
- Espinosa, E., Barre, F.-X., Galli, E., 2017. Coordination between replication, segregation and cell division in multi-chromosomal bacteria: lessons from *Vibrio cholerae*. *Int Microbiol* 20, 121–129. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.293>

- Fisher, J.F., Mobashery, S., 2020. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci* 29, 629–646. <https://doi.org/10.1002/pro.3737>
- Garde, S., Chodiseti, P.K., Reddy, M., 2021. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus* 9. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020>
- Gerdes, K., Maisonneuve, E., 2012. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol* 66, 103–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150159>
- Graham, T.G.W., Wang, X., Song, D., Etson, C.M., van Oijen, A.M., Rudner, D.Z., Loparo, J.J., 2014. ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev* 28, 1228–1238. <https://doi.org/10.1101/gad.242206.114>
- Grainge, I., 2010. FtsK—a bacterial cell division checkpoint? *Mol Microbiol* 78, 1055–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07411.x>
- Green, E.R., Meccas, J., 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Griffin, D.W., 2007. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clin Microbiol Rev* 20, 459–477, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-06>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harrison, P.W., Lower, R.P.J., Kim, N.K.D., Young, J.P.W., 2010. Introducing the bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* 18, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010>
- Hayakawa, T., Tanaka, T., Sakaguchi, K., Otake, N., Yonehara, H., 1979. A LINEAR PLASMID-LIKE DNA IN *STREPTOMYCES* SP. PRODUCING LANKACIDIN GROUP ANTIBIOTICS. *The Journal of General and Applied Microbiology* 25, 255–260. <https://doi.org/10.2323/jgam.25.255>
- Hett, E.C., Rubin, E.J., 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 126–156, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-07>
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hermsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2016. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Jaishankar, J., Srivastava, P., 2017. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Front Microbiol* 8, 2000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jeckelmann, J.-M., Erni, B., 2020. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. *Pflugers Arch* 472, 1129–1153. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02379-0>
- Joseleau-Petit, D., Liébart, J.-C., Ayala, J.A., D’Ari, R., 2007. Unstable *Escherichia coli* L forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* 189, 6512–6520. <https://doi.org/10.1128/JB.00273-07>
- Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K., Fujimitsu, K., 2010. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nat Rev Microbiol* 8, 163–170. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2314>
- Kemter, F.S., Messerschmidt, S.J., Schallopp, N., Sobetzko, P., Lang, E., Bunk, B., Spröer, C., Teschler, J.K., Yildiz, F.H., Overmann, J., Waldminghaus, T., 2018. Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae. *PLoS Genet* 14, e1007251. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007251>
- Kusumoto, A., Asakura, H., Kawamoto, K., 2012. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol* 56, 228–237. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00428.x>

- Lacour, S., Landini, P., 2004. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol* 186, 7186–7195. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7186-7195.2004>
- Leaver, M., Domínguez-Cuevas, P., Coxhead, J.M., Daniel, R.A., Errington, J., 2009. Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* 457, 849–853. <https://doi.org/10.1038/nature07742>
- Lee, K., Yoon, S.S., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol* 27, 1053–1064. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
- Lee, T.K., Huang, K.C., 2013. The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth. *Curr Opin Microbiol* 16, 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.005>
- Levin, B.R., Rozen, D.E., 2006. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 556–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1445>
- Lewis, K., 2010. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 64, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Li, H., Durbin, R., 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Lioy, V.S., Cournac, A., Marbouty, M., Duigou, S., Mozziconacci, J., Espéli, O., Boccard, F., Koszul, R., 2018. Multiscale Structuring of the *E. coli* Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* 172, 771–783.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.027>
- Livny, J., Yamaichi, Y., Waldor, M.K., 2007. Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* 189, 8693–8703. <https://doi.org/10.1128/JB.01239-07>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lutkenhaus, J., 2007. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76, 539–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652>
- Männik, Jaana, Castillo, D.E., Yang, D., Siopsis, G., Männik, Jaan, 2016. The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 44, 1216–1226. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1484>
- Margolin, W., 2009. Sculpting the Bacterial Cell. *Curr Biol* 19, R812–R822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.033>
- Masi, M., Winterhalter, M., Pagès, J.-M., 2019. Outer Membrane Porins. *Subcell Biochem* 92, 79–123. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_4
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y., Schoolnik, G.K., 2005. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824–1827. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>
- Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., 1985. Effect of growth conditions on peptidoglycan content and cytoplasmic steps of its biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163, 208–212. <https://doi.org/10.1128/jb.163.1.208-212.1985>
- Mercier, R., Kawai, Y., Errington, J., 2014. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *Elife* 3, e04629. <https://doi.org/10.7554/eLife.04629>
- Mercier, R., Kawai, Y., Errington, J., 2013. Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell* 152, 997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.043>
- Mercier, R., Petit, M.-A., Schbath, S., Robin, S., El Karoui, M., Boccard, F., Espéli, O., 2008. The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135, 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.031>
- Misra, H.S., Maurya, G.K., Chaudhary, R., Misra, C.S., 2018. Interdependence of bacterial cell division and genome segregation and its potential in drug development. *Microbiological Research* 208, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.013>

- Moir, A., Cooper, G., 2015. Spore Germination. *Microbiol Spectr* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012>
- Monahan, L.G., Turnbull, L., Osvath, S.R., Birch, D., Charles, I.G., Whitchurch, C.B., 2014. Rapid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to a spherical cell morphotype facilitates tolerance to carbapenems and penicillins but increases susceptibility to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1956–1962. <https://doi.org/10.1128/AAC.01901-13>
- Moyed, H.S., Bertrand, K.P., 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155, 768–775. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
- Ng, W.-L., Bassler, B.L., 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43, 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Nyström, T., 2004. Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* 58, 161–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123818>
- O'Donnell, M., Langston, L., Stillman, B., 2013. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a010108. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>
- Park, J.T., Uehara, T., 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 211–227, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-07>
- Parks, D.H., Rinke, C., Chuvpochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B.J., Evans, P.N., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2017. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat Microbiol* 2, 1533–1542. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
- Pazos, M., Vollmer, W., 2021. Regulation and function of class A Penicillin-binding proteins. *Curr Opin Microbiol* 60, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.008>
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T., Maiväli, U., 2011. Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Rep* 12, 458–462. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.47>
- Pinto, D., Santos, M.A., Chambel, L., 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol* 41, 61–76. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O., 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem* 7, 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Raetz, C.R.H., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E., Colwell, R.R., 1994. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl Environ Microbiol* 60, 3573–3578. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3573-3578.1994>
- Rampelotto, P.H., 2013. Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel)* 3, 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Ranjit, D.K., Jorgenson, M.A., Young, K.D., 2017. PBP1B Glycosyltransferase and Transpeptidase Activities Play Different Essential Roles during the De Novo Regeneration of Rod Morphology in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 199, e00612-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00612-16>
- Ranjit, D.K., Young, K.D., 2013. The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195, 2452–2462. <https://doi.org/10.1128/JB.00160-13>
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serron, P., Wong, K.W., Sonenshein, A.L., 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* 15, 1093–1103. <https://doi.org/10.1101/gad.874201>

- Rava, P.S., Somma, L., Steinman, H.M., 1999. Identification of a regulator that controls stationary-phase expression of catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 181, 6152–6159. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.6152-6159.1999>
- Riley, E.P., Schwarz, C., Derman, A.I., Lopez-Garrido, J., 2020. Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microb Cell* 8, 1–16. <https://doi.org/10.15698/mic2021.01.739>
- Rittershaus, E.S.C., Baek, S.-H., Sasseti, C.M., 2013. The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe* 13, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Robinett, C.C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., Belmont, A.S., 1996. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135, 1685–1700. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1685>
- Rodrigues, S., Paillard, C., Le Pennec, G., Dufour, A., Bazire, A., 2015. *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. *Front Microbiol* 6, 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01384>
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1, 283–290. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.53>
- Rohde, M., 2019. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- Sayed, A.M., Hassan, M.H.A., Alhadrami, H.A., Hassan, H.M., Goodfellow, M., Rateb, M.E., 2020. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *J Appl Microbiol* 128, 630–657. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shinn, E.A., Griffin, D.W., Seba, D.B., 2003. Atmospheric transport of mold spores in clouds of desert dust. *Arch Environ Health* 58, 498–504.
- Signoretto, C., Lleò, M.M., Canepari, P., 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr Microbiol* 44, 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0062-0>
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Smith, W.P.J., Davit, Y., Osborne, J.M., Kim, W., Foster, K.R., Pitt-Francis, J.M., 2017. Cell morphology drives spatial patterning in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E280–E286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613007114>
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Stenström, T.A., Conway, P., Kjelleberg, S., 1989. Inhibition by antibiotics of the bacterial response to long-term starvation of *Salmonella typhimurium* and the colon microbiota of mice. *J Appl Bacteriol* 67, 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb04954.x>
- Stragier, P., Losick, R., 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 30, 297–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.297>
- Takeda, Y., 2011. *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87, 1–12. <https://doi.org/10.2183/pjab.87.1>
- Tanaka, K., Handel, K., Loewen, P.C., Takahashi, H., 1997. Identification and analysis of the rpoS-dependent promoter of *katE*, encoding catalase HPII in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1352, 161–166. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00044-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00044-4)
- Tanaka, K., Matsuyama, S.-I., Tokuda, H., 2001. Deletion of *lolB*, Encoding an Outer Membrane Lipoprotein, Is Lethal for *Escherichia coli* and Causes Accumulation of Lipoprotein

- Localization Intermediates in the Periplasm. *J Bacteriol* 183, 6538–6542.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6538-6542.2001>
- Teschler, J.K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A.S., Warner, C.J.A., Wong, G.C.L., Linington, R.G., Yildiz, F.H., 2015. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 13, 255–268. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3433>
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., Vollmer, W., 2011. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 10, 123–136.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2677>
- Val, M.-E., Marbouty, M., de Lemos Martins, F., Kennedy, S.P., Kemble, H., Bland, M.J., Possoz, C., Koszul, R., Skovgaard, O., Mazel, D., 2016. A checkpoint control orchestrates the replication of the two chromosomes of *Vibrio cholerae*. *Sci Adv* 2, e1501914.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501914>
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G., 2010. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>
- Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>
- Weaver, A.I., Murphy, S.G., Umans, B.D., Tallavajhala, S., Onyekwere, I., Wittels, S., Shin, J.-H., VanNieuwenhze, M., Waldor, M.K., Dörr, T., 2018. Genetic Determinants of Penicillin Tolerance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62, e01326-18.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01326-18>
- Wolański, M., Donczew, R., Zawilak-Pawlik, A., Zakrzewska-Czerwińska, J., 2015. oriC-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Front Microbiol* 5, 735.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00735>
- Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E., Payne, S.M., 1997. Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* 179, 7055–7062. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.7055-7062.1997>
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8, 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Yamaichi, Y., Bruckner, R., Ringgaard, S., Möll, A., Cameron, D.E., Briegel, A., Jensen, G.J., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2012. A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev* 26, 2348–2360.
<https://doi.org/10.1101/gad.199869.112>
- Yamaichi, Y., Fogel, M.A., McLeod, S.M., Hui, M.P., Waldor, M.K., 2007a. Distinct centromere-like parS sites on the two chromosomes of *Vibrio* spp. *J Bacteriol* 189, 5314–5324.
<https://doi.org/10.1128/JB.00416-07>
- Yamaichi, Y., Fogel, M.A., Waldor, M.K., 2007b. par genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 630–635.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608341104>
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K.S., Yamamoto, K., Honda, T., 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol* 31, 1513–1521. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01296.x>
- Yan, J., Bassler, B.L., 2019. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* 26, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
- Yates, J., Zhekov, I., Baker, R., Eklund, B., Sherratt, D.J., Arciszewska, L.K., 2006. Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol Microbiol* 59, 1754–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05033.x>

- Young, K.D., 2007. Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol* 10, 596–600. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>
- Yulo, P.R.J., Hendrickson, H.L., 2019. The evolution of spherical cell shape; progress and perspective. *Biochem Soc Trans* 47, 1621–1634. <https://doi.org/10.1042/BST20180634>
- Zgurskaya, H.I., Walker, J.K., Parks, J.M., Rybenkov, V.V., 2021. Multidrug Efflux Pumps and the Two-Faced Janus of Substrates and Inhibitors. *Acc Chem Res* 54, 930–939. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00843>