



HAL
open science

Déchiffrer la motilité des Spirochètes en s'appuyant sur le modèle de l'endoflagelle de *Leptospira* spp

Lenka Fule

► **To cite this version:**

Lenka Fule. Déchiffrer la motilité des Spirochètes en s'appuyant sur le modèle de l'endoflagelle de *Leptospira* spp. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5181 . tel-04658963

HAL Id: tel-04658963

<https://theses.hal.science/tel-04658963v1>

Submitted on 22 Jul 2024

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.

Université Paris Cité Institut PASTEUR

École doctorale Biologie Sorbonne Paris Cité (562)

Unité Biologie des Spirochètes

Déchiffrer la motilité des Spirochètes en s'appuyant sur le modèle de l'endoflagelle de *Leptospira* spp.

Par Lenka Füle

Thèse de doctorat de Microbiologie Fondamentale

Dirigée par Dr Mathieu Picardeau

Soutenue le 12 décembre 2022 devant un jury composé de :

Dr Annabelle MERIEAU (MCF-HDR, Université de Rouen)	Rapporteur
Dr Emilia MAURIELLO (DR, Université Aix-Marseille)	Rapporteur
Pr Isabelle MARTIN-VERSTRAETE (PU, Université Paris Cité)	Examineur
Dr Ambroise LAMBERT (MCF, Cergy Paris Université)	Examineur
Dr Suzana SALCEDO (CR, Université de Lyon)	Examineur
Dr Mathieu PICARDEAU (Chef d'unité, Institut Pasteur)	Directeur de thèse

Résumé : Déchiffrer la motilité des spirochètes en s'appuyant sur le modèle de l'endoflagelle de *Leptospira* spp.

La leptospirose est une zoonose présente surtout dans les zones tropicales, transmise aux hôtes accidentels (humains, animaux domestiques ou d'élevage) par contact indirect avec l'environnement souillé par les urines des hôtes réservoir (rongeurs). L'infection par *Leptospira interrogans* et les autres leptospires pathogènes engendre chez l'humain des symptômes s'apparentant à un syndrome grippal. Non traitée, la maladie peut évoluer en sa forme grave, le syndrome de Weil, qui se manifeste par des ictères, une insuffisance rénale et des hémorragies pulmonaires.

Les leptospires appartiennent au phylum des Spirochaetes, reconnaissables à leur morphologie en forme d'hélice et à la présence de flagelles ancrés au sein du périplasma, s'allongeant des pôles en direction du milieu de la cellule – les endoflagelles. Cette morphologie leur confère un mécanisme de motilité unique dans le règne bactérien : les leptospires déforment leurs extrémités en forme de crochet ou de spirale, en fonction du sens de la rotation du flagelle, pour générer un déplacement translationnel. Ceci fait des spirochètes des pathogènes très invasifs, capables de traverser aisément les barrières épithéliales et les tissus afin de disséminer dans l'organisme.

Les leptospires possèdent un endoflagelle par pôle, ne s'entrecroisant pas au milieu de la cellule. Ils ont une composition protéique complexe : les corps basaux sont plus volumineux que ceux des espèces exoflagellées, et le filament est composé de plusieurs flagellines – quatre protéines de cœur et plus d'une dizaine de protéines de gaine, s'organisant de manière asymétrique autour du cœur flagellaire, entraînant un surenroulement du flagelle.

L'objectif de ce mémoire est d'élucider les mécanismes inhérents à la motilité des spirochètes en se basant sur le modèle de l'endoflagelle de *L. interrogans* (pathogène) et *L. biflexa* (saprophyte). Par l'étude phénotypique, transcriptomique et protéomique de plusieurs mutants de transposition de gènes de motilité, nous souhaitons apporter de nouvelles connaissances quant à la structure et la composition de l'endoflagelle, ainsi qu'à la régulation de la motilité des leptospires.

D'abord, je me suis intéressée au rôle des déterminants de la localisation et du nombre de flagelles, FlhF et FlhG. L'étude de deux mutants de transposition dans le gène *flhG* chez *L. interrogans* et *L. biflexa* démontrent que contrairement aux bactéries aux flagelles externes, les mutants *flhG*⁻ sont peu affectés au niveau de la polarité et du nombre de flagelles. Des reconstructions par cryo-tomographie ont montré un rapprochement du corps basal vers l'extrémité du pôle cellulaire, entraînant un défaut de motilité et une perte de virulence chez la souche pathogène.

Ensuite, j'ai étudié la contribution de la protéine majoritaire du cœur du filament, FlaB1, dans la motilité et la structure de l'endoflagelle. Le mutant *flaB1*⁻ chez *L. interrogans* est non-motile et avirulent, mais synthétise toujours des flagelles. L'analyse protéomique du mutant montre qu'un mécanisme de compensation est mis en place entre les quatre isoformes de la protéine FlaB et ceci a un impact sur la structure du filament, notamment au niveau de l'asymétrie de la gaine du filament.

En conclusion, au cours de ma thèse, j'ai analysé les mécanismes moléculaires sous-jacents à la localisation des endoflagelles et à la structure asymétrique des filaments flagellaires chez les leptospires. Ces découvertes devraient permettre de mieux comprendre l'organisation des endoflagelles chez les leptospires et, par extrapolation, une meilleure compréhension des avantages évolutifs de la motilité atypique des spirochètes.

Mots-clés : spirochètes, motilité, endoflagelle, virulence, structure

Abstract : Deciphering the motility of spirochetes using the endoflagellum of *Leptospira* spp. as a model.

Leptospirosis is a zoonosis mainly present in tropical climates, transmitted to accidental hosts such as humans or domestic animals through indirect contact with the environment soiled by the urine of reservoir hosts, mainly rodents. The causative agent, *Leptospira interrogans*, causes flu-like symptoms in humans. Untreated, the disease can progress to its severe form, the Weil syndrome, which manifests by jaundice, kidney failure and pulmonary hemorrhages.

Leptospire belongs to the phylum of Spirochaetes – bacteria recognizable by their helical morphology and the presence of flagella anchored within the periplasm, extending from the poles towards the middle of the cell – the endoflagella. This morphological aspect is closely related to a motility mechanism unique in the bacterial kingdom: leptospire deforms their cell ends in the shape of a hook or spiral, depending on the direction of the flagella rotation, to generate a translational displacement. The resulting movement makes spirochetes particularly invasive pathogens, able to easily cross epithelial and tissues barriers to spread throughout the body.

Leptospire has one endoflagellum per pole, not intersecting at the mid-cell. In addition, they have a complex protein composition: the basal bodies are larger than those of exoflagellate species, and the filament is composed of several flagellins – four core proteins and more than ten sheath proteins. The filament proteins are asymmetrically organized around the flagellar core, making the flagella supercoiled, thus allowing the cell to deform.

The purpose of this thesis is to elucidate the mechanisms inherent to spirochete motility, based on the endoflagella of *L. interrogans*, a pathogenic strain, and *L. biflexa*, a saprophytic strain. By the phenotypic, transcriptomic, and proteomic study of several motility gene transposition mutants, we aim to provide new knowledge about the structure and composition of the endoflagella, as well as the regulation of the motility of leptospire.

First, I became interested in the role of the determinants of localization and number of flagella, FlhF and FlhG. The study of two transposition mutants in the *flhG* gene in *L. interrogans* and *L. biflexa* shows that unlike bacteria with external flagella, *flhG* mutants have only minor defects in the polarity and number of flagella, but cryo-tomography reconstructions have shown a displacement of the basal body towards the tip of the cell pole, resulting in motility defect and loss of virulence in the pathogen.

Then, I studied the contribution of the major filament core protein, FlaB1, in the motility and structure of the endoflagella. The mutant *flaB1*⁻ in *L. interrogans* is non-motile and avirulent, but still synthesizes flagella. Proteomic analysis of the mutant shows the existence of a compensation mechanism between the four isoforms of the FlaB protein, and this has an impact on the filament asymmetrical structure of the sheath of the filament.

In conclusion, during my thesis, I analyzed the molecular mechanisms underlying the localization of endoflagella and the asymmetric structure of flagellar filaments in leptospire. These findings should lead to a better understanding of the organization of endoflagella in leptospire and by extrapolation an insight of the evolutionary benefits of this atypical motility mode in spirochetes.

Keywords : spirochetes, motility, endoflagella, virulence, structure

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
CAAT	test d'agglutinations croisées (Cross Agglutinin Absorption Test)
CNR	Centre National de Référence
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DO	Densité Optique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMJH	milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	guanosine monophosphate
HAN	milieu Hornsby-Alt-Nally
IM	membrane interne
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LCR	liquide céphalorachidien
LPS	lipopolysaccharide
MAT	microscopic agglutination test
MCP	methyl-accepting chemotaxis protein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	neutrophil extracellular traps
NHEJ	non-homologous end-joining
OM	membrane externe
OMP	outer membrane protein
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain reaction
PF	flagelles périplasmiques
PG	peptidoglycane
pH	potentiel hydrogène
RFP	Red Fluorescent Protein
ROS	espèces réactives à l'oxygène
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain reaction
SNP	single nucleotide polymorphism
SS	système de sécrétion
STAFF	supplément sulfaméthoxazole, triméthoprim, amphotéricine B, fosfomycine, 5-fluoro-uracile
TALE	Transcription Activator-Like Effectors
TLR	Toll-Like Receptor

Indexe des figures et tableaux

Figure 1 Croquis esquissé par Antoni van Leeuwenhoek à la suite de l'observation d'un échantillon de la plaque dentaire.	14
Figure 2 Morphologies de trois représentants du phylum des Spirochaetes.	15
Figure 3 Composition de la paroi cellulaire chez les bactéries	18
Figure 4 Représentation phylogénétique des relations entre 113 espèces du phylum des Spirochaetes	20
Figure 5 Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Leptospira</i>	25
Figure 6 Cycle zoonotique de la leptospirose et symptômes cliniques chez l'être humain. ...	27
Figure 7 Données épidémiologiques issues du rapport annuel d'activités du CNR	28
Figure 8 Incidence de la leptospirose au niveau mondial.	29
Figure 9 Clichés d'habitations en favelas au Brésil.	30
Figure 10 Représentation schématique des méthodes de diagnostic.....	31
Figure 11 Principales catégories de facteurs de virulence chez les bactéries.....	35
Figure 12 Quelques exemples de facteurs de virulence identifiés chez les leptospires	36
Figure 13 Modèles animaux utilisés en laboratoire pour étudier la leptospirose.	37
Figure 14 Schéma récapitulatif des différents éléments de surface et protéines membranaires décrits chez <i>Leptospira</i>	38
Figure 15 Représentation schématique des domaines de LigA, LigB et LigC de <i>L. interrogans</i>	41
Figure 16 Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des leptospires lors de l'invasion de l'hôte.....	43
Figure 17 Diagramme illustrant les ratios invasivité versus toxigénèse de plusieurs espèces bactériennes.	46
Figure 18 Aspect de colonies du saprophyte <i>L. biflexa</i> sur milieu gélosé.	50
Figure 19 Diagramme de Venn illustrant le pangéome des 68 espèces de leptospires	52
Figure 20 Schéma récapitulatif des outils génétiques disponibles en 2017 pour l'étude de <i>Leptospira</i>	53
Figure 21 Cliché de microscopie électronique à contraste négatif d'une leptospire et de <i>E. coli</i> en cours de conjugaison.	54
Figure 22 Carte des sites d'insertion du transposon <i>Himar1</i> dans le génome de <i>L. interrogans</i>	55
Figure 23 Arbre phylogénétique du vivant réalisé en fonction des types de motilité identifiés à ce jour.	62
Figure 24 Cinq modes de déplacement chez les bactéries.	64
Figure 25 Organisation des flagelles chez les bactéries à flagelles externes.	65
Figure 26 Présence ou absence des régulateurs de nombre et de localisation des flagelles chez plusieurs espèces bactériennes.	66
Figure 27 Modification de la flagellation et de la motilité de <i>Shewanella oneidensis</i> dues à la mutation d'un ou plusieurs gènes flagellaires.	68
Figure 28 Proposition du mécanisme de régulation spatio-numérique des flagelles de <i>Campylobacter jejuni</i> par FlhF/FlhG	69
Figure 29 Structure du flagelle chez les bactéries exoflagellées.	73
Figure 30 Chronologie de l'assemblage du flagelle externe de <i>E. coli</i>	75
Figure 31 Classification des opérons de gènes de motilité.	76
Figure 32 Chimiotactisme et déplacement de <i>E. coli</i>	78
Figure 33 Schéma du mécanisme de chimiotactisme chez <i>E. coli</i>	79
Figure 34 Motilité particulière des spirochètes.	80

Figure 35 Etude du comportement de motilité de <i>Leptospira</i> face à une transition entre environnement liquide et visqueux.	81
Figure 36 Effet de la viscosité du milieu sur la vélocité de plusieurs espèces bactériennes...	82
Figure 37 Phénotype de croissance, morphologie et motilité du mutant <i>flhF</i> chez <i>B. burgdorferi</i>	85
Figure 38 Reconstitutions cryo-tomographiques de la morphologie des souches sauvages et mutantes en <i>flhF</i> de <i>B. burgdorferi</i>	86
Figure 39 Représentations schématiques du corps basal, du filament et de la flagelline principale des spirochètes.....	89
Figure 40 Assemblage de l'endoflagelle de <i>B. burgdorferi</i>	94
Figure 41 Hypothèse sur l'origine de l'asymétrie du filament de <i>Leptospira</i>	132
Figure 42 Nombre de copies par cellule des quatre isoformes de FlaB chez <i>L. interrogans</i>	133
Figure 43 Distribution et organisation des quatre flagellines FlaB.....	134
Figure 44 Phénotype de motilité du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i> en milieu semi-solide et liquide.....	136
Figure 45 Détermination du phénotype de virulence du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i>	138
Figure 46 Etude de la morphologie cellulaire de la souche sauvage et le mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i>	140
Figure 47 Analyse protéomique de la composition des endoflagelles du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i> comparée à la souche sauvage.	142
Figure 48 Analyse des endoflagelles purifiés et observés par microscopie électronique à transmission.....	145
Figure 49 Reconstitutions du filament flagellaire par cryo-tomographie électronique.....	146
Figure 50 Complémentation fonctionnelle du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i>	148
Figure 51 Classification phylogénétique des quatre isoformes de la flagelline FlaB au sein des espèces de <i>Leptospira</i>	150
Figure S 1 Carte des peptides de la protéine FlaB1 identifiés par spectrométrie de masse ..	153
Figure S 2 Résumé du phénotype du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. biflexa</i>	154
Tableau 1 Classification sérotypique des souches pathogènes des leptospires.....	24
Tableau 2 Composition du supplément du milieu EMJH	49
Tableau 3 Caractéristiques principales de plusieurs représentants des spirochètes	84
Tableau 4 Liste des composants du filament flagellaire chez <i>L. interrogans</i> , <i>B. burgdorferi</i> et <i>T. pallidum</i>	94
Tableau 5 Caractéristiques des quatre flagellines FlaB chez <i>Leptospira</i> spp.	133

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Abréviations	6
Indexe des figures et tableaux	7
Table des matières	9
Introduction	13
1. Historique de la découverte des Spirochètes	14
2. Morphologies des spirochètes	15
3. Classification phylogénétique des spirochètes	19
4. Identification des agents étiologiques des principales spirochètoses	20
4.1. La syphilis	20
4.2. La maladie de Lyme	21
4.3. La leptospirose	22
4.4. Autres spirochètoses	22
5. Focus sur le genre <i>Leptospira</i>	23
5.1. Diversité des espèces	23
5.1.1. Classification sérologique	23
5.1.2. Classification génomique	24
5.2. La leptospirose et le syndrome de Weil	25
5.2.1. Signes cliniques et cycle infectieux	25
5.2.2. Prévalence mondiale	27
5.2.3. Diagnostic biologique	30
5.2.4. Traitements	32
5.2.5. Prophylaxie	33
5.3. Facteurs de virulence	34
5.3.1. Définition	34
5.3.2. Les protéines membranaires et éléments de surface	38
5.3.3. Les facteurs de survie et de dissémination dans l'hôte	42
5.3.4. Les toxines	46
5.4. Culture en laboratoire et manipulation génétique	48
5.4.1. Culture des leptospires	48
5.4.2. Composition du génome	51
5.4.3. Outils de manipulation génétique et post-génomique	52
5.4.3.1. Transformation	53
5.4.3.2. Mutagenèse, disruption de gènes	54
5.4.3.3. Expression de protéines, gènes rapporteurs, fluorescence	57

5.4.3.4.	Transcriptomique et protéomique	59
5.4.3.5.	Perspectives et outils en développement.....	59
6.	La motilité	61
6.1.	Motilité des bactéries autres que les spirochètes.....	63
6.1.1.	Organisation de la flagellation.....	64
6.1.2.	Composition et assemblage des flagelles	70
6.1.2.1.	Corps basal	70
6.1.2.1.1.	Système de sécrétion	70
6.1.2.1.2.	C- ring et MS-ring.....	70
6.1.2.1.3.	P- et L-ring	71
6.1.2.1.4.	Stator	71
6.1.2.1.5.	Tige, crochet et filament.....	71
6.1.2.2.	Assemblage et régulation	73
6.1.3.	Chimiotactisme	77
6.2.	Motilité chez les spirochètes	79
6.2.1.	Organisation des endoflagelles.....	82
6.2.2.	Composition et assemblage des endoflagelles.....	88
6.2.2.1.	Corps basal	88
6.2.2.1.1.	Système de sécrétion	90
6.2.2.1.2.	MS- et C-ring	90
6.2.2.1.3.	P- et L-ring	91
6.2.2.1.4.	Stator	91
6.2.2.1.5.	Collar	91
6.2.2.2.	Tige, crochet et filament.....	92
6.2.2.3.	Assemblage et régulation	94
6.2.3.	Chimiotactisme	95
	Objectifs de la thèse	97
	Résultats	99
	Chapitre 1 : Le rôle du déterminant majeur de la flagellation polaire, FlhG, chez <i>Leptospira</i> spp.	100
	Chapitre 2 : Implication de la flagelline majoritaire du cœur du filament, FlaB1, dans le phénotype et la structure de l'endoflagelle de <i>Leptospira</i> spp.	130
1.	Introduction	131
2.	Analyse du phénotype du mutant <i>flaB1</i> ⁻ de <i>L. interrogans</i> sérovar Manilae.....	135
2.1.	Résultats expérimentaux	135
2.1.1.	Phénotype de motilité	135
2.1.2.	Virulence	136
2.1.3.	Morphologie cellulaire	138

2.1.4.	Expression des protéines des autres éléments structuraux de l'endoflagelle	141
2.1.5.	Structure des endoflagelles	143
2.1.6.	Complémentation fonctionnelle	146
3.	Conclusion générale sur le rôle des FlaBs et perspectives	148
4.	Données supplémentaires	153
Discussion et perspectives		155
1.	Diversité de la composition des endoflagelles chez les spirochètes	157
2.	Rôle du déterminant de la flagellation polaire FlhG chez <i>Leptospira</i> spp.	159
3.	Les flagellines FlaB du cœur du filament et leur fonction dans la structure de l'endoflagelle et la motilité de <i>Leptospira</i> spp.	161
4.	Perspectives	163
Références bibliographiques		166
Annexes		198
Annexe 1 : Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum		199
Annexe 2 : Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in <i>Leptospira</i> spp		214

“Je dois dire, pour ma part, qu'il n'y a jamais eu de spectacle plus agréable devant mes yeux que ces milliers d'êtres vivants, vus tous vivants dans une petite goutte d'eau, se déplaçant les uns parmi les autres, chacun ayant son propre mouvement.”

Extrait de la 18ème lettre d'Antoni van Leeuwenhoek à la Royal Society sur les observations faites le 6 août 1676 de "petites anguilles" dans un flacon d'eau contenant du poivre.

Introduction

1. Historique de la découverte des Spirochètes

La première description des spirochètes a été probablement faite dans les années 1670 par le célèbre inventeur du microscope, Antoni van Leeuwenhoek. Il a observé et identifié différents types « d'animalcules » présents dans la cavité orale (**Figure 1**). Parmi eux on retrouve des bacilles, des coques, ainsi que des microorganismes de forme spiralée (**Figure 1G**), que l'on pourrait attribuer aujourd'hui soit à une espèce de *Spirillum* (bêta-protéobactérie), soit au spirochète pathogène oral *Treponema denticola*.

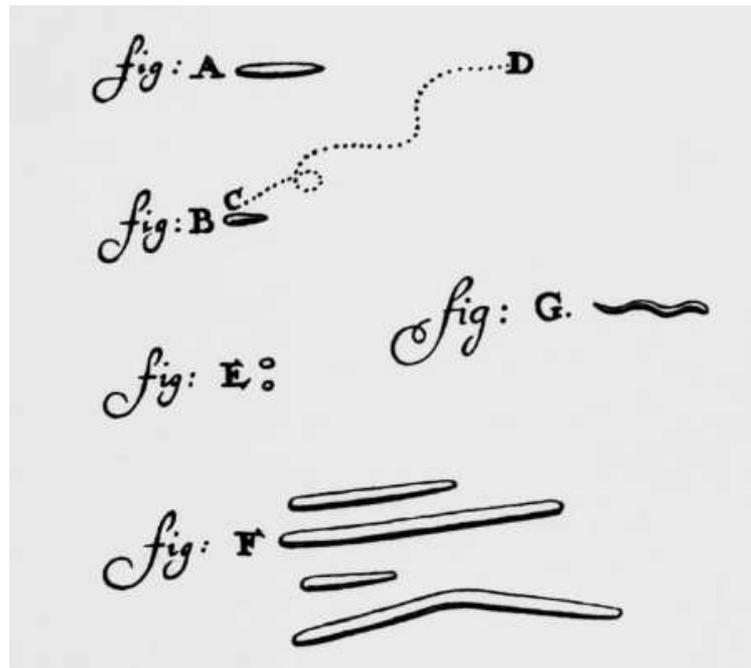


Figure 1 Croquis esquissé par Antoni van Leeuwenhoek à la suite de l'observation d'un échantillon de la plaque dentaire. Sont représentés plusieurs types de microorganismes, ou animalcules, apparentés aux bacilles (A-D), coques (E), spirochètes (G) et à la bêta-protéobactérie *Leptotrichia oralis* (F). Domaine public, Wikimedia.

Cependant, ce n'est qu'en 1835 que Christian Gottfried Ehrenberg donne le nom de « bactéries » aux animalcules et mentionne pour la première fois les spirochètes. Le nom qui leur a été attribué est particulièrement adéquat : étymologiquement, « *Spirochaeta* » vient du grec « *spiro-* », signifiant « spiralé » et « *-khaetos* » qui désigne la chevelure. En effet, morphologiquement, les bactéries appartenant aux spirochètes sont longues, fines et en forme de spirale, comme l'on pourrait imaginer un brin de cheveu bouclé.

2. Morphologies des spirochètes

Le phylum des Spirochaetes comprend majoritairement des bactéries en forme hélicoïdale ou de vague plane, avec comme exception quelques bactéries coccoïdes non motiles dans le genre *Sphaerochaeta* (1,2). La plupart des spirochètes ont une longueur comprise entre 3 et 20 μm , avec un diamètre de 0,1 à 3 μm (3,4). Cependant, certaines espèces géantes (150 μm de longueur) ont été décrites dans les genres *Cristispira* et *Spirochaeta* (5).

Elles possèdent toutes deux membranes cellulaires (interne et externe) avec une couche de peptidoglycane entre les deux (**Figure 2**) (6–8). Cependant, les spirochètes ne peuvent pas être considérées comme bactéries à Gram négatif, car elles ne sont pas sensibles à cette coloration : on parlera donc de bactéries didermes.

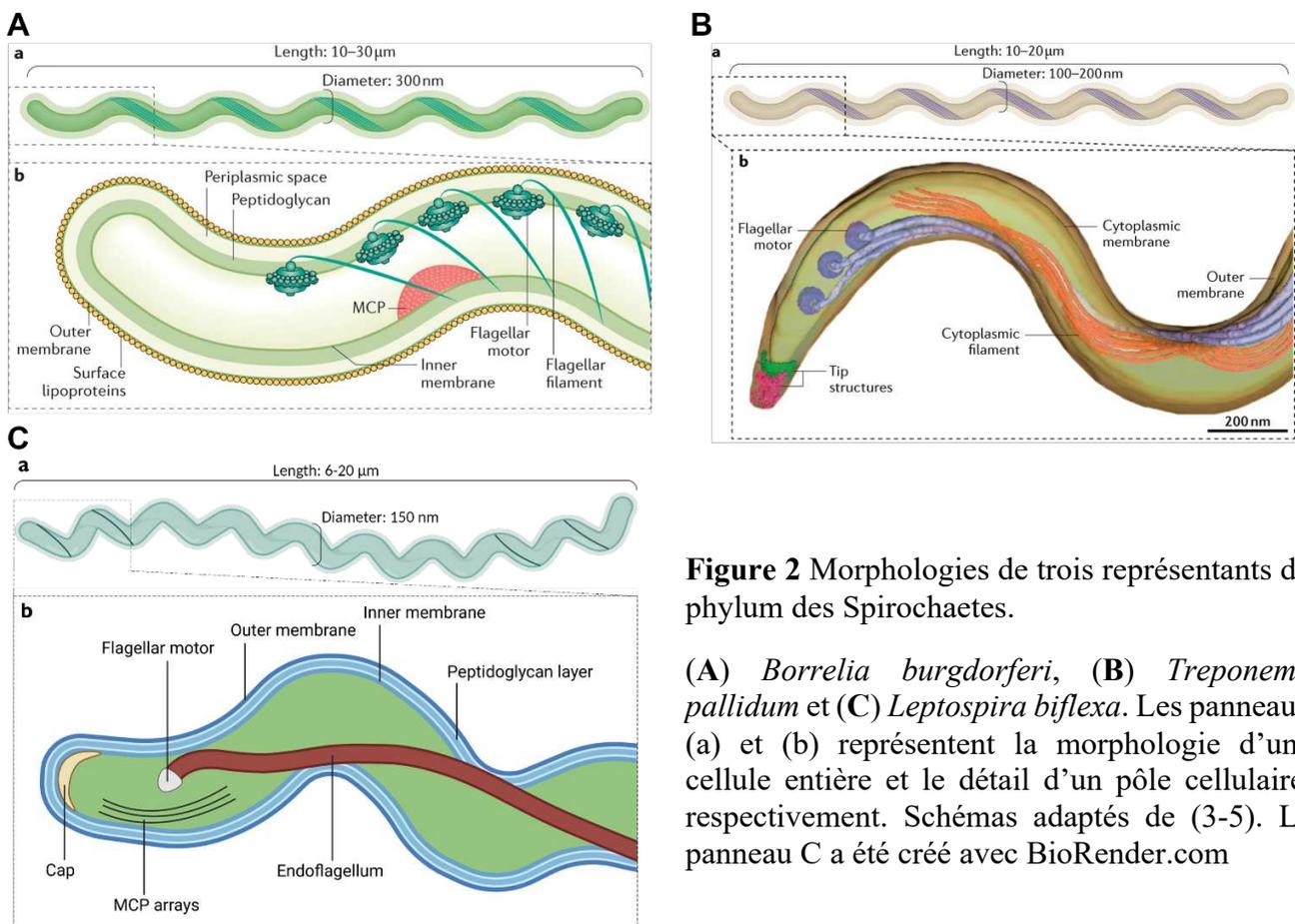


Figure 2 Morphologies de trois représentants du phylum des Spirochaetes.

(A) *Borrelia burgdorferi*, (B) *Treponema pallidum* et (C) *Leptospira biflexa*. Les panneaux (a) et (b) représentent la morphologie d'une cellule entière et le détail d'un pôle cellulaire, respectivement. Schémas adaptés de (3-5). Le panneau C a été créé avec BioRender.com

En plus de leur forme atypique, les spirochètes se différencient des autres bactéries motiles par la présence de flagelles dans l'espace périplasmique. Ces flagelles internes ont eu plusieurs dénominations dans la littérature au fil des années : fibrilles périplasmiques, fibrilles axiales, ou endoflagelles. Selon les espèces, on retrouve d'un à plusieurs dizaines d'endoflagelles attachés à chaque pôle cellulaire. Les endoflagelles sont regroupés sous forme de ruban chez

Treponema (2-3 filaments) et *Borrelia* (8-11 filaments), avec les extrémités qui s'entrecroisent au milieu de la cellule. Les leptospires ne possèdent qu'un seul flagelle par extrémité, qui sont plus courts donc ne se rencontrent pas au milieu de la cellule. Ces flagelles ont pour fonction principale de permettre le déplacement des bactéries dans leur milieu, mais sont aussi des éléments du cytosquelette. Cependant, ceci n'est pas vrai chez toutes les espèces : chez les leptospires, la mutation ou absence du flagelle ne modifie pas l'hélicité de la cellule, tandis que les mutants aflagellés de *Borrelia* perdent leur forme de vague et deviennent filamenteux (9), et ceux de *Treponema* deviennent complètement hélicoïdaux au lieu d'une alternance hélice/vague plane (10). On peut toutefois constater que les endoflagelles courts de *Leptospira* déforment les extrémités de la cellule : selon le sens de rotation du flagelle, le pôle de la cellule adopte soit une conformation de type « spirale » ou « crochet ». Ces déformations de la cellule sont primordiales pour que les leptospires parviennent à se déplacer de manière translationnelle – ce sujet sera discuté davantage en profondeur dans la partie sur la motilité bactérienne.

Mis à part l'implication des endoflagelles dans la morphologie des spirochètes, peu de choses sont connues concernant les composants du cytosquelette. Des filaments cytoplasmiques ont été identifiés au niveau de la membrane interne en parallèle du ruban endoflagellaire chez les tréponèmes et *Borrelia* (11,12). Les fibrilles de *Treponema denticola* sont composées d'une protéine de haut poids moléculaire, CfpA (83 kDa), qui lorsque délétée, produit des cellules particulièrement allongées et non motiles (13). Le rôle spécifique de ces fibrilles cytoplasmiques n'est pas encore totalement élucidé, mais en plus d'une composante morphologique, elles interviennent probablement dans la ségrégation du chromosome et la division cellulaire. De façon similaire, une protéine de type « coiled-coil », nommée Scc, a été identifiée et étudiée chez *L. biflexa* : cette protéine, dont l'homologue CreS de *Caulobacter crescentus* permet à la bactérie d'adopter une forme de croissant, forme des filaments cytoplasmiques dont le rôle n'est pas encore parfaitement clair à ce jour chez le spirochète (14).

Plus récemment, Jackson et ses collaborateurs ont identifié 5 homologues de bactofilines chez *Leptospira biflexa* – LbbA-E (15). Les bactofilines sont des protéines du cytosquelette bactérien qui ont des rôles variés selon les espèces. Un mutant de ce composant du cytosquelette chez *Proteus mirabilis* ou *Myxococcus xanthus* génère des cellules « entortillées » (16,17), tandis que chez *Helicobacter pylori*, les cellules adoptent une forme de bâtonnet (18). Dans le cas du mutant LbbD chez *L. biflexa*, les auteurs ont constaté une nette diminution de la taille du pas d'hélice, rendant les bactéries plus « compactes ».

Enfin, une étude a mis en évidence le rôle prédominant du peptidoglycane dans l'hélicité des leptospires. Effectivement, une fois purifié, le saccule de peptidoglycane maintient une forme spiralée (19). Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore totalement résolu, mais cela peut être en partie causé par une composition atypique du peptidoglycane, notamment par la rareté de l'acide aminé D-Alanine au niveau des chaînes peptidiques, autrement très répandu chez les autres espèces dites à « Gram négatif ». On peut également noter que chez les spirochètes, le peptidoglycane n'est pas ancré au niveau de la membrane externe (**Figure 3**). Le génome de *Leptospira* possède les homologues des protéines associées à la formation et au recyclage du peptidoglycane, ainsi qu'à la division cellulaire tels que FtsZ, FtsI, MreB-D ou RodA. Il a été démontré chez *L. biflexa* que MreB est impliqué localement dans la régulation du diamètre de la cellule, le pas de l'hélice et la longueur cellulaire (19).

La composition des membranes internes et externes des spirochètes sont similaires à celles des autres espèces bactériennes (**Figure 3**). A la surface, on note la présence de lipopolysaccharides (LPS), antigènes impliqués dans l'interaction avec l'hôte, seulement chez *Leptospira* – ni *Borrelia* ni *Treponema* n'en possèdent (20). On retrouve également de multiples lipoprotéines au niveau de la membrane externe, qui elles aussi interviennent dans le mécanisme infectieux (21).

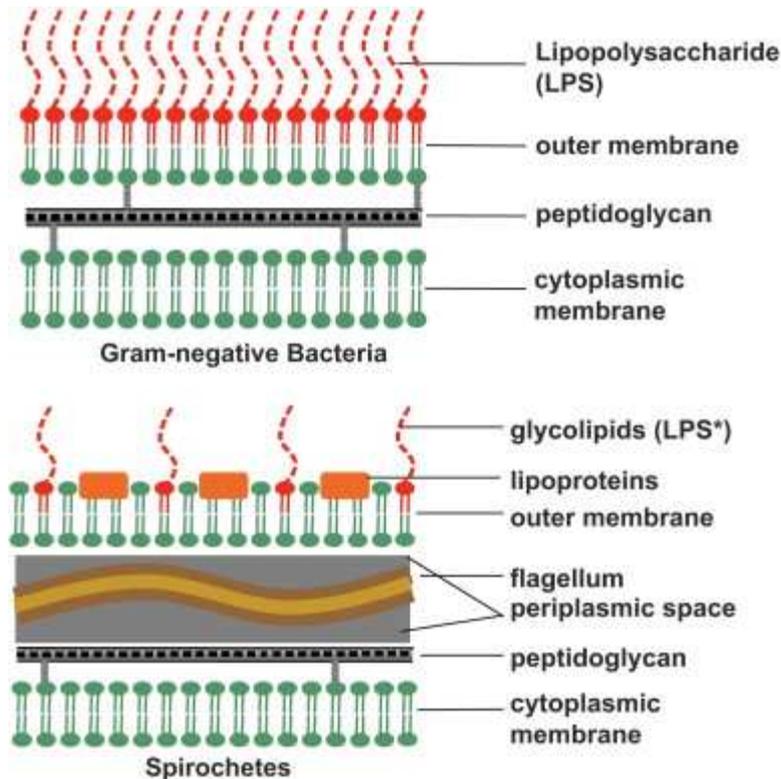


Figure 3 Composition de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif (panneau du haut) et des spirochètes (panneau du bas). L'abondance des lipopolysaccharides (LPS) n'est pas représentative. * = absents chez *Borrelia* et *Treponema*. Figure issue de (21).

Les espèces de leptospires et tréponèmes possèdent également une structure unique à la toute extrémité des pôles cellulaires : le « cap », ou la « coiffe » (**Figure 2**). Il s'agit d'une couche dense aux électrons dont la fonction est encore à ce jour inconnue, mais suspectée d'être impliquée dans l'adhésion aux cellules de l'hôte (22,23).

Finalement, les pôles cellulaires sont équipés de structures associées au chimiotactisme. Le chimiotactisme est crucial pour les bactéries pour orienter leurs déplacements vers un environnement plus riche en nutriments (ou « attractants »), ou fuir des composés toxiques (« repellants »). De ce fait, la localisation de ces structures est conservée chez les espèces bactériennes, qui la situent à proximité des pôles cellulaires, souvent proches des moteurs flagellaires pour pouvoir rapidement modifier les sens de leur rotation (22–24). Ces arrangements moléculaires sont autrement appelés « Methyl-Accepting Chemotaxis Protein arrays » (MCP) (**Figure 2C**). Ils sont composés de protéines-senseurs de la famille Che sous forme de matrice à géométrie hexagonale.

3. Classification phylogénétique des spirochètes

Au début de la taxonomie, les organismes ont été classés sur la base de leurs caractéristiques morphologiques. Finalement, avec l'entrée en jeu des outils d'analyse génomique, les biologistes ont préféré une classification basée sur l'ARN 16S, séquence très peu variable parmi les espèces, permettant donc d'établir des liens fins entre les différents organismes. Ceci a mis largement en doute la précédente classification morphologique, avec quelques exceptions près, dont les spirochètes (25). Effectivement, à part le genre *Sphaerochaeta* dont les représentants ont une forme coccoïde aflagellée, tous les spirochètes sont des bactéries longues et fines, spiralées ou ondulées, et dissimulant un ou plusieurs flagelles au sein du périplasme.

La **Figure 4** représente un arbre phylogénétique des spirochètes basé sur les génomes complets issus de 113 espèces (26,27). Cette classification met en évidence quatre ordres : Brachyspirales, Brevinematales, Leptospirales et les Spirochaetales. Chaque ordre est composé d'une ou plusieurs familles. L'ordre des Spirochaetales, qui est aussi le plus grand, inclut les genres *Treponema* (dont *Treponema pallidum*, agent de la syphilis), *Borrelia* (dont *Borrelia burgdorferi*, causant la maladie de Lyme), *Sphaerochaeta*, *Spirochaeta* et d'autres genres récemment identifiés. Les Brachyspirales sont composés d'une seule famille, les Brachyspiraceae, dans laquelle on retrouve le pathogène intestinal des porcs, *Brachyspira hyodysenteriae*. L'ordre des Brevinematales est composé de deux familles, les Brevinemataceae et Longinemataceae qui ne comportent qu'un représentant chacun identifiés à ce jour. Finalement, l'ordre des Leptospirales contient l'unique famille des Leptospiraceae, dans laquelle sont regroupés les genres *Turneriella*, *Leptonema* et *Leptospira*.

Une particularité notable des spirochètes implique la grande diversité des environnements colonisés par ces bactéries. On peut les considérer comme ubiquitaires – les spirochètes sont répandus à l'échelle mondiale, avec même quelques espèces observées dans des milieux extrêmes, tels que le désert glacé de l'Antarctique, ou des sources thermales en Nouvelle Zélande (28,29). Un grand nombre des espèces représentatives sont saprophytes, demeurant dans les sols et eaux, mais l'on retrouve aussi des espèces commensales anaérobies telles que certaines tréponèmes retrouvées dans les intestins de termites, et des pathogènes à large spectre d'hôtes allant des invertébrés jusqu'aux mammifères, dont l'être humain.

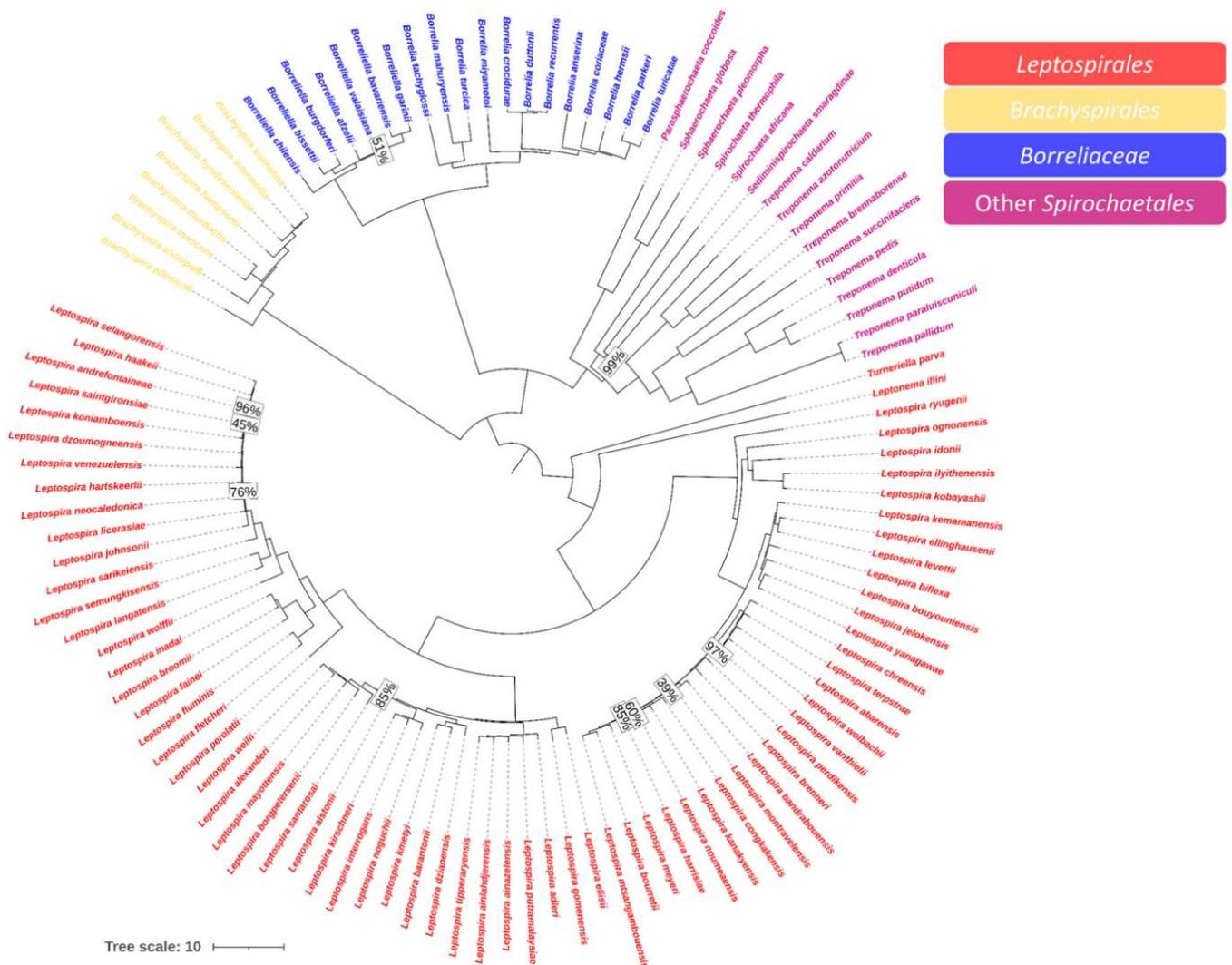


Figure 4 Représentation phylogénétique des relations entre 113 espèces du phylum des Spirochaetes, basé sur leur distance génétique. Les différentes couleurs représentent les familles mentionnées dans la légende de la figure. Figure issue de (27).

4. Identification des agents étiologiques des principales spirochètes

Grâce aux travaux de Louis Pasteur qui réfuta la théorie de la génération spontanée et qui, par extension, démontra que certaines pathologies sont causées par des microorganismes, plusieurs espèces de spirochètes ont pu être reliées à des pathologies impactant l'être humain.

4.1. La syphilis

En 1905, Fritz Richard Schaudinn et Paul Erich Hoffmann ont découvert l'agent causatif de la syphilis par observation d'un échantillon issu d'une lésion vulvaire – ils y ont remarqué la présence d'une bactérie de forme spiralee qu'ils ont nommé *Spirochaeta pallida* et qui sera ultérieurement connue sous le nom de *Treponema pallidum* (30).

La syphilis (ou petite vérole) est une maladie sexuellement transmissible très ancienne, probablement disséminée à l'échelle mondiale lorsque Christophe Colomb revient en Europe de son expédition au Nouveau Monde au XV^{ème} siècle, même si ce scénario reste à être démontré (31). Elle se manifeste dans un premier temps par une lésion cutanée (chancre) au niveau des organes sexuels ou muqueuses – il s'agit du stade primaire de la syphilis. En absence de traitement antibiotique (pénicilline) à cette phase, la maladie se propage dans tout l'organisme et le patient développe la syphilis secondaire avec l'apparition de lésions cutanées sur l'ensemble du corps. Finalement, de manière exceptionnelle, la syphilis peut évoluer jusqu'au stade tertiaire, qui correspond à une atteinte généralisée de l'organisme avec des symptômes neurologiques, cardiaques et articulaires.

En 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 7,1 millions de cas d'infections par *Treponema pallidum* dans le monde (32). Récemment, on constate une recrudescence des cas de syphilis et autres maladies sexuellement transmissibles (33), notamment dans les pays industrialisés – plusieurs facteurs entrent en jeu, comme un changement du comportement sexuel ou encore la baisse de l'application des mesures préventives.

4.2. La maladie de Lyme

Dans les années 1970, Allen C. Steere et ses collaborateurs ont constaté une épidémie d'arthrite chez des enfants et adultes du comté de Lyme (Connecticut, Etats-Unis) (34). La maladie, par conséquent nommée « maladie de Lyme » au vu de la situation géographique de son apparition, se manifeste par une atteinte inflammatoire des articulations de manière récurrente et chronique, précédée par une éruption cutanée évolutive, *erythema chronicum migrans*. Cependant, l'agent étiologique n'a pu être identifié qu'en 1982 par William Burgdorfer, qui a fait le lien entre la maladie de Lyme et la morsure par des tiques du genre *Ixodes*. Il a avancé l'hypothèse que la maladie de Lyme était issue d'un agent infectieux transmis par les tiques – afin de la tester, il a observé sous microscope des broyats de tiques, qui ont mis en évidence la présence de spirochètes, prouvant aussi leur infectiosité en contaminant des lapins avec des tiques porteuses de la bactérie (35). La bactérie a reçu le nom de *Borrelia burgdorferi* en l'honneur de son découvreur.

Aujourd'hui, la maladie de Lyme est l'infection transmise par tiques la plus prévalente en Europe et aux Etats-Unis, avec plus de 200 000 cas par an en Europe de l'Ouest et environ

500 000 cas décomptés annuellement aux Etats-Unis (36). Si la maladie est traitée dès l'apparition de l'éruption cutanée concentrique (généralement 3 à 30 jours après la morsure de la tique infectée), le pronostic est très positif et la bactérie est rapidement éliminée de l'organisme. Cependant, une infection par *B. burgdorferi* non traitée mène à des atteintes articulaires et neurologiques sévères plusieurs années après l'infection initiale.

4.3. La leptospirose

La leptospirose a été décrite pour la première fois en 1886 par Adolf Weil, prêtant son nom à la forme la plus sévère, caractérisée par de fortes fièvres, une jaunisse et un œdème de la rate – le syndrome de Weil (37). Cependant, une maladie avec des symptômes similaires a été mentionnée de nombreuses fois dans divers pays comme « la fièvre du fermier » et autres variations de cette appellation, antérieurement à la description de Adolf Weil – ceci indique que la leptospirose est une maladie ancienne, transmise dans le monde entier lors des mouvements de population. En 1915, deux chercheurs japonais, Inada et Ido, ont infecté des cobayes avec le sang d'un patient atteint du syndrome de Weil et ont observé les mêmes symptômes chez l'animal. Ils ont ensuite disséqué le foie du cobaye infecté et ont noté la présence de spirochètes, qu'ils ont appelé *Spirochaeta icterohaemorrhagica* (38). En 1918, Hideyo Noguchi estime que cette bactérie porte des caractéristiques morphologiques suffisamment différentes des autres spirochètes pour la considérer comme un nouveau genre, qu'il nomma *Leptospira* (39).

4.4. Autres spirochètoses

Bien que les trois maladies décrites ci-dessus sont les spirochètoses les mieux connues, d'autres membres du phylum des Spirochaetes sont à l'origine de pathologies humaines ou animales. *Brachyspira hyodysenteriae* et *Brachyspira pilosicoli* par exemple, sont les agents causatifs de la dysenterie porcine. Cette bactérie anaérobie colonise le caecum et le côlon des porcs et déclenche des diarrhées mucohéorragiques chez l'animal, après contamination par ingestion de matières fécales (40).

Dans le genre *Borrelia*, on retrouve également plusieurs espèces qui sont à l'origine de la maladie appelée « Fièvre récurrente », dont *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrentis* ou encore *Borrelia miyamotoi* (41). Comme le nom l'indique, la maladie se manifeste par une alternance d'épisodes de fièvres et myalgies qui durent environ 3 jours, suivis d'une semaine sans

symptômes. De la même manière que la maladie de Lyme, la transmission se fait par morsure par des tiques, mais peut aussi être transmise par des poux dans le cas de l'espèce *B. recurrentis*.

Treponema denticola est un pathogène oral responsable de parodontites (42). Ce spirochète colonise la cavité orale et s'attaque aux gencives, provoquant une inflammation qui peut évoluer jusqu'à la régression des gencives et entraîner la perte de dents. De plus, avec d'autres pathogènes oraux, on suspecte un éventuel rôle de *T. denticola* dans la maladie d'Alzheimer, mais cette hypothèse reste à prouver (43,44).

5. Focus sur le genre *Leptospira*

5.1. Diversité des espèces

5.1.1. Classification sérologique

La classification sérologique était la première méthode utilisée pour regrouper et identifier les espèces de leptospires en se basant sur la composition des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane. Pour déterminer à quel sérovar appartient la souche d'intérêt, on procède au test d'agglutinations croisées (CAAT – cross agglutinin absorption test) (45,46). Brièvement, cette méthode repose sur l'agglutination des bactéries en présence d'antisérums qui contiennent des anticorps monoclonaux ciblant le LPS de surface spécifique à chaque sérovar connu. Dans ce cas précis, on compare une souche de référence avec la souche que l'on souhaite typer – si les deux souches agglutinent en présence de plus de 90% d'antisérums en commun, on peut considérer qu'elles appartiennent au même sérovar. Aujourd'hui, plus de 300 sérovars ont été identifiés (47). Les sérovars présentant un LPS de surface antigénétiquement proche qui permet de les regrouper en sérogroupe: pour les espèces pathogènes, on compte 24 sérogroupe (Tableau 1) (48). Cette classification en sérogroupe n'a pas de valeur taxonomique mais épidémiologique, permettant de suivre les souches pathogènes en circulation. Il faut toutefois noter que cette classification n'a pas de parallèle avec la classification génomique : un même sérovar peut se retrouver dans plusieurs espèces (Tableau 1). En effet, il semble qu'il puisse y avoir transfert horizontal entre espèces du locus génétique *rfb*, responsable de la synthèse de l'antigène O du LPS, mais le mécanisme de mobilité de ce locus *rfb* n'est pas encore clairement identifié (49–52). Comme le LPS est un élément immunogène, on remarque un parallèle entre le sérovar et l'hôte : un sérovar est souvent lié ou adapté à une espèce animale de « maintenance » (le sérovar Canicola chez les chiens, le sérovar Sejroe chez le bétail, par exemple) , et engendre une infection chez une autre espèce d'hôte de type « accidentel » (53).

Sérogroupe	Espèces
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. noguchi</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirshneri</i>
Celledoni	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weilii</i>
Cynopteri	<i>L. kirshneri</i> , <i>L. santarosai</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. noguchi</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. santarosai</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. weilii</i>
Javanica	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchi</i>
Manhao	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. weilii</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. mayottensis</i>
Panama	<i>L. noguchi</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirshneri</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. alstonii</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Shermani	<i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i>
Tarassovi	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. kmetyi</i>

Tableau 1 Classification sérotypique des souches pathogènes des leptospires. Adapté de (48)

5.1.2. Classification génomique

Après une classification basée sur l'ARNr 16S et les techniques d'hybridation ADN/ADN, la classification bactérienne se réalise maintenant sur la base des génomes séquencés (25,54–56). Les bactéries du genre *Leptospira* sont ubiquitaires, retrouvées dans les sols et eaux de l'environnement, mais aussi dans des réservoirs animaux, majoritairement des mammifères. Cette diversité de milieux de vie est reflétée par la présence de quatre clades distincts dans la classification phylogénétique des espèces du genre *Leptospira* (**Figure 5**). Effectivement, les 68 espèces identifiées à ce jour peuvent être divisées en espèces saprophytes S1 et S2, non pathogènes et retrouvées exclusivement dans l'environnement, puis deux clades d'espèces pathogènes, P1 – isolé à partir de patients ou animaux et qui inclut *Leptospira interrogans*, l'agent le plus fréquemment identifié dans les cas de leptospirose – et P2, qui

comprend des espèces à faible virulence isolées en grande majorité à partir de l'environnement (27). Récemment, il a été proposé de diviser les groupes de pathogènes P1 eux-mêmes en deux sous-groupes : P1⁺ à forte virulence ou P1⁻ à faible virulence (**Figure 5**). En effet, les 8 espèces dans le sous-groupe P1⁺ sont les seules qui engendrent des cas sévères de leptospirose chez l'humain ou l'animal, tandis que celles présentes dans le groupe P1⁻ ne sont pas capables de provoquer la maladie ou de coloniser les modèles animaux, et ont été isolées à partir de l'environnement mis à part *L. alstonii*, récupérée chez un amphibien, et *L. tipperaryensis* isolée à partir de musaraignes (56).

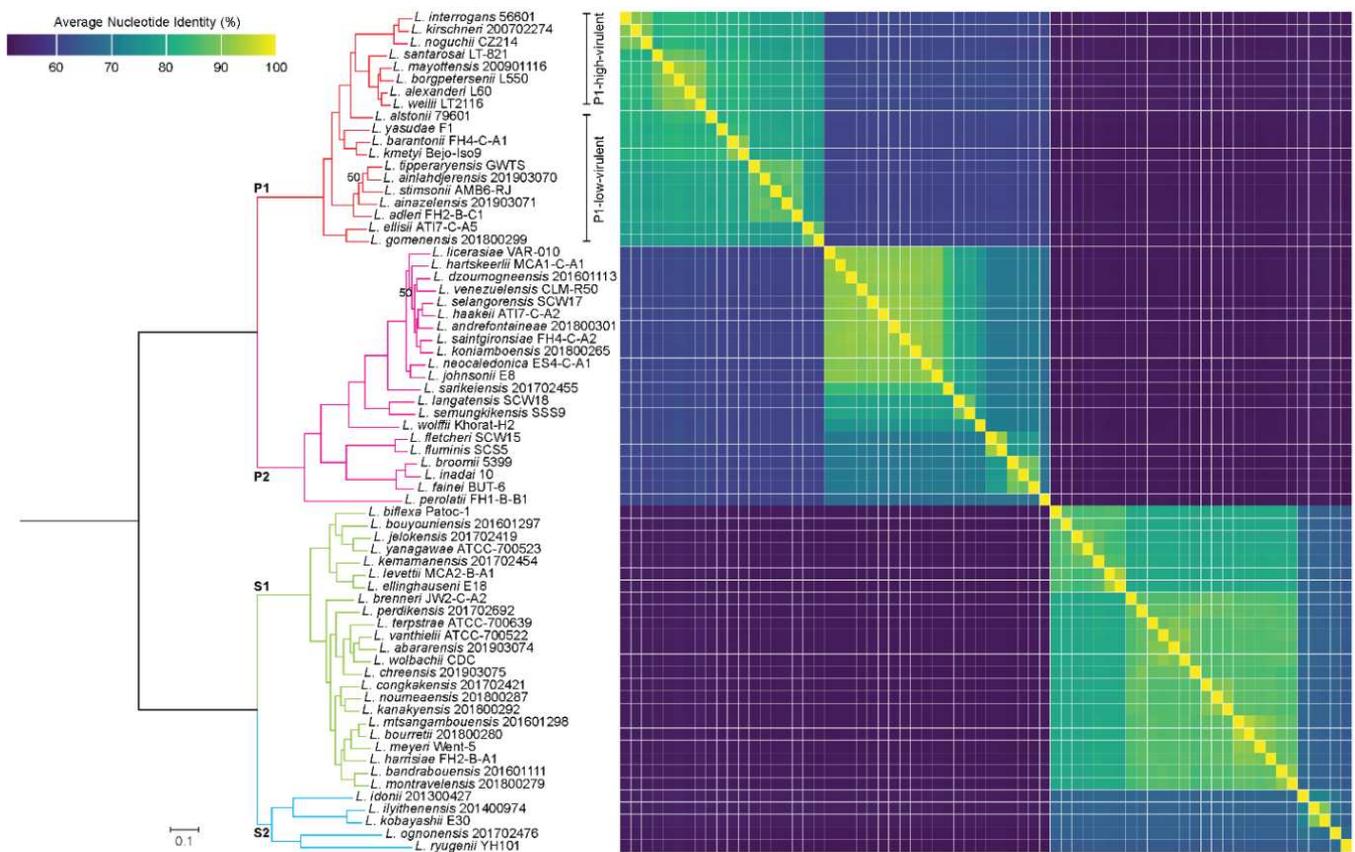


Figure 5 Arbre phylogénétique des espèces du genre *Leptospira*. Sont représentées les 68 espèces du genre *Leptospira* identifiées à ce jour. Le diagramme du côté droit représente le pourcentage d'identité moyen des nucléotides entre les espèces par une échelle de couleur. Cette figure est issue de l'article (27).

5.2. La leptospirose et le syndrome de Weil

5.2.1. Signes cliniques et cycle infectieux

La leptospirose est une maladie zoonotique – ceci signifie qu'elle est capable d'infecter des hôtes animaux et humains. Parmi eux, nous distinguons deux types d'hôtes : les hôtes

sensibles et les porteurs asymptomatiques (ou réservoirs). Les porteurs asymptomatiques ne présentent aucun signe clinique de la maladie et sont colonisés de manière chronique par les leptospires. Les principaux réservoirs de la bactérie sont les mammifères, tels que les rats, qui disséminent les leptospires dans l'environnement par leurs urines. Les précipitations lavent les sols et permettent aux leptospires de rejoindre les étendues d'eaux à proximité, où elles peuvent survivre pendant de longues périodes (**Figure 6**).

La bactérie pénètre dans le corps par les muqueuses ou lésions cutanées, puis se dissémine dans l'organisme via le système sanguin jusqu'aux organes cibles qui sont le foie et les reins. Les symptômes surviennent après une période d'incubation de 2 à 20 jours après infection (57). Un épisode aigu de la leptospirose chez un hôte sensible s'apparente fortement au syndrome grippal (fièvre, douleurs musculaires et articulaires) – ceci rend le diagnostic particulièrement difficile, surtout que dans les cas bénins, la maladie se dissipe d'elle-même après environ cinq jours. Cependant, la forme sévère – appelée le syndrome de Weil – se manifeste par des signes plus caractéristiques : une atteinte du foie, des ictères (jaunisse), une uvéite, un déficit de la fonction rénale, et dans les cas les plus graves on démontre aussi des atteintes cardiaques et hémorragies pulmonaires. Cette maladie est aussi d'une grande importance d'un point de vue vétérinaire : parmi les hôtes sensibles on compte également les animaux domestiques et d'élevage tels que les bovidés (vache, mouton, chèvre) ou les canidés (chien), qui en plus des symptômes décrits ci-dessus présentent un risque accru d'avortement spontané lié à la maladie (58).

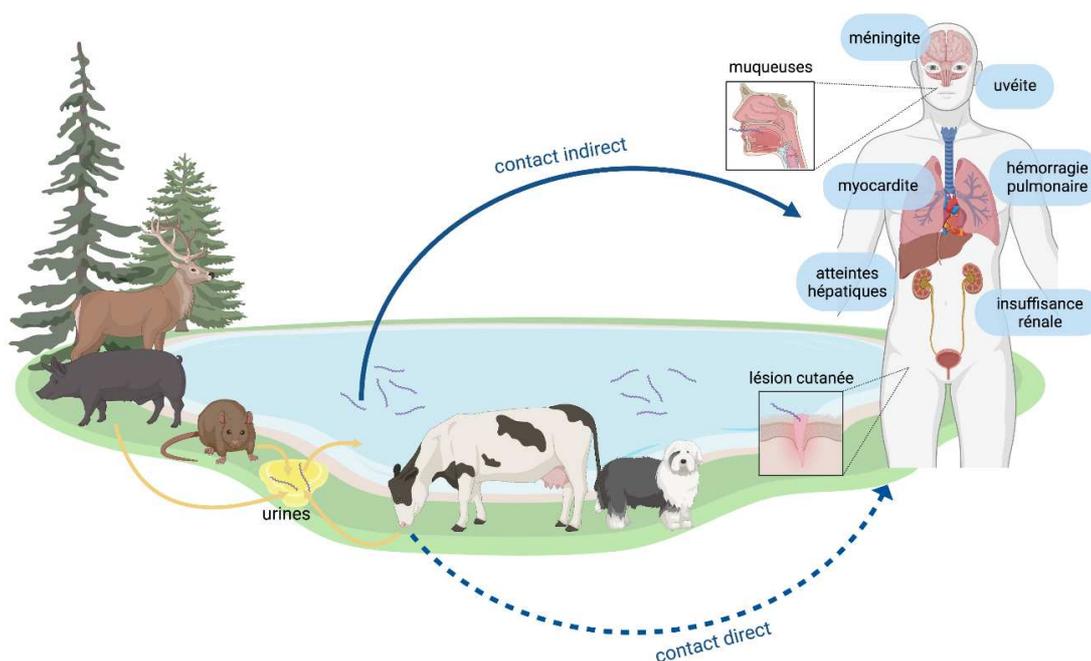


Figure 6 Cycle zoonotique de la leptospirose et symptômes cliniques chez l’être humain. Créé avec BioRender.

Bien que des contaminations directes entre un hôte porteur de la bactérie et un hôte sain ont été identifiées, la contamination indirecte par contact de la peau lésée ou les muqueuses avec l’environnement souillé reste la voie d’infection principale.

5.2.2. Prévalence mondiale

Il est difficile d’estimer l’ampleur de la prévalence de la leptospirose pour plusieurs raisons : étant donné ses symptômes non spécifiques en phase aiguë, elle est souvent confondue avec d’autres maladies engendrant des fièvres telles que la grippe, la dengue ou le paludisme. De plus, le diagnostic en laboratoire reste compliqué comme ceci est discuté dans le chapitre « diagnostic biologique » et effectué seulement par quelques laboratoires de référence. Récemment, plusieurs initiatives ont été encouragées afin de dénoncer le statut sous-diagnostiqué de la leptospirose, en particulier dans les zones tropicales (59). D’autre part, il s’agit d’une maladie négligée, qui ne bénéficie pas de la déclaration obligatoire. Les dernières estimations de cas au niveau mondial datent de 2015, qui dénombrent plus d’un million de cas par an, avec environ 10% de mortalité (60). En France, le nombre d’infections annuel s’élève à 1 cas pour 100 000 habitants, identifiées lors de la période estivale en métropole (**Figure 7-A**). En Outre-mer, l’incidence peut être jusqu’à cent fois plus élevée (**Figure 7-B**) (61).

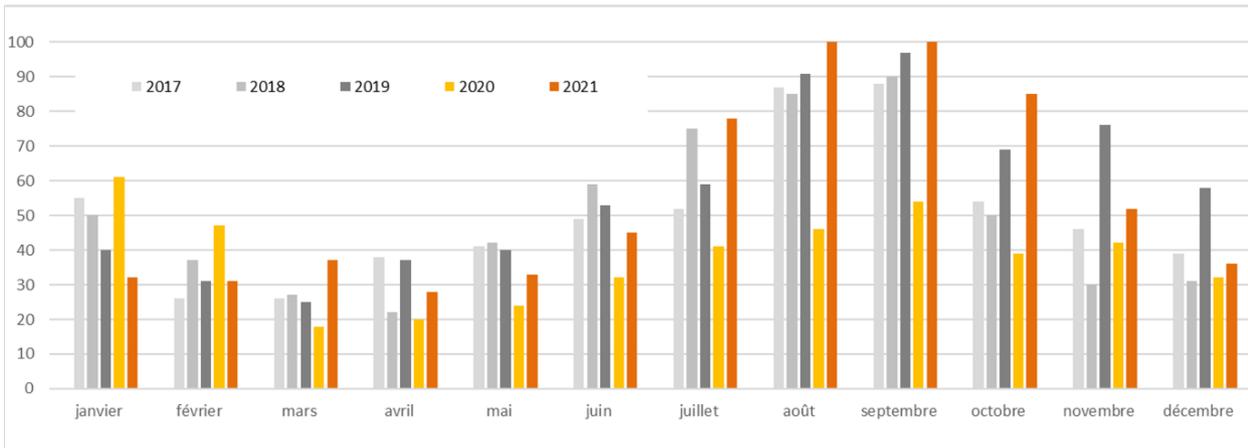
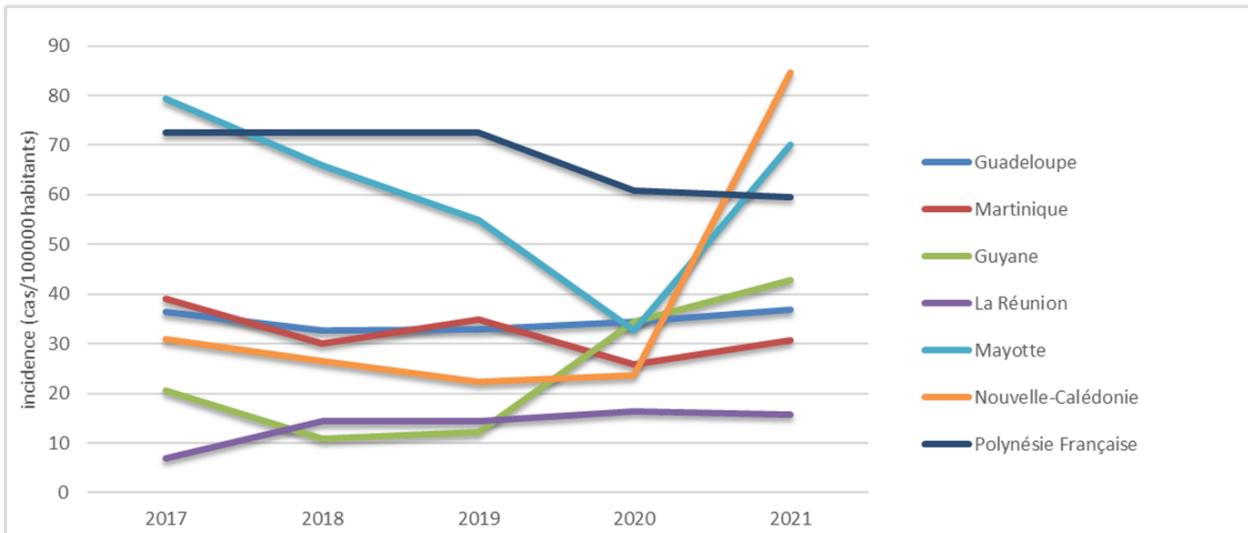
A**B**

Figure 7 Données épidémiologiques issues du rapport annuel d’activité du CNR (Centre National de Référence) de la leptospirose en 2022. **(A)** Répartition du nombre de cas en France métropolitaine selon les mois de l’année entre 2017 et 2021. **(B)** Incidence de la leptospirose (cas par 100 000 habitants) en Outre-mer entre 2017 et 2021.

Des cas de leptospirose ont été identifiés sur tous les continents à part l’Antarctique. Cela dit, les zones à climat tropical avec des précipitations intenses et fréquentes représentent une grande partie des cas recensés (**Figure 8**) (62,63). La leptospirose circule de manière soutenue aux endroits où les normes d’hygiène ne sont – ni ne peuvent être – respectées. En effet, les conditions de vie précaires favorisent le risque d’infection par les leptospires, notamment l’habitation en bidonvilles ou favelas (**Figure 9**), où les rats et autres rongeurs porteurs de la maladie prolifèrent aisément (64–66).

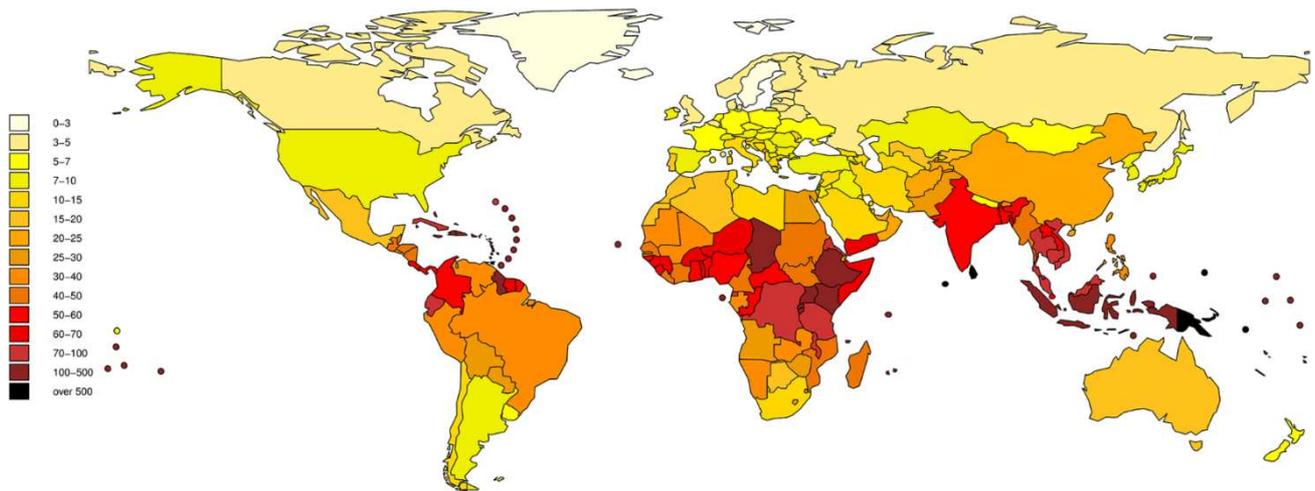


Figure 8 Incidence de la leptospirose au niveau mondial. Figure issue de (63).

Cependant, les conséquences liées au réchauffement climatique, telles que l'augmentation de l'intensité et de la fréquence des précipitations, participent de manière non négligeable à la hausse de l'incidence de la maladie et à sa dissémination dans des zones jusqu'alors peu impactées (67). Parmi les autres facteurs de risque liés à la leptospirose on compte certains secteurs de l'emploi, comme l'agriculture, la santé animale ou encore l'entretien des voies de canalisation. Ces métiers, culturellement plutôt masculins, participent aux statistiques qui démontrent que 80% des cas de leptospirose sont identifiés chez les hommes, contre 20% chez les femmes (68). Finalement, on observe également des épidémies de leptospirose en lien avec les sports en milieu aquatique, tels que le canoë ou le kayak (69,70).

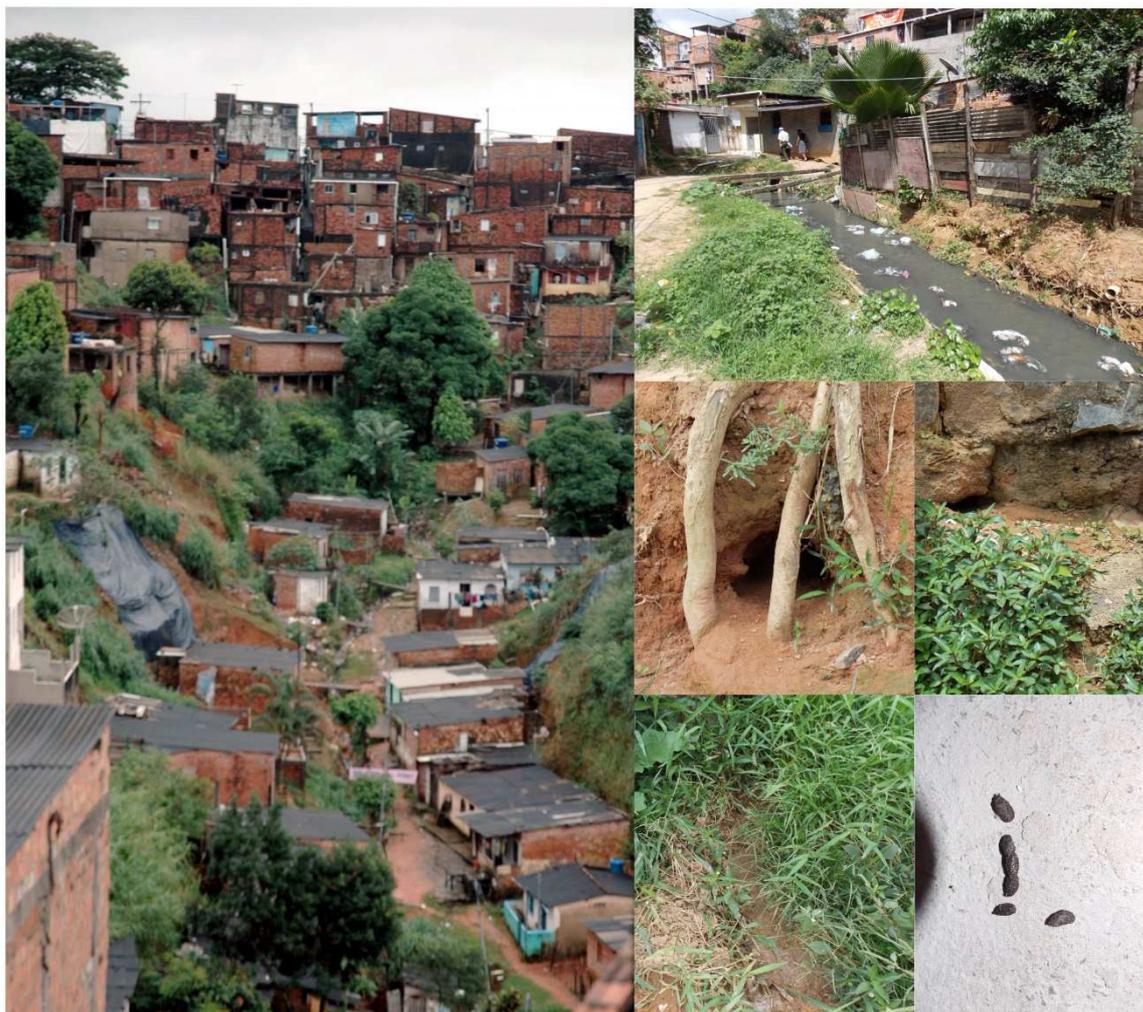


Figure 9 Clichés d’habitations en favelas au Brésil. A droite sont représentés des situations à risque, comme un cours d’eau souillé, ainsi que plusieurs terriers de rats et leurs excréments. Photos issues de (66).

5.2.3. Diagnostic biologique

Le diagnostic de la leptospirose, comme mentionné précédemment, est un défi en soi. Le diagnostic différentiel avec d’autres pathologies infectieuses, particulièrement en zone tropicale, est essentiel pour l’instauration rapide d’une antibiothérapie. La confirmation biologique de la leptospirose repose sur plusieurs méthodes. La première méthode de diagnostic consistait à la mise en culture d’un prélèvement du patient (sang ou urines) dans le milieu spécifique aux leptospires, l’EMJH (Ellinghausen et McCullough, modifié par Johnson et Harris), puis la surveillance de cette culture par microscopie à fond noir, et ce pendant une durée qui pouvait s’étendre à 14 semaines. Il va de soi que cette méthode n’est d’une part ni la plus rapide, ni la plus sensible, car certaines espèces pathogènes sont difficilement cultivables et la détection de spirochètes dans l’échantillon de culture dépend fortement de l’expérimentateur.

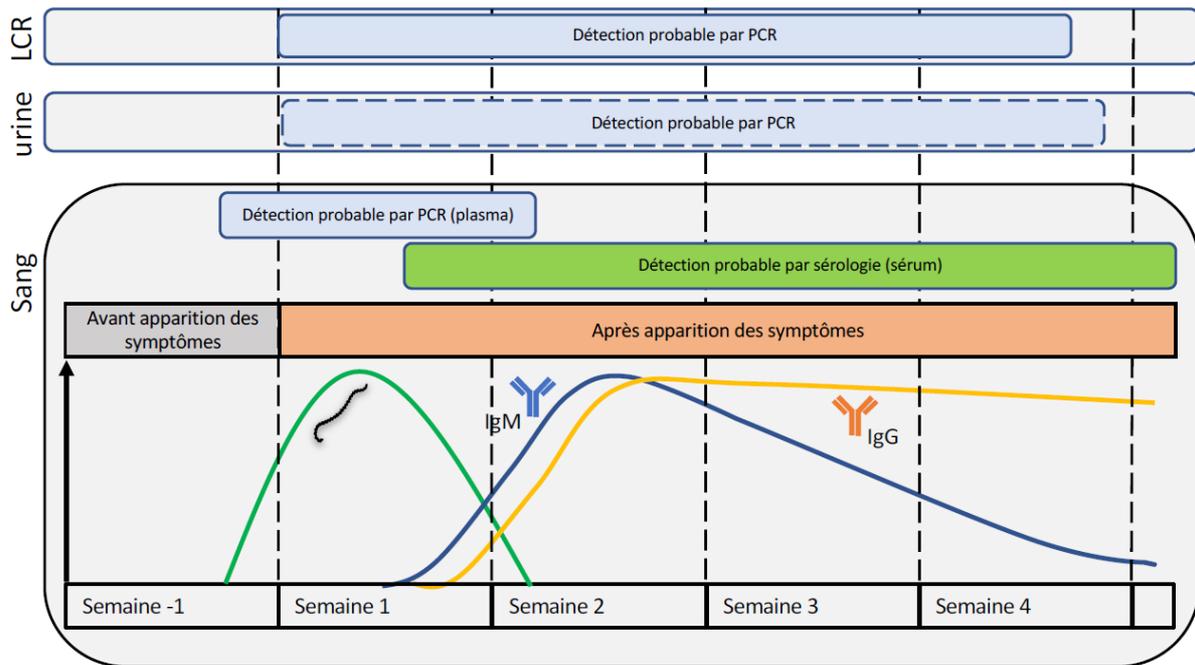


Figure 10 Représentation schématique des méthodes de diagnostic utilisées selon la phase de la maladie. LCR = liquide céphalo-rachidien. Figure adaptée de (71).

Avec le développement des techniques d'analyses en biologie moléculaire, en particulier la méthode d'amplification de l'ADN par réaction en chaîne par polymérase (PCR), il est devenu plus simple de diagnostiquer un cas de leptospirose dans les premiers jours suivant l'apparition des symptômes (**Figure 10**). Les leptospires circulent dans le sang pendant 5 à 8 jours après infection, avant de rejoindre leurs organes cibles tels que le foie ou les reins et ne sont ensuite plus détectables dans le sang lors de la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte (71). Ceci permet de les détecter de manière indirecte par amplification de leur ADN. Dans les centres de référence sont réalisées des PCR à temps réel qui permettent également de quantifier la charge bactérienne et, par séquençage des amplicons obtenus dans le cas d'un échantillon positif, identifier l'espèce à l'origine de la maladie (57). Le diagnostic par PCR est également possible au-delà des 8 jours après le début des signes cliniques, mais il sera réalisé sur des prélèvements du liquide céphalo-rachidien ou d'urines (**Figure 10**).

A partir de la seconde semaine après l'apparition des symptômes, on va rechercher des anticorps spécifiques contre les leptospires par des méthodes de détection sérologiques : d'une part, le test ELISA qui détecte les IgM spécifiques, et d'autre part, le MAT (Microscopic Agglutination Test). Le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) est une technique largement utilisée dans la détection des maladies infectieuses. Le principe consiste à mettre en contact le sérum des patients avec des

antigènes issus d'un broyat de la souche saprophyte *Leptospira biflexa* (qui présente une réactivité croisée conséquente avec les espèces pathogènes), puis la détection par réaction enzymatique de la présence ou non d'anticorps spécifiques dans le sérum du patient.

Finalement, la technique de référence est le test microscopique par agglutination, ou MAT (45,46,72). Ce test a été développé par Martin et Pettit en 1918 – le sérum des patients est mis en contact avec des cultures des souches de leptospires pathogènes les plus prévalentes. Après une courte période d'incubation, ces mélanges sont observés par microscopie à fond noir. Un résultat positif est identifié si la majorité des bactéries s'agglutinent en petits amas – ceci signifie que le sérum du patient possède des anticorps spécifiques à cette souche, qui s'accrochent aux bactéries. Si le résultat est négatif, on observera une culture homogène sans agglutination ou seulement pour une minorité de bactéries. Cette technique est souvent utilisée en aval d'un test ELISA afin de confirmer et d'identifier le sérotype à l'origine de l'infection.

Toutes les méthodes de diagnostic citées ci-dessus, cependant, demandent un équipement de laboratoire et personnel spécialisé souvent coûteux (notamment les appareils à PCR à temps réel), donc qui ne sont pas aisément disponibles dans les pays en voie de développement – pays qui par ailleurs, sont les plus touchés par la leptospirose. Dans l'optique de faciliter le diagnostic de la leptospirose dans ces zones, plusieurs industriels ont développé des tests antigéniques rapides. Parmi eux, on compte le Dip-S-Tick (PanBio InDx, Inc., Baltimore, MD, USA), LeptoTek Dri Dot (bioMérieux), LeptoTek Lateral Flow (Organon Teknika Ltd., Ireland), ou encore Lepto Cuba (Cuban latex test). Malgré les efforts apportés dans le développement de ces tests rapides, ils souffrent encore d'une faible sensibilité, allant de 30 à 90% et d'une spécificité entre 20 et 95%, selon les différents fabricants et suivant les souches circulantes dans chaque pays (73). Il est donc clair qu'une optimisation du rapport entre sensibilité et spécificité des tests demeure nécessaire.

5.2.4. Traitements

Les souches pathogènes des leptospires bénéficient encore d'une grande susceptibilité aux antibiotiques, à l'inverse de la tendance mondiale de l'apparition inquiétante de souches multirésistantes (74). Il faut cependant rester vigilants sur l'utilisation des antibiotiques, surtout en milieu vétérinaire, car récemment des souches d'origine bovine ont présenté une susceptibilité diminuée face à certaines molécules, dont l'amoxicilline (75).

Les formes légères de leptospirose qui se limitent à un syndrome grippal, l'administration d'antibiotiques tels que la doxycycline ou l'azithromycine par voie orale dans les premiers jours après l'apparition des symptômes suffit à traiter la maladie (76,77). Les leptospiroses ayant évolué au stade du syndrome de Weil nécessitent une hospitalisation et les antibiotiques (ampicilline, pénicilline, ceftriaxone ou cefotaxime) sont administrés par voie intraveineuse (78). Bien que la mortalité liée à la leptospirose reste faible (~10%), le traitement peut engendrer des complications semblables à une tempête de cytokines – autrement nommée « réaction de Jarish-Herxheimer », qui est probablement due à une explosion du taux d'antigènes de leptospires libérés dans le sang après la mort de celles-ci à la suite du traitement antibiotique (79,80).

5.2.5. Prophylaxie

La méthode de prophylaxie des maladies infectieuses par excellence est la vaccination : cependant, dans le cas de la leptospirose, les vaccins disponibles à ce jour démontrent des faiblesses non négligeables.

Chez l'humain, un seul vaccin a été produit et distribué commercialement : Spirolept® (laboratoires Imaxio). A l'origine, ce vaccin était destiné aux égoutiers de la ville de Paris, qui font partie des populations à risque, en plus des autres professionnels en contact avec les eaux souillées ou animaux potentiellement contaminés. Il a été développé à l'Institut Pasteur en utilisant la souche inactivée la plus virulente et fréquente, *L. interrogans* sérovar Icterohemorrhagiae. Son spectre de protection très réduit (il ne semble pas protéger contre l'ensemble des sérogroupes) constitue le défaut principal de ce vaccin. De plus, l'immunisation est à renouveler tous les deux ans et l'acte n'est pas remboursé par la sécurité sociale. Cependant, il permet de protéger contre les formes les plus graves dues au sérovar Icterohemorrhagiae.

Au vu de l'importance économique de la leptospirose en milieu vétérinaire, les vaccins animaux disponibles bénéficient d'un spectre de protection un peu plus large, allant de un à 5 sérovares inclus dans le vaccin (81). Ce vaccin est administré particulièrement chez les animaux d'élevage comme les bovins ou les porcins. Un vaccin canin, Versican® L4 (laboratoires Zoetis) est également proposé aux propriétaires de chiens, car la maladie développe des formes graves plus fréquemment chez l'animal. Malheureusement, ces formes vaccinales présentent

un risque accru d'effets secondaires comme l'apparition de fièvres ou inflammations après injection, et la production d'anticorps reste assez faible, donc à renouveler tous les ans (82).

Les vaccins basés sur l'injection de souches inactivées génèrent une réponse immunitaire liée aux antigènes présents en surface des cellules – dans le cas de la leptospirose, les lipopolysaccharides (LPS) extrêmement spécifiques à chaque sérovar, phénomène qui réduit fortement la réactivité croisée entre les différents sérogroupes capables de contaminer l'humain ou l'animal. C'est principalement cet aspect qui est à l'origine des faiblesses des vaccins existants, donc des efforts sont en cours pour développer des vaccins à spectre plus large, mais il est très difficile de trouver un antigène commun aux plus de 200 sérovares identifiés à ce jour (83). La méthode de vaccinologie inverse, qui consiste à analyser en profondeur les génomes bactériens à la recherche d'antigènes potentiels pourrait servir de crible intéressant (84). Parmi les options envisageables il y a les vaccins à ADN, ou basés sur des protéines recombinantes telles que des exotoxines sécrétées par les leptospires (85), mais dans ces cas le défi se situe aussi dans le choix des adjuvants pour permettre une réponse immunitaire optimale (86).

A défaut d'avoir une solution vaccinale fiable, la prévention et la sensibilisation des populations à risque reste un moyen non négligeable pour diminuer l'impact de la leptospirose. De nos jours, la mesure de prévention la plus efficace est le port d'équipements de protection individuelles (gants, bottes, lunettes) chez les personnes à risque. Ensuite, une amélioration des conditions de vie des pays en voie de développement, en particulier les mesures d'hygiène et le traitement des eaux usées, permettraient une nette diminution des cas de leptospirose détectés (57). Certaines mesures de prévention face à un risque accru de crues ou inondations en surveillant les conditions météorologiques sont également envisageables (87).

5.3. Facteurs de virulence

5.3.1. Définition

La définition d'un facteur de virulence est plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, les facteurs de virulence englobent toute substance produite et/ou excrétée par la bactérie afin de faciliter l'infection chez l'hôte, que ce soit par franchissement des barrières, dissémination dans l'organisme ou échappement au système immunitaire (88). Ces « substances » peuvent correspondre à des protéines, des produits métaboliques, des récepteurs membranaires, mais aussi des structures entières comme le flagelle. Les facteurs sont classés en catégories selon

leur mécanisme d'action : les adhésines, les facteurs d'invasion, les facteurs d'évasion au système immunitaire, les exotoxines ou encore les endotoxines. La **Figure 11** représente les différents éléments bactériens qui participent à la virulence et leur grande diversité. Les facteurs de virulence peuvent être directement encodés dans le génome, ou être présents sur des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides de virulence ou certains bactériophages, permettant ainsi leur transfert horizontal entre bactéries.

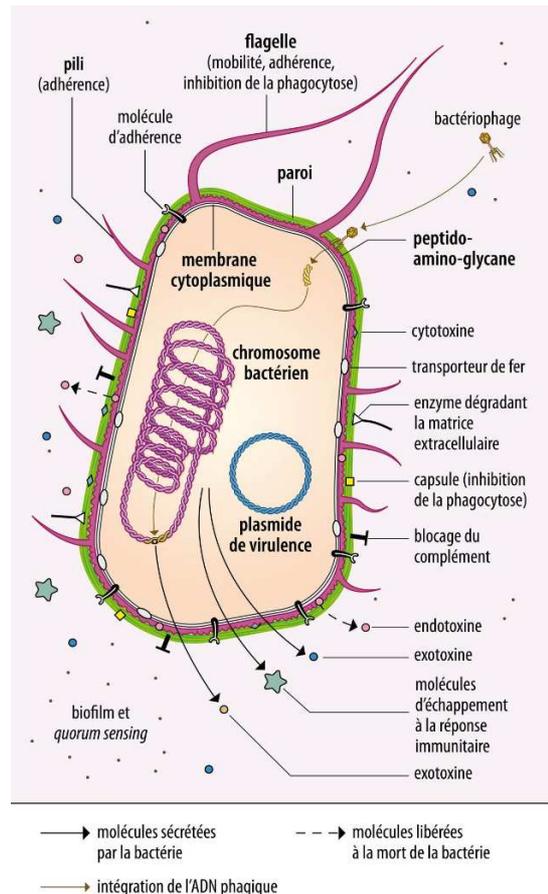


Figure 11 Principales catégories de facteurs de virulence chez les bactéries. Figure issue de (88).

Chez le genre *Leptospira*, certains facteurs de virulence ont pu être déterminés par analyse génomique en identifiant les gènes présents uniquement chez les espèces pathogènes (clades P1 et P2) (56). Cependant, ceci n'est pas une règle sans faille, car plusieurs gènes identifiés comme facteurs de virulence chez d'autres espèces bactériennes sont également présents chez les espèces saprophytes (**Figure 12-A**). Très récemment, Lai et ses collaborateurs ont mis en place un crible à haut-débit de facteurs de virulence putatifs en exprimant de façon hétérologue des gènes de leptospires pathogènes à fonction inconnue dans le modèle eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* et en évaluant leur impact sur la croissance et l'intégrité des levures (89). Cependant, pour confirmer le pouvoir pathogène des nouveaux facteurs identifiés par cette

technique, il est nécessaire de passer par le modèle animal. De ce fait, le meilleur moyen de déterminer sans équivoque l'implication d'un gène dans la virulence reste de tester la capacité d'un mutant de ce gène à provoquer la maladie ou à coloniser l'animal (**Figure 12-B**) (90).

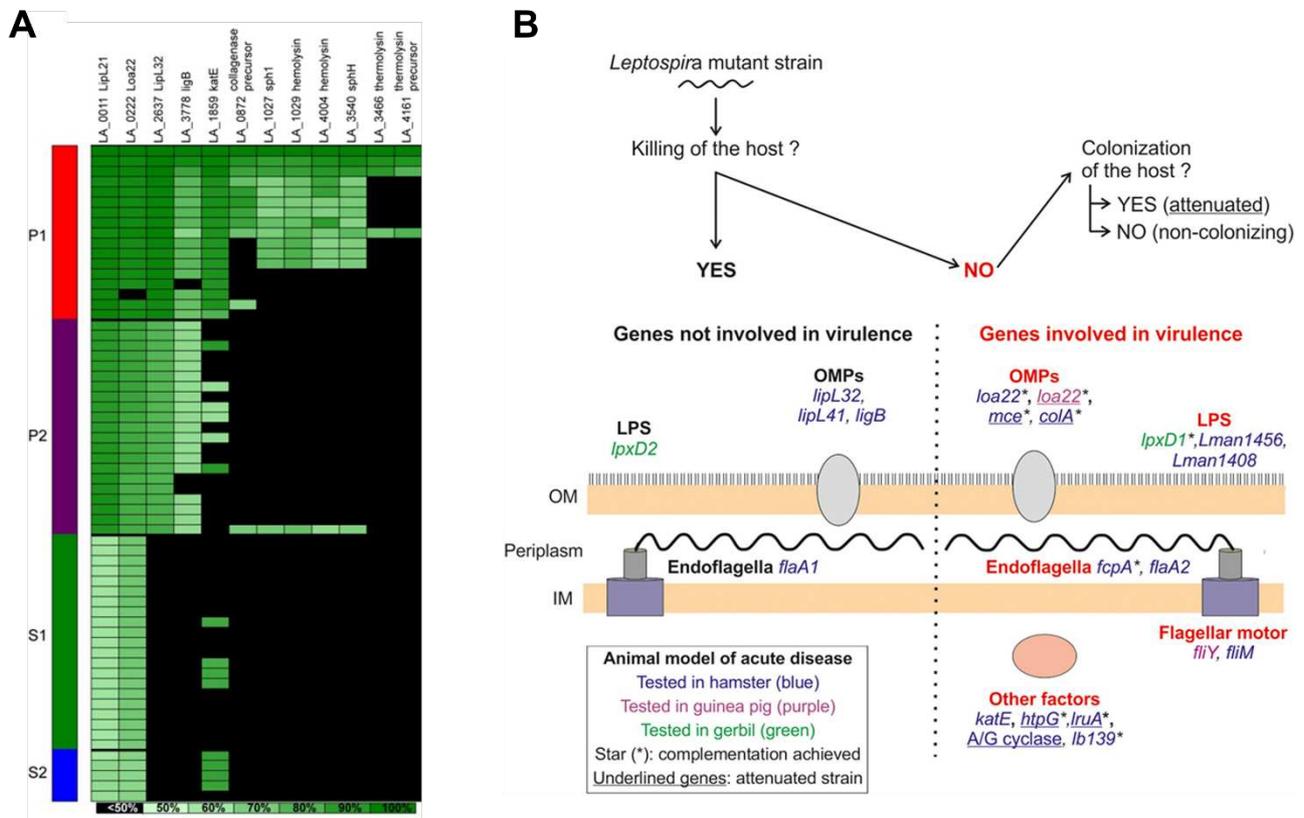


Figure 12 Quelques exemples de facteurs de virulence identifiés chez les leptospires (**A**) et leur présence/absence et pourcentage d'identité à travers les espèces. *L. interrogans* est utilisée en tant que référence. P1, P2 = espèces pathogènes ; S1, S2 = espèces saprophytes (**B**) Schéma récapitulatif des gènes de leptospires testés expérimentalement vis-à-vis de leur implication dans la virulence. Figure adaptée de (56,90).

Dans le contexte de recherches en laboratoire, cinq modèles animaux sont les plus utilisés : le cobaye, le hamster, la gerbille, la souris et le rat (**Figure 13**) (90,91). Le cobaye, le hamster et la gerbille constituent les modèles susceptibles à la maladie, capables de développer une leptospirose aiguë avec des symptômes similaires à l'humain. Le rat et la souris sont utilisés en tant que modèles de leptospirose chronique, idéaux pour étudier la persistance de la bactérie dans l'animal-réservoir. La souris peut aussi développer une leptospirose aiguë, mais seulement dans les cas particulier de doses infectieuses très importantes, ou d'une lignée transgénique devenue sensible à la maladie – particulièrement les souris délétées des gènes TLR2, ou TLR2/TLR4 qui montrent une sensibilité accrue à la leptospirose aiguë (90–92). D'autres modèles animaux ont été utilisés comme le zebrafish (93) ou la larve *Galleria mellonella* (94), mais les résultats restent peu concluants – il est difficile d'établir une infection stable chez le

modèle ichthyen, et l'inoculation par la souche saprophyte *L. biflexa* des larves de *Galleria* entraîne aussi des effets adverses sur leur viabilité.

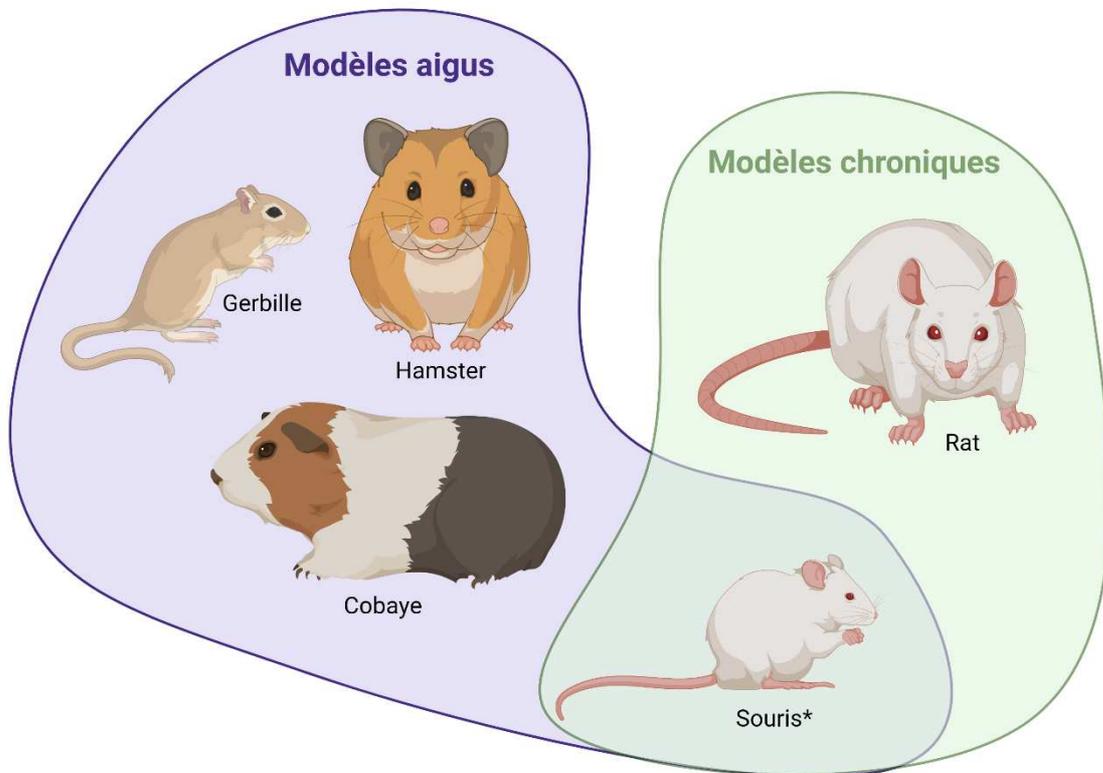


Figure 13 Modèles animaux utilisés en laboratoire pour étudier la leptospirose. *La souris de type sauvage est un hôte non-susceptible, mais peut développer la maladie dans certaines conditions. Figure créée avec BioRender.

5.3.2. Les protéines membranaires et éléments de surface

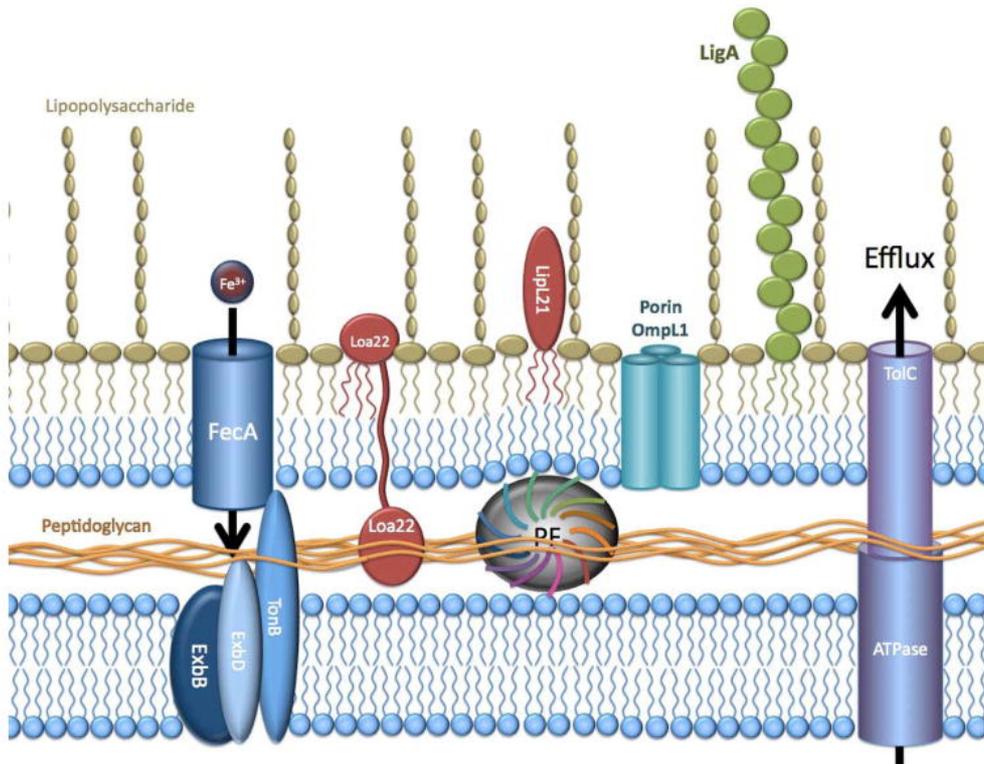


Figure 14 Schéma récapitulatif des différents éléments de surface et protéines membranaires décrits chez *Leptospira*. PF = endoflagelle (« periplasmic flagellum »). Figure issue de (95).

Une partie non négligeable des facteurs de virulence identifiés chez les leptospires sont soit des protéines, soit d'autres éléments présents à la surface de la bactérie. Dans un premier temps, on retrouve les protéines impliquées dans la synthèse du LPS (**Figure 12 et Figure 14**). Un mutant dans le gène codant la protéine LpxD1, dont l'homologue chez d'autres espèces bactériennes participe à la synthèse du lipide A (l'ancrage lipidique du LPS) a perdu sa capacité à établir la maladie chez le hamster et présente une fragilité au niveau de la membrane externe, entraînant une sensibilité accrue aux détergents et à la température physiologique de l'hôte (96). En effet, la modification de la structure du lipide A en fonction de la température a été démontrée chez *Francisella tularensis* (agent causatif de la tularémie), suggérant une adaptation en fonction de l'hôte (mammifère ou invertébré) (97,98). De manière surprenante, la composition du lipide A chez le mutant LpxD1 chez *L. interrogans* n'est que très peu modifiée, suggérant un rôle différent que chez les bactéries citées dans la littérature. La disruption du gène paralogue, LpxD2, n'a par contre pas d'influence sur la virulence ni sur l'intégrité de la bactérie (96). Gerald L. Murray et ses collaborateurs ont identifié deux gènes de fonctions inconnues dans le locus de la biosynthèse du LPS chez *L. interrogans* sérovar Manilae, eux aussi nécessaires à la virulence et à la colonisation de l'hôte (99,100). Le mutant du premier gène,

Lman1456 (correspondant à LIMLP_10610 selon la nouvelle nomenclature), synthétise un LPS tronqué, alors que le mutant du second gène, Lman1408 (LIMLP_10830) synthétise un LPS entier. Cependant, les deux mutants présentent un défaut d'agglutination face aux antigènes spécifiques à leur sérovar. Leur fonction reste encore à être élucidée à ce jour. On pourrait envisager d'utiliser les mutants du LPS dans un vaccin, car ils permettent une protection croisée à un challenge avec plusieurs sérovars (101).

Ensuite, la catégorie des protéines OMP-like (« outer membrane protein ») comprend plusieurs candidats associés à la virulence chez *Leptospira*, notamment Loa22 qui fût le premier facteur de virulence validé expérimentalement par les postulats de Koch (**Figure 14**) (85,102). Cette lipoprotéine de type OmpA possède un effet cytotoxique sur les cellules eucaryotes en augmentant leur production de monoxyde d'azote (NO) et promeut une réaction inflammatoire, signalée notamment par la surexpression du récepteur TLR2 (« toll-like receptor ») chez l'hôte (103). Il a également été démontré que Loa22 se liait au collagène et à la fibronectine (104). Cependant, Loa22 est aussi exprimée chez les espèces saprophytes des leptospires, ce qui indique que son association à la virulence n'est que secondaire et ne constitue pas un facteur de virulence dit « vrai » (**Figure 12-A**). Dans la même famille de protéines membranaires de type OmpA on retrouve Lsa66, qui est fonctionnellement très similaire à Loa22 et se lie aux composants de la matrice extracellulaire, ainsi qu'au plasminogène (105).

Chez *Leptospira*, la protéine Mce (« mammalian cell entry protein ») a été identifiée comme nécessaire à l'adhésion à la matrice extracellulaire, au plasminogène et à la β -intégrine (106) (**Figure 12-B**). Exprimée que chez les espèces pathogènes, il a été démontré que le mutant de délétion de cette protéine diminue fortement la capacité des leptospires à infecter les macrophages. De manière intéressante, lorsque le gène *mce* de *L. interrogans* est introduit en *trans* chez la souche *L. biflexa*, le saprophyte a acquis la capacité d'infecter des cellules eucaryotes, confirmant ainsi le rôle primordial de Mce dans la virulence (107).

Bien que sa localisation membranaire ne soit pas confirmée, la collagénase ColA participe à la dégradation du collagène de l'hôte et permet ainsi aux leptospires de traverser les barrières tissulaires (108) (**Figure 12-B**). Le mutant $\Delta colA$ n'est plus capable de traverser efficacement les monocouches de cellules eucaryotes HEK293 (cellules humaines embryonnaires épithéliales de rein) et HUVEC (cellules endothéliales humaines) et la charge bactérienne

retrouvée dans les organes cibles (rein, foie, poumons) de hamster est fortement diminuée par rapport à la souche sauvage (108).

Les leptospires pathogènes possèdent aussi des protéines membranaires avec des domaines de type immunoglobuline : LigA, LigB et LigC (**Figure 12** et **Figure 14**). Ces domaines présentent des motifs de liaison à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, dont le collagène, la laminine ou encore le fibrinogène (**Figure 15**) (109). LigB n'a pas démontré d'influence sur la virulence chez le hamster lorsque délété (110), mais LigA a été étudiée plus en profondeur d'un point de vue fonctionnel : il a été démontré que cette protéine possède des domaines d'activité nucléase et protéase (111) et module la réponse immunitaire médiée par l'hôte, permettant ainsi aux leptospires de persister dans l'organisme sans être éliminé, notamment en détruisant les NETs (« neutrophil extracellular traps ») (112). Le double mutant LigA/B obtenu par TALE et la technique d'interférence CRISPRi (abolition de l'expression du gène par blocage de la traduction) n'est plus capable de déclencher de leptospirose aigüe chez le hamster, mais le mutant est toujours capable de disséminer dans l'organisme et de s'installer dans les organes cibles (113,114). Lorsque *liga/B* sont introduits en *trans* chez la souche saprophyte *L. biflexa* (qui ne possède pas naturellement ces gènes, voir **Figure 12-A**) on observe un gain de fonctions : le saprophyte est désormais capable d'adhérer aux cellules hôte et de moduler la fixation du complément, se traduisant par une meilleure survie dans le sérum humain (115,116). LigC semble avoir une fonction non-redondante avec LigA et LigB, et n'est présente que chez quelques espèces (109). Sa disruption par insertion de transposon n'a pas eu d'effet sur la virulence, donc sa fonction reste encore à élucider (117).

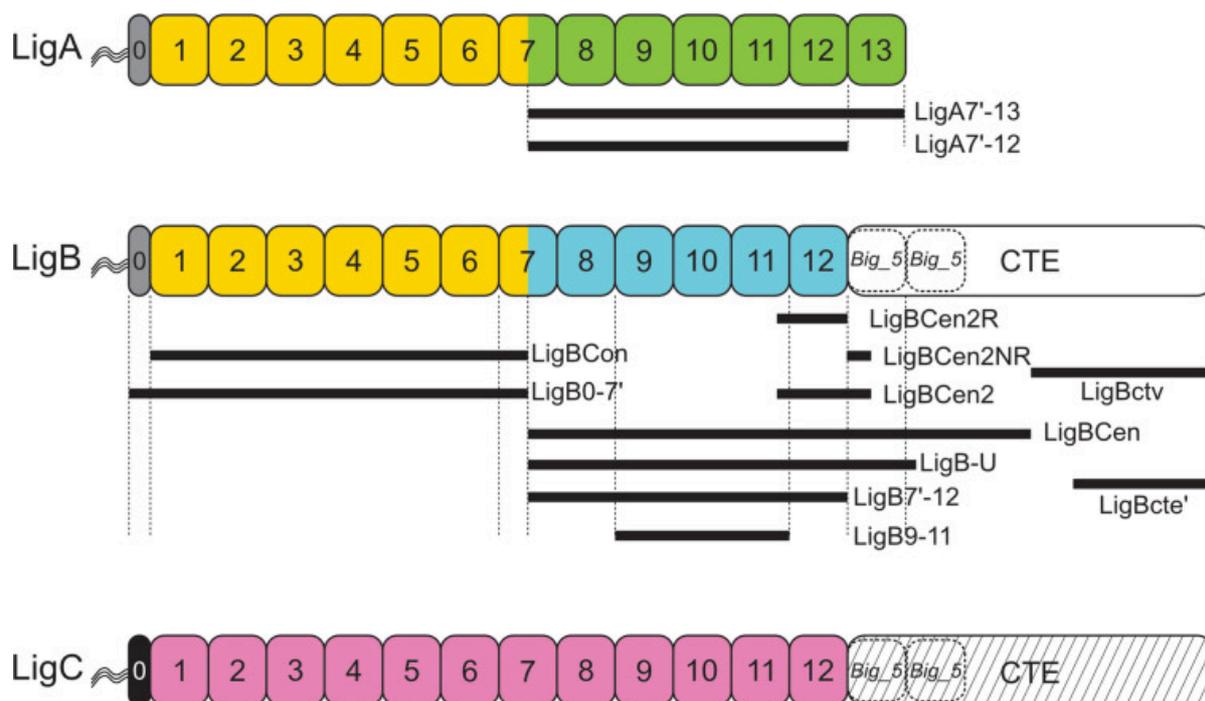


Figure 15 Représentation schématique des domaines de LigA, LigB et LigC de *L. interrogans*, ainsi que la localisation des motifs de liaison aux protéines hôtes pour LigA et LigB. Figure issue de (109).

Les protéines membranaires de type endostatine Len, présentes en 6 paralogues LenA à F chez *L. interrogans*, sont aussi connues pour se lier à la laminine, fibronectine et le régulateur du complément de l'hôte, le facteur H (118). Bien qu'aucun mutant dans un de ces six gènes n'a été étudié (ou obtenu) à ce jour, la production de la protéine recombinante chez *Escherichia coli* a montré un effet cytotoxique ciblant le métabolisme de l'hôte par un mécanisme encore inconnu (119).

De nombreuses lipoprotéines ont été évaluées quant à leur rôle dans l'infection (**Figure 12**). Principalement, les chercheurs se sont intéressés à la protéine de surface majoritaire LipL32, exprimée uniquement chez les espèces pathogènes des groupes P1 et P2 (**Figure 12-A**). Étonnamment, la délétion du gène *lipL32* chez *L. interrogans* n'altère pas la capacité de la bactérie à infecter l'hôte, voire l'accroît dans le cas d'un mutant par interférence CRISPRi (113,120). LipL41, la troisième lipoprotéine majoritaire chez les espèces pathogènes a également été investiguée avec les mêmes résultats que LipL32 – pas d'influence sur la virulence (121). Les deux seules lipoprotéines de leptospires ayant une implication démontrée à ce jour dans la virulence sont LipL21 et LruA (anciennement LipL71). LipL21 est fortement ancrée au peptidoglycane – cette caractéristique permet aux leptospires pathogènes d'échapper à la reconnaissance par les récepteurs NOD1 et 2 (« Nucleotide Oligomerization Domain »).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les mutants délétés de LipL21 sont moins résistants aux hydrolases activées par la reconnaissance du peptidoglycane par les récepteurs NOD, et sont plus rapidement éliminés de l'organisme (122). Le mutant par transposition de LruA chez *L. interrogans* a une virulence atténuée chez le hamster (123). Un taux important d'anticorps IgG et IgA spécifiques de l'hôte contre LruA ont été identifiées dans l'humeur aqueuse de l'œil du cheval dans le cadre d'uvéites récurrentes (124). Par incubation de la protéine recombinante LruA dans du sérum de cobaye, Zhang et ses collaborateurs ont montré que LruA se liait à l'apolipoprotéine mammalienne ApoA-I, suggérant une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte par ce biais (123). La fonction précise de ces lipoprotéines dans le cadre de la pathogénèse (et de manière générale) reste encore un mystère qu'il serait intéressant de décrypter au vu de leur abondance et de leur présence exclusive chez les espèces pathogènes.

5.3.3. Les facteurs de survie et de dissémination dans l'hôte

Plusieurs facteurs sont nécessaires dès le premier contact avec l'hôte. Effectivement, la bactérie doit de prime abord se protéger du système immunitaire de l'hôte dès la pénétration dans l'organisme pour ensuite pouvoir poursuivre le mécanisme infectieux (**Figure 16**) (125). Pour ce faire, les leptospires optent pour plusieurs stratégies : l'adhésion à la matrice extracellulaire et sa dégradation, l'évasion du système immunitaire et du système de complément en utilisant ses propres effecteurs, ainsi qu'en détournant les protéases et séquestrant les régulateurs du complément de l'hôte (126).

Pour échapper à la réponse immunitaire primaire de l'hôte, les leptospires pathogènes se servent de la phospholipase C. Cette enzyme leur permet d'éviter la phagocytose par les macrophages en augmentant le taux de cations libres de calcium (Ca^{2+}) dans ceux-ci, déclenchant l'apoptose cellulaire (127).

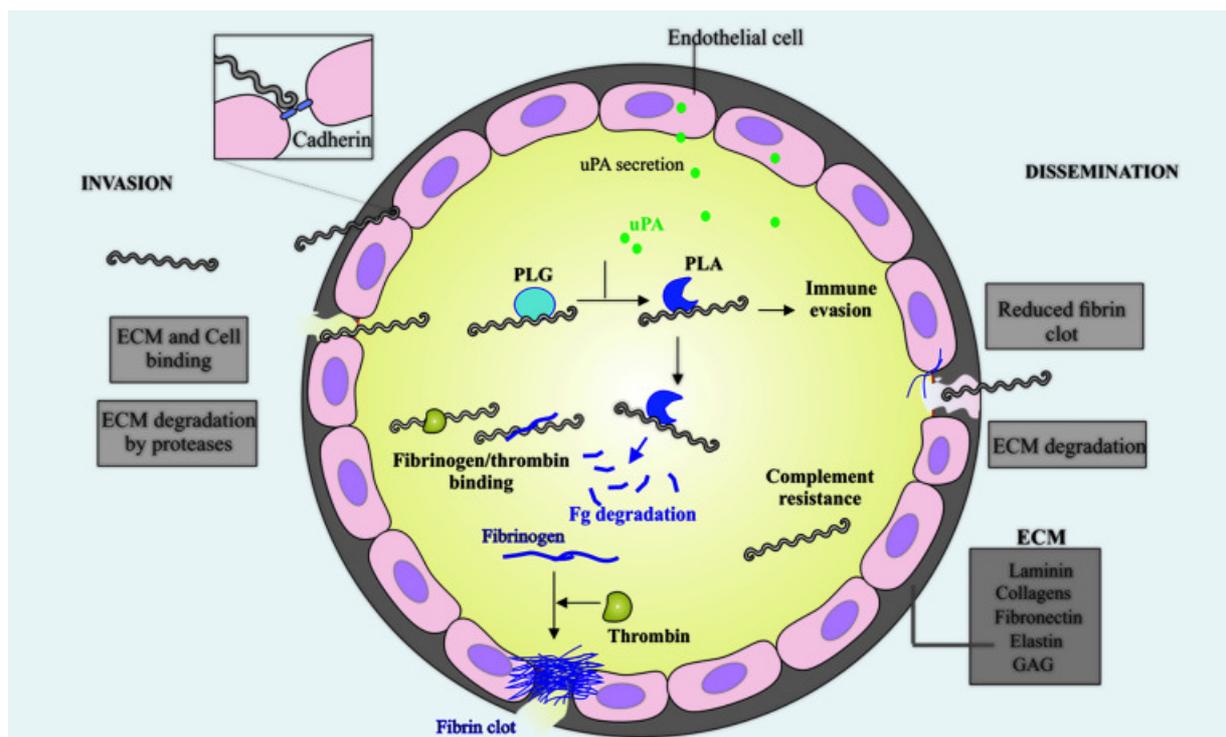


Figure 16 Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des leptospires lors de l'invasion de l'hôte. ECM = matrice extracellulaire ; PLG = plasminogène ; PLA = plasmine ; uPA = activateur de plasminogène de type urokinase ; Fg = fibrinogène ; GAG = glycosaminoglycanes. Figure adaptée de (125).

Contrairement aux entérobactéries pathogènes de l'humain, le lipide A du LPS des leptospires est reconnu par les récepteurs TLR2 au lieu des TLR4 (128,129). Cela permet aux leptospires d'échapper au système immunitaire de l'hôte, plus particulièrement en les protégeant de l'attaque du complément (130). Cependant, on note une différence au niveau de la reconnaissance par les récepteurs toll-like selon l'espèce de l'hôte : chez la souris – qui n'est pas sensible à la maladie et sert uniquement de réservoir – le LPS est aussi reconnu par les TLR4 en plus des TLR2 (131). On peut donc émettre l'hypothèse que cette reconnaissance par le système immunitaire a un lien avec la nature de l'hôte (réservoir ou accidentel) et mériterait plus ample investigation afin de mieux comprendre la pathogénèse de *Leptospira*.

Les leptospires – et les autres spirochètes, globalement – possèdent un autre moyen ingénieux d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire : leurs endoflagelles. Effectivement, la flagelline des autres espèces bactériennes est extrêmement immunogène et reconnue par les récepteurs TLR5 (132,133). En dissimulant leurs flagelles au sein du périplasme, les spirochètes échappent efficacement à cet autre type de reconnaissance, appuyant encore une fois leur impressionnante furtivité face au système immunitaire de l'hôte (134).

De manière indirecte, on peut considérer les composants endoflagellaires comme associés à la virulence, car la motilité permet aux leptospires de disséminer dans l'hôte (**Figure 12-B et Figure 14**). A ce jour, 5 gènes de motilité ont démontré un lien avec la virulence – les mutants n'étaient plus capables de coloniser ni de tuer l'animal. Les protéines identifiées sont celles de la gaine flagellaire FcpA (135) et FlaA2 (136), et celles associées au corps basal FliM (137), FliY (138) et FlhG (139). Le composant majoritaire du cœur du filament chez *L. interrogans*, FlaB1, est également essentiel à la virulence (manuscrit en préparation, discuté dans le chapitre 2 du mémoire). D'après ces données, on peut aisément émettre l'hypothèse que d'autres gènes de motilité sont impliqués dans le mécanisme infectieux.

Une fois dans l'organisme, les leptospires doivent faire face à un environnement hostile, riche en espèces réactives à l'oxygène (ROS). Pour résister au stress oxydatif, les leptospires possèdent plusieurs protéines de détoxification du peroxyde de dihydrogène (H₂O₂) et du superoxyde (O₂⁻) : les régulateurs de stress oxydatif de type Fur, PerRA et PerRB, ou encore la catalase KatE. PerRA et PerRB participent tous les deux à la résistance au stress oxydatif, mais il a été démontré que le mutant PerA résistait mieux au stress lié à la présence de H₂O₂, alors que le mutant PerRB montrait une tolérance augmentée face au superoxyde (140). Ces résultats sont confirmés par l'étude des transcriptomes des deux mutants qui mettent en évidence un profil de régulation unique à chaque PerR (141). Séparément, les mutants $\Delta perRA$ et $\Delta perRB$ ne montrent pas d'atténuation de la virulence, mais le double mutant $\Delta perRA-perRB$ n'est plus capable d'infecter les hamsters, ni de les coloniser (140). KatE, l'unique catalase identifiée chez les leptospires pathogènes (**Figure 12-A**), est aussi impliquée dans la détoxification du peroxyde de dihydrogène et son inactivation inhibe complètement le caractère virulent de la souche pathogène *L. interrogans*, ainsi que sa résistance au stress oxydatif (142). King et ses collaborateurs ont étudié en 2014 l'homologue de la protéine de résistance au choc thermique Hsp90 – la « high temperature protein G », HtpG, dans un contexte infectieux (143). Cette protéine a été décrite comme importante dans la résistance aux chocs thermiques et au stress oxydatif chez d'autres bactéries, mais le mutant $\Delta htpG$ chez *L. interrogans* ne présente pas de défaut de tolérance à ces deux types de stress. Cependant, sa virulence est bien atténuée dans le modèle animal de leptospirose aigüe – son implication précise dans la pathogénèse reste encore à découvrir (143). ClpB, une protéine chaperon à large spectre, est également suspectée d'avoir un rôle dans l'invasion de l'hôte, cependant son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, mais est probablement associée à la dégradation de la matrice extracellulaire et au

plasminogène, comme Mce, ainsi qu'à la résistance au stress oxydatif engendré par la réponse immunitaire de l'hôte (144,145).

Afin de survivre dans l'organisme, les leptospires pathogènes se déchargent de la production de certains nutriments essentiels pour leur croissance, tels que le fer. En effet, les pathogènes possèdent la protéine HemO, essentielle à la virulence et qui permet aux bactéries d'acquérir du fer par la dégradation de l'hème de l'hôte (146). Les leptospires pathogènes sont aussi les seules autotrophes à la cobalamine, ou vitamine B12, que les eucaryotes sont incapables de produire (147).

Finalement, on peut compter parmi les facteurs de virulence qui permettent aux leptospires de survivre dans l'hôte ou de s'y adapter plusieurs mécanismes de régulation. Ces mécanismes influencent l'expression de nombreux gènes, et donc par extension ceux impliqués dans la virulence. Dans un premier temps, on peut mentionner la méthylation de l'ADN qui est une forme de régulation de l'expression génique par modification directe des acides nucléiques de l'ADN – on parle d'épigénétique. La délétion d'une 4mc-méthyltransférase orpheline chez *L. interrogans* engendre une dérégulation globale de l'expression des gènes et le mutant perd sa capacité à tuer le modèle animal sensible de la leptospirose, et n'adhère plus de manière efficace aux cellules de l'hôte (148).

La protéine-senseur Lb139 est présente en première position de l'opéron contenant un antagoniste d'un facteur anti-sigma suivi de deux protéines à fonctions inconnues. La mutation par insertion de transposon dans le gène *lb139* exerce un effet polaire sur l'expression des gènes en aval et une dérégulation généralisée des gènes de motilité ainsi que des systèmes de transduction (149). Ce mutant a une virulence atténuée chez le hamster ainsi qu'un défaut de motilité. Ces observations suggèrent que Lb139 est un régulateur transcriptionnel nécessaire à la virulence, bien que sa fonction ne soit pas totalement élucidée.

La comparaison des génomes a permis de mettre en évidence sept systèmes à deux composants présents uniquement chez les espèces pathogènes. Parmi eux, deux ont manifesté un effet sur la virulence : les « leptospira virulence regulators », LvrA (histidine kinase hybride) et LvrB (régulateur de réponse hybride) (150). La disruption de ces deux gènes a aboli la virulence chez le hamster. Par des études transcriptomiques, les auteurs ont prédit que LvrA phosphorylait LvrB, qui, à son tour viendrait interagir avec d'autres régulateurs se liant à l'ADN

– il s’agit d’une régulation complexe à plusieurs niveaux, qui explique aussi en partie la dérégulation généralisée d’expression des gènes chez les mutants (150).

Enfin, en 2016, Lourdault et ses collaborateurs ont identifié par criblage à haut-débit de plusieurs mutants de transposition l’implication d’un gène codant une adénylate/guanylate cyclase comme essentielle à la virulence (151). Cette famille d’enzymes est primordiale pour générer les messagers secondaires du métabolisme comme l’AMP ou le GMP cyclique, qui à leur tour peuvent déclencher des cascades de transduction afin de répondre à un changement au sein de l’environnement. Une production augmentée des adénylate/guanylate cyclases a été démontrée *in vivo* en réponse à l’osmolarité physiologique de l’hôte, suggérant un rôle dans l’adaptation à la composition du milieu du site de l’infection (152,153).

5.3.4. Les toxines

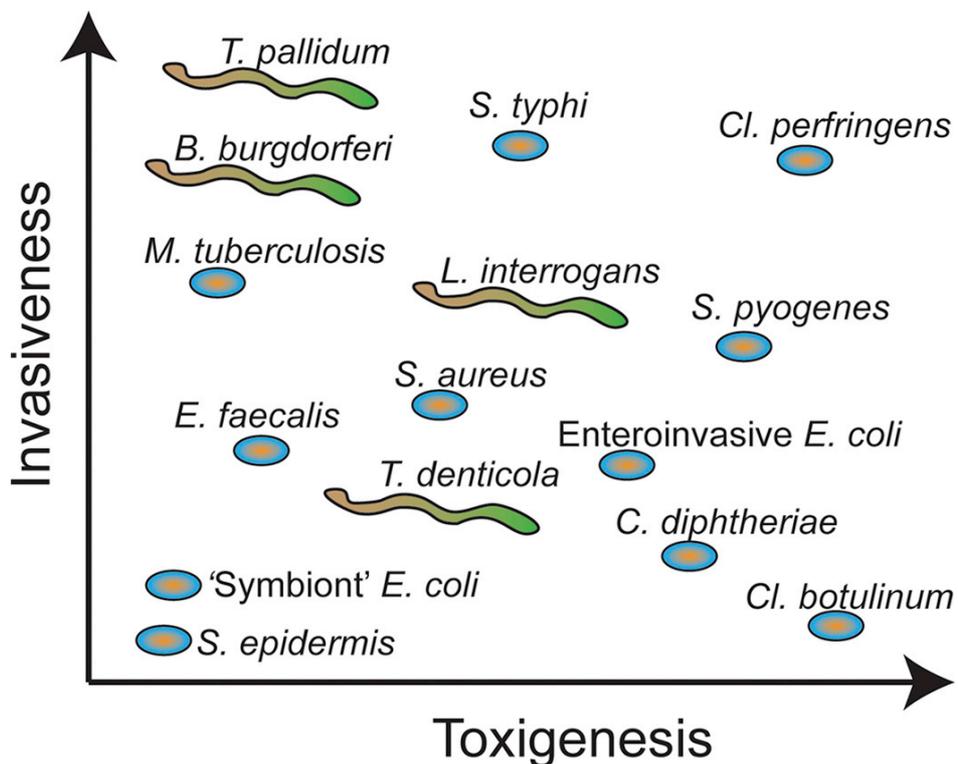


Figure 17 Diagramme illustrant les ratios invasivité versus toxigénèse de plusieurs espèces bactériennes. De manière générale, les spirochètes sont des pathogènes plutôt invasifs et produisent peu de toxines. Figure issue de (154).

Les bactéries pathogènes peuvent être caractérisées par leur « mode » de virulence : la bactérie produit-elle des effecteurs toxiques comme *Clostridium botulinum* (responsable du botulisme), ou engendre-t-elle plutôt des dégâts mécaniques au niveau des tissus ? Les spirochètes sont majoritairement peu toxigènes, notamment *T. pallidum* et *B. burgdorferi*,

qui elles sont extrêmement invasives (**Figure 17**). Les leptospires se situent à mi-chemin entre les deux modes : invasives mais produisant quelques toxines, décrites dans la suite de ce chapitre.

Lorsque sont mentionnées les toxines produites par les bactéries, il est logique de faire un lien avec les systèmes de sécrétion (SS). Le système de sécrétion de type 3 (T3SS) est important dans la sécrétion d'effecteurs et/ou de facteurs de virulence à l'extérieur de la cellule (155,156). Toutefois, les leptospires ne manquent pas de faire figure d'exception à ce sujet non plus : chez les leptospires, le T3SS n'est présent qu'au niveau du moteur flagellaire – il pourrait néanmoins participer à la sécrétion d'effecteurs en plus des protéines du flagelle, mais cela reste à prouver (157). Les seuls systèmes de sécrétions produits par *Leptospira* sont le type 1 (T1SS), et le type 2 (T2SS) de façon incomplète car certains gènes le composant sont absents du génome, mais il pourrait toutefois être fonctionnel (8,158). De ce fait, les leptospires pourraient posséder un mécanisme différent de l'injectisome pour sécréter les effecteurs dans le milieu ou l'hôte.

L'absence de systèmes de sécrétion complets (sur la base de l'analyse des génomes) n'empêche en rien la production de toxines par les leptospires, et plusieurs ont été identifiées à ce jour (159). Parmi elles, les plus notables sont les hémolysines à activité sphingomyélinase : ce sont des toxines qui détruisent les membranes cellulaires de l'hôte et engendrent une inflammation locale (160). Sph2, l'hémolysine la plus étudiée chez *Leptospira* déclenche l'apoptose cellulaire par l'augmentation de la production des ROS intracellulaires, et abîme les membranes mitochondriales (161). Son implication dans la pathogénèse est soutenue par l'augmentation de son expression dans les conditions physiologiques de l'hôte comme, par exemple, un milieu de culture enrichi en sérum de rat (162).

Très récemment, des chercheurs ont identifié une métalloprotéase à large spectre, la leptolysine, sécrétée par les leptospires (163). Des essais d'activité de la leptolysine sur plusieurs composants de la matrice extracellulaire tels que les glycoprotéines ou la fibronectine ont démontré une lyse spécifique de ces substrats. De plus, les souris auxquelles on a injecté la version recombinante de la leptolysine ont développé des sites hémorragiques qui reflètent probablement le phénomène de destruction de la matrice extracellulaire (163).

Enfin, on pourrait considérer les bactériocines comme des toxines impliquées dans la virulence, plus particulièrement dans l'établissement de la niche environnementale au sein de l'hôte. Ceci est un projet de recherche en cours d'étude au sein du laboratoire, qui a démontré la production de bactériocines de type queue de phage ou « tailocines » par les leptospires. Ces tailocines ont prouvé un effet bactéricide d'une espèce de leptospires « prédatrice » face à une autre espèce de leptospires « proie ». De là, mes collaborateurs ont émis l'hypothèse que ces tailocines entrent en jeu dans la compétition entre les espèces pathogènes afin que l'animal (probablement plutôt dans les cas des réservoirs) ne soit colonisé que par une seule souche – hypothèse basée sur le fait qu'aucune co-infection par deux souches différentes n'a été mise en évidence à ce jour. Ceci pourrait également expliquer la spécificité des sérovars vis-à-vis de leurs hôtes.

5.4. Culture en laboratoire et manipulation génétique

5.4.1. Culture des leptospires

Les spirochètes sont des bactéries fastidieuses à cultiver en laboratoire, avec comme exemple notoire *T. pallidum* qui, jusqu'à très récemment, ne pouvait être maintenue en laboratoire que par la réinfection de lapins (164). Les leptospires, bactéries aérobies ou micro-aérophiliques chimio-organotrophes, ont été isolées et cultivées dans des conditions de laboratoire pour la première fois dès 1916, dans un milieu très riche en sérum de lapin (165). A la fin des années 1960, Ellinghausen, McCullough, Johnson et Harris ont développé un milieu de culture qui est depuis utilisé par la plupart des laboratoires pour cultiver les espèces de *Leptospira* – le milieu EMJH (166,167). En pratique, le milieu EMJH est préparé en utilisant une base disponible commercialement (Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH, BD) à laquelle on rajoute un supplément contenant les nutriments essentiels à la croissance des leptospires – leur principale source de carbone qui sont les acides gras à longues chaînes comme le Tween-80, la vitamine B12, le pyruvate et le fer sous forme de sulfate ferreux FeSO₄, entre autres (168–170) (**Tableau 2**). Pour certaines souches pathogènes, notamment les souches fraîchement isolées d'échantillons cliniques, il est nécessaire de rajouter 10% de sérum de lapin afin de permettre leur croissance. Dans tous les cas, le pH doit être ajusté à 7,5 car il est compris dans l'intervalle de pH nécessaire à la prolifération des leptospires (pH 7-8).

Zinc sulfate (ZnSO ₄)	0.4 g in 100-mL ultrapure sterile water	Supplement
Magnesium chloride (MgCl ₂)	1.5 g in 100-mL ultrapure sterile water	Supplement
Calcium chloride (CaCl ₂)	1.5 g in 100-mL ultrapure sterile water	Supplement
Copper sulfate (CuSO ₄)	0.3 g in 100-mL ultrapure sterile water	Supplement
Sodium pyruvate	10 g in 100-mL ultrapure sterile water	Supplement
Glycerol	3.18 mL in 16.82-mL ultrapure sterile water or 20 g in a total volume of 100 mL	Supplement
Tween 80	11.58-mL Tween 80 in 113.42-mL ultrapure water	Supplement
Bovine albumin	100-g bovine albumin in 600-mL ultrapure sterile water	Supplement
Iron (II) sulfate (FeSO ₄)	0.5-g iron (II) sulfate in 100-mL ultrapure sterile water in the dark (<i>extemporaneous</i>)	Supplement
<i>Leptospira</i> medium Base	2.3 g per liter of 1× EMJH (contains 100-mL supplement)	EMJH medium

Tableau 2 Composition du supplément du milieu EMJH à ajouter à la base commerciale. Tableau issu de (168).

La température optimale de croissance *in vitro* pour les leptospires est de 28 à 30°C, mais les saprophytes peuvent pousser à des températures plus basses de l'ordre de 11 à 13°C (171). Le temps de génération *in vitro* varie selon l'espèce considérée : les saprophytes ont un temps de génération moyen plus court que les pathogènes, à hauteur de 4,5 h contrairement à quasiment 20 h pour les souches pathogènes les plus fastidieuses (171). Autrement dit, après un inoculum de leptospires en phase stationnaire correspondant à 1 à 10% du volume de milieu EMJH frais final, on obtient une densité de culture maximale au bout de 4 à 7 jours pour les pathogènes, et 2 à 3 jours pour les saprophytes (172). Cette densité de culture se mesure soit au spectrophotomètre à la longueur d'onde d'absorption de 420 nm (DO_{420nm}), soit par dénombrement manuel à l'aide d'une cellule de comptage Petroff-Hausser au microscope à fond noir.

Les leptospires poussent également en milieu semi-solide, composé du milieu EMJH supplémenté d'agar noble à 0,3-1,2%. Une concentration basse en agar permet d'étudier plus facilement la dispersion des bactéries dans la gélose à partir du point d'inoculation. Des colonies seront observables après environ 7 jours d'incubation pour le saprophyte *L. biflexa*, et au minimum 4 semaines pour le pathogène *L. interrogans*. Les colonies ont un aspect semi-transparent et se situent juste en-dessous de la surface de l'agar, les rendant difficiles à distinguer sans les placer sur une surface sombre ou sous une forte source lumineuse (173) (**Figure 18**).

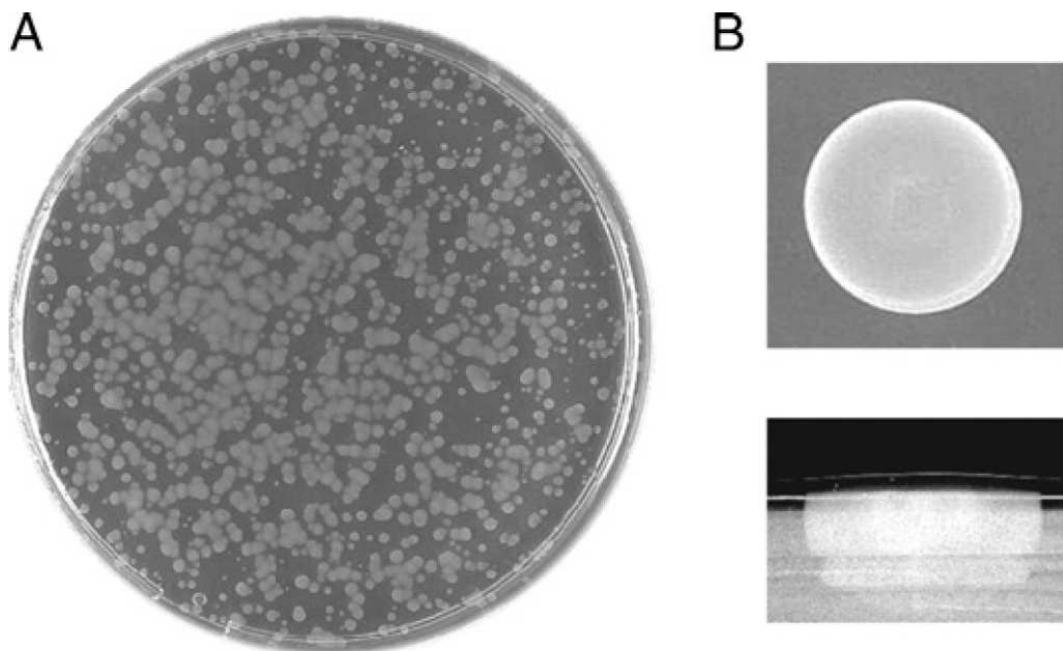


Figure 18 Aspect de colonies du saprophyte *L. biflexa* sur milieu gélosé. (A) Cliché d'une boîte de Pétri avec milieu EMJH + agar noble 1,2 % sur laquelle croissent des colonies de *L. biflexa* sérovar Patoc. (B) Coupes longitudinales et transversales d'une de ces colonies. Figure issue de (173).

Afin de faciliter et accélérer la croissance des leptospires, des variantes de milieux de cultures ont été développées. Premièrement, pour isoler les leptospires d'autres bactéries capables de croître en EMJH dans les échantillons issus de l'hôte, il est possible d'y rajouter un supplément d'antibiotiques auxquels les leptospires sont naturellement résistantes (174) – c'est le cocktail STAFF. Son nom correspond à l'acronyme des antibiotiques qui le composent : sulfaméthoxazole, triméthoprim, amphotéricine B, fosfomycine et 5-fluoro-uracile (175,176). Plus récemment, l'équipe de J. Nally a développé un nouveau milieu de culture, appelé HAN (initiales des auteurs Hornsby-Alt-Nally) qui permet une croissance des leptospires pathogènes à 37°C, et bien plus rapide – on obtient des colonies sur milieu gélosé au bout d'une semaine, et les cultures en milieu liquide atteignent la phase exponentielle de croissance en deux à trois

jours, comme pour le saprophyte en EMJH seul à 30°C (177). La différence principale entre les milieux HAN et EMJH repose sur l'ajout du milieu de culture eucaryote DMEM/HNM F12 à 20% du volume final, et l'utilisation de l'hémine au lieu du sulfate ferreux comme source de fer. Le milieu HAN a de ce fait un potentiel important dans la facilitation du développement de nouveaux outils génétiques chez les espèces pathogènes, car il permet d'obtenir des colonies rapidement au lieu de devoir patienter pendant un mois ou plus, sans garantie de résultats (178).

5.4.2. Composition du génome

A ce jour, 878 génomes du genre *Leptospira* ont été séquencés et publiés sur la base de données NCBI (179). Les leptospires possèdent des génomes de grande taille (3,9 – 4,7 Mb), comparés à ceux d'autres spirochètes tels que *T. pallidum* (1,1 Mb) ou *B. burgdorferi* (1,5 Mb) (180–182). Le contenu en G+C varie entre 35 et 42% selon les espèces, faisant des leptospires des bactéries avec des génomes plutôt riches en A+T (183). Ce génome est divisé en deux chromosomes – le chromosome I (cI) de grande taille (>3,6 Mb) et le chromosome II (cII), plus petit (environ 350 kb) (184). Le chromosome I a une densité génique de 75 à 92% et contient une majorité de gènes de ménage. Ces mêmes gènes peuvent être présents sur le second chromosome, que l'on peut donc qualifier de chromide (185). Chez l'espèce saprophyte *L. biflexa*, un troisième réplicon a été identifié – le plasmide p74 (74 kb avec 36% de contenu G+C). Au lieu d'une origine de réplication typique, les leptospires possèdent un système de partitionnement et réplication phagique sur leurs chromosomes secondaires et plasmides.

Parmi les 3000 à 4000 séquences codantes, environ 500 d'entre elles correspondent au core-génome (**Figure 19**), c'est-à-dire les gènes de fonction essentielle comme la réplication de l'ADN, division ou métabolisme communs à toutes les espèces de *Leptospira*, qu'elles soient pathogènes ou saprophytes (186). Au-delà du core-génome, chaque espèce possède des gènes qui lui sont uniques, en nombres assez élevés, témoignant d'une faible fréquence de transferts génétiques horizontaux entre les leptospires (**Figure 19**) (147,187).

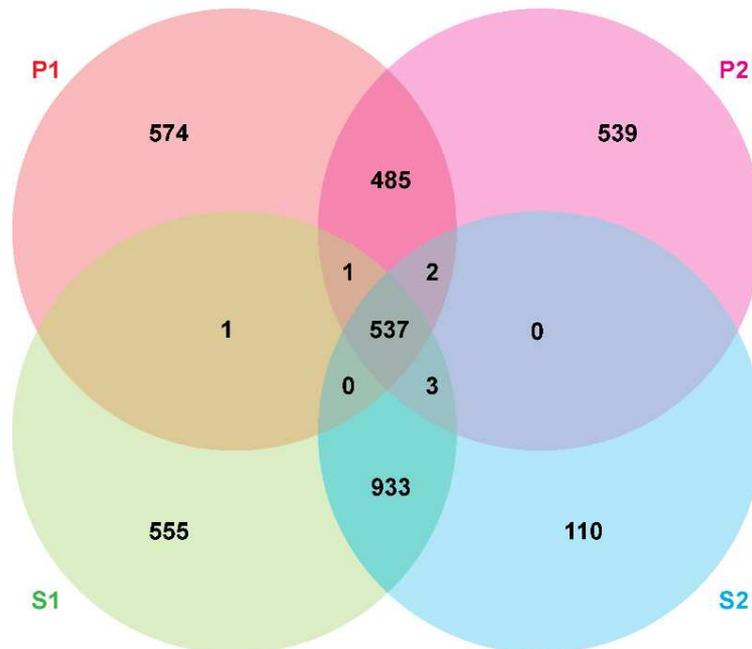


Figure 19 Diagramme de Venn illustrant le pangéome des 68 espèces de leptospires, regroupées par leurs clades. Figure issue de (27).

5.4.3. Outils de manipulation génétique et post-génomique

La manipulation génétique des spirochètes en est encore à ses débuts – à titre de comparaison, le premier plasmide répliatif chez *E. coli* a été obtenu en 1973 (188), alors qu’il a fallu attendre les débuts des années 2000 pour avoir l’outil équivalent chez *Leptospira*, obtenu par l’intégration de l’origine de répliation d’un phage lysogénique des leptospires, LE1, sur un squelette plasmidique contenant une cassette de résistance à la spectinomycine ou kanamycine (189–191). Ce retard impacte fortement la rapidité et l’étendue des études sur la pathogénèse et la biologie des leptospires. Néanmoins, plusieurs techniques de manipulation génétique sont disponibles à ce jour (**Figure 20**) (192).

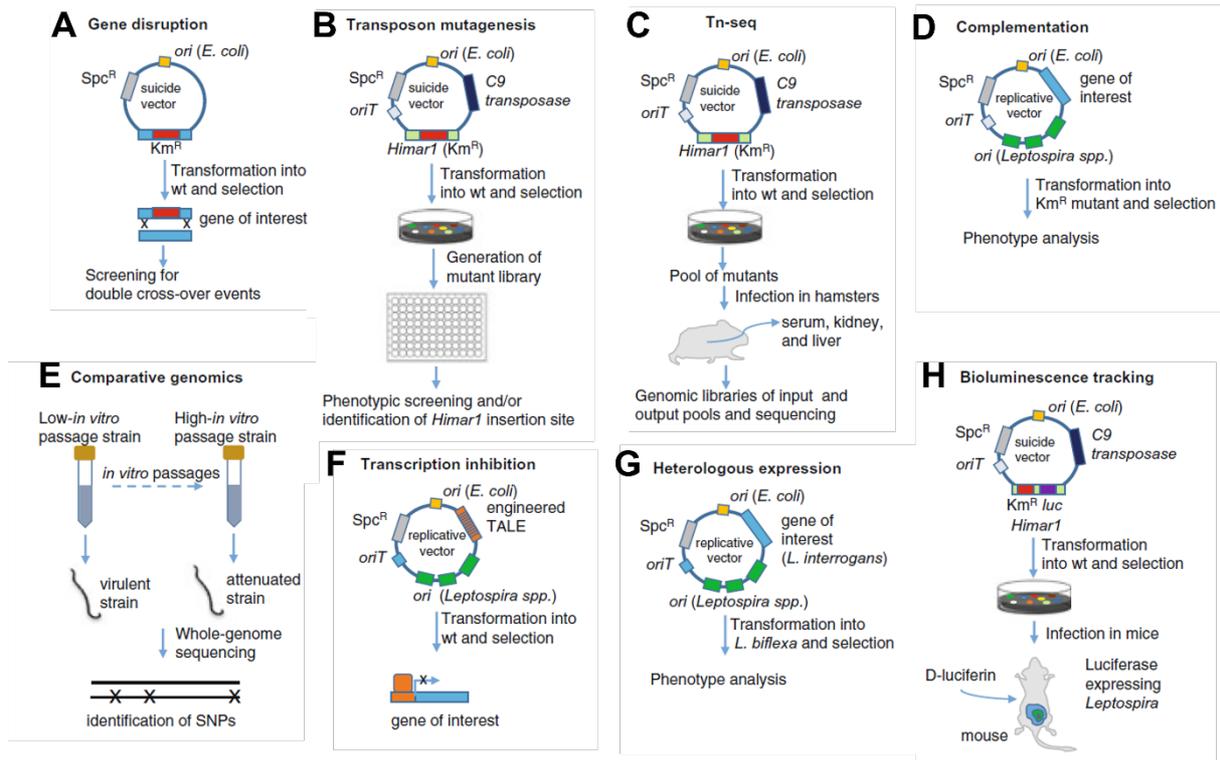


Figure 20 Schéma récapitulatif des outils génétiques disponibles en 2017 pour l'étude de *Leptospira*. Figure adaptée de (192).

5.4.3.1. Transformation

Afin d'introduire l'ADN plasmidique dans les leptospires, deux méthodes de transformation sont aujourd'hui utilisées : l'électroporation et la conjugaison (180). Sachant que les leptospires ne sont pas naturellement compétentes, pour les électroporer il faut rigoureusement les laver avec de l'eau pure afin d'éliminer tout sel qui interférerait avec l'électroporation (192). De plus, les bactéries doivent être préparées le jour-même, car elles ne peuvent pas être stockées par congélation contrairement aux cellules compétentes de *E. coli*. Ensuite, l'ADN est introduit dans les leptospires lavées et concentrées par pulsation électrique, puis étalées sur milieu gélosé sélectif et incubées jusqu'à apparition de colonies de transformants.

La conjugaison est réalisée entre les leptospires et une souche de *E. coli* conjugative (β 2163) contenant un plasmide de type RP4 à large spectre d'hôte par concentration des bactéries donneuses (*E. coli*) et receveuses (*Leptospira*) sur filtre (**Figure 21**) (193). Après 24h de contact, les bactéries sont resuspendues dans du milieu et étalées sur milieu sélectif pour ne garder que les leptospires ayant acquis le plasmide.

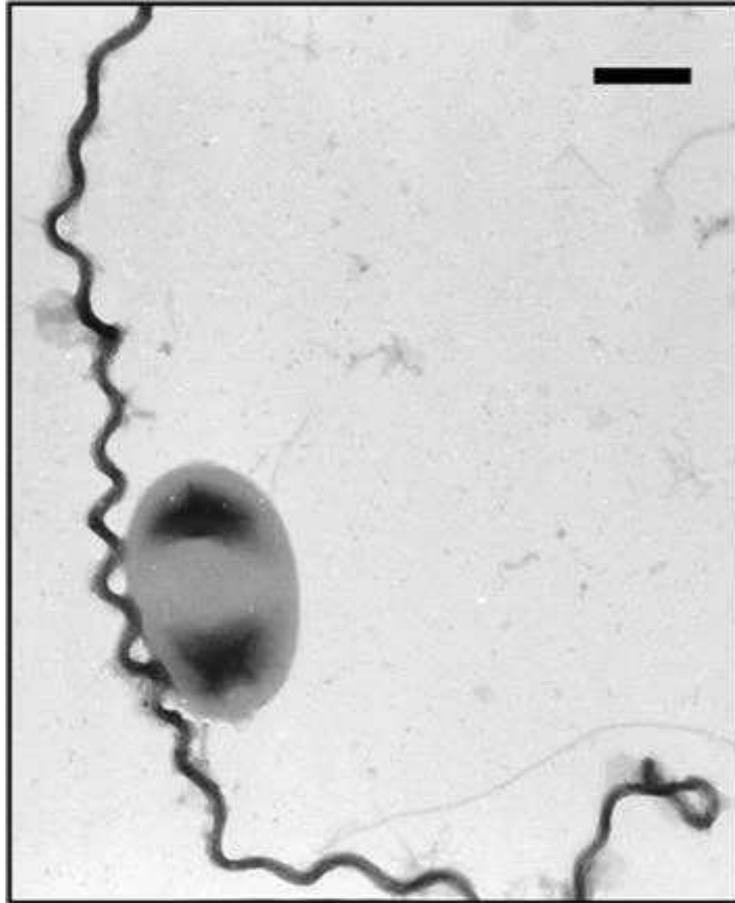


Figure 21 Cliché de microscopie électronique à contraste négatif d'une leptospire et de *E. coli* en cours de conjugaison. Figure issue de (180).

5.4.3.2. Mutagenèse, disruption de gènes

La mutagenèse dirigée par recombinaison homologue – consistant à utiliser un vecteur suicide (non répliquatif) avec le gène à inactiver remplacé par une cassette de résistance à un antibiotique, flanqué des régions en amont et en aval du gène sauvage – est utilisée en laboratoire mais reste très peu efficace (**Figure 20-A**). Le premier mutant obtenu de cette manière est le mutant d'un composant du filament de l'endoflagelle, $\Delta flaB$ chez le saprophyte *L. biflexa* (194). Ce n'est qu'en 2008, 7 ans plus tard, qu'une inactivation de gène ciblée a été réalisée chez le modèle pathogène, *L. interrogans* (110). Depuis, plusieurs mutagenèses dirigées chez le pathogène ont pu être achevées avec succès, tels que les gènes *mce* ou *fcpA* (107,135), mais il est important de rappeler que l'efficacité de cette technique reste très basse par rapport aux modèles bactériens les plus étudiés. En partie, on peut attribuer cette faible efficacité à la présence de systèmes de restriction-modification dans le génome des leptospires – travailler sur une souche déficiente en ces systèmes pourrait augmenter l'efficacité de la mutagenèse (192).

Un moyen de contourner ce désavantage est de se fier à la mutagenèse aléatoire par transposition (**Figure 20-B**). L'utilisation du transposon *HimarI* issu de la mouche *Haematobia irritans* (195) est largement répandue en microbiologie, car il n'y a aucune nécessité à recourir à des facteurs spécifiques aux bactéries et le site préférentiel d'insertion du transposon est 5'-TA-3 ; très fréquent dans le génome des leptospires. Le principe consiste à transformer les leptospires par électroporation avec un plasmide suicide contenant la transposase précédée d'un promoteur fort issu de *Borrelia*, ainsi que le transposon contenant le gène de résistance à un antibiotique. Après transformation, la transposase est exprimée et permet l'insertion de la cassette de résistance du transposon à des endroits aléatoires du génome. Les transformants obtenus sont ensuite isolés sur milieu sélectif, puis séquencés à la suite d'une PCR semi-aléatoire pour identifier le lieu d'insertion du transposon (**Figure 20-C**). Encore une fois, l'efficacité de transformation n'est pas très élevée, avec environ 5×10^3 transformants par expérience chez *L. biflexa*, et deux à trois ordres de grandeurs de moins pour *L. interrogans* (173,192). Toutefois, les banques de mutants obtenues à la suite de cette mutagenèse constituent une source de leptospires altérées génétiquement non négligeable à explorer. A ce jour, nous disposons de plus de 2000 mutants aléatoires chez le pathogène *L. interrogans* sérovar Manilae (192), qui correspondent à environ 50% des gènes non-essentiels (117) (**Figure 22**). Parmi ces mutants sont sélectionnés pour analyse en priorité ceux dont la disruption est située au niveau d'un gène putatif de virulence.

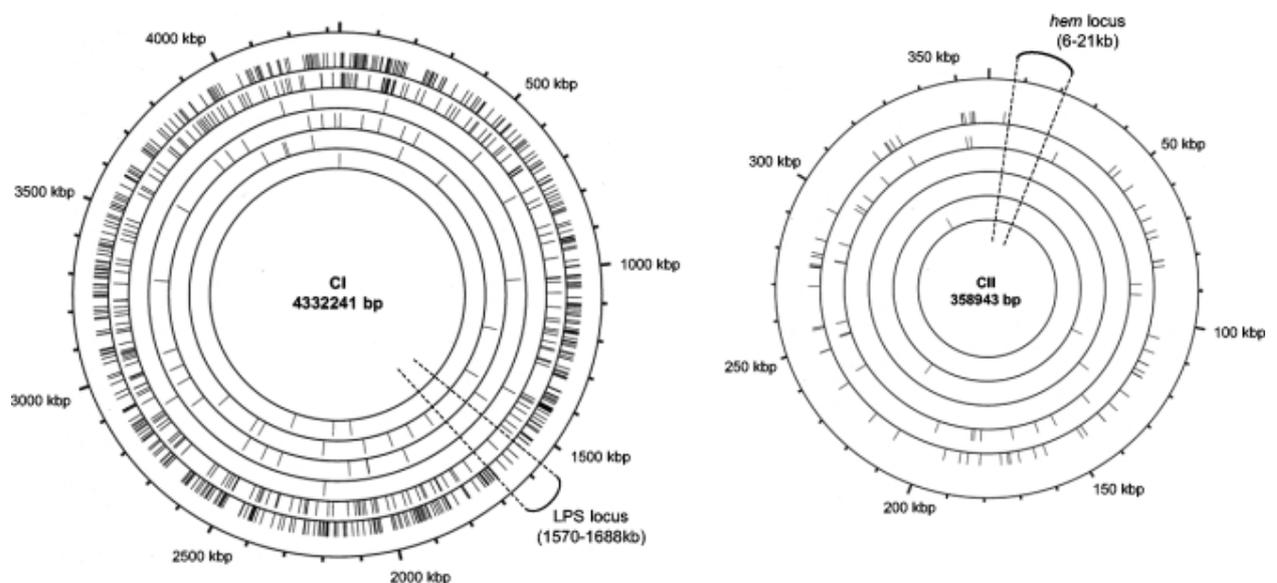


Figure 22 Carte des sites d'insertion du transposon *HimarI* dans le génome de *L. interrogans*. Figure issue de (117).

Afin de confirmer les postulats moléculaires de Koch, il faut restaurer le phénotype sauvage d'un mutant par la réinsertion en *trans* du gène délété ou disrupté à l'aide d'un vecteur répliatif contenant la version sauvage en aval d'un promoteur natif ou de surexpression (**Figure 20-D**) (191). Généralement, la région promotrice native est déterminée de manière empirique – c'est-à-dire les 300 paires de bases en moyenne en amont du codon initiateur du gène. En effet, il nous manque encore crucialement des connaissances sur les régions promotrices chez *Leptospira*, et de manière générale, sur la régulation de l'expression des gènes. De ce fait, il arrive fréquemment que la complémentation fonctionnelle ne soit pas possible avec les connaissances actuelles en la matière. Enfin, il a fallu construire un vecteur capable de se répliquer chez les leptospires pathogènes. Ce vecteur est disponible depuis 2015 (191).

Finalement, il est possible d'engendrer des mutations aléatoires par passages successifs des leptospires en culture *in vitro* (**Figure 20-E**). Souvent, cela mène à une souche pathogène avec une virulence atténuée. Pour déterminer quelles mutations sont à l'origine de ce nouveau phénotype, on extrait leur ADN génomique et on réalise un séquençage du génome que l'on compare ensuite à la séquence de référence à la recherche de mutations ponctuelles, ou SNPs (« single nucleotide polymorphisms »).

Récemment, d'autres méthodes de mutagenèse dirigée ou d'inhibition d'expression génique ont été développées chez *Leptospira* (**Figure 20-F**). En 2015, Pappas et Picardeau ont mis en place une méthode d'inhibition de l'expression de gènes par des effecteurs semblables à des activateurs de transcription, ou TALE (« transcription activator-like effectors ») (114). Ces effecteurs sont des protéines sécrétées naturellement par *Xanthomonas*, pathogène des plantes, qui modulent l'expression des gènes de leur hôte (196). Les TALEs reconnaissent une séquence consensus de l'ADN et en s'y fixant, inhibent la transcription. Chez *Leptospira*, on a ainsi pu obtenir des mutants de silençage des gènes *ligA* et *ligB*, révélant leur rôle dans la virulence (114).

L'utilisation de plus en plus répandue du système CRISPR/Cas9 (« clustered regularly interspaced short palindromic repeat ») chez les autres bactéries modèles n'a pas manqué d'éveiller la curiosité des chercheurs travaillant sur *Leptospira*. Son potentiel en tant qu'outil de manipulation génétique a été mis en avant en 2014 par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, dont la découverte leur a valu un prix Nobel quelques années plus tard (197). Ce

Le système est à l'origine un mécanisme de défense procaryote contre les bactériophages : la nucléase Cas (« CRISPR associated protein ») scanne le génome bactérien à la recherche d'une séquence spécifique qui correspondrait à un élément de prophage à l'aide d'un guide ARN, et une fois reconnu l'excise pour l'inactiver définitivement. Cependant, les coupures ADN double-brin ainsi générées sont létales chez les leptospires car elles ne possèdent pas la machinerie de réparation adéquate, donc une première tentative pour exploiter le système CRISPR-Cas chez notre modèle expérimental était d'utiliser la protéine Cas catalytiquement inactive, ou dCas9 – grâce à cette méthode, on peut inactiver la transcription des gènes par encombrement allostérique dû à la fixation du système CRISPR-dCas9 au niveau de la séquence cible. Ainsi, un silençage des gènes *dnaK* et *fliG* a pu être obtenu chez le saprophyte *L. biflexa* (178). Le silençage du gène *dnaK* n'a résulté en aucune colonie, prouvant que ce gène est essentiel chez *Leptospira*, et le mutant par interférence de *fliG*, protéine du flagelle, montrait une motilité diminuée. Au vu de ces résultats prometteurs, la même équipe a développé l'outil chez le modèle pathogène, en inactivant plusieurs composants membranaires, dont LipL32 (198,199). Enfin, il serait tout de même possible d'utiliser la version native de la nucléase Cas en détournant la machinerie de réparation indépendante de l'homologie des séquences (NHEJ, « non-homologous end-joining ») de *Mycobacterium smegmatis* pour réparer les cassures double-brin chez *Leptospira* – un premier essai fructueux a été réalisé récemment chez le saprophyte et le pathogène (200) L'inactivation de gènes grâce au système CRISPR constitue un outil utile pour pallier la résistance des leptospires à la mutagenèse, mais il faut rester méfiant vis-à-vis des effets non spécifiques liés à cette méthode (201).

5.4.3.3. Expression de protéines, gènes rapporteurs, fluorescence

Plusieurs promoteurs ont été identifiés chez *Leptospira* pouvant être utilisés afin de générer une expression hétérologue de protéines (**Figure 20-G**). Parmi eux, les plus notables sont ceux des gènes *lipL32* (lipoprotéine membranaire) et *groEL* (protéine chaperon) qui permettent une forte expression constitutive lorsque clonées en amont d'un gène d'intérêt (192). Ainsi, on a pu exprimer les protéines LigA et LigB issues de *L. interrogans* chez *L. biflexa*, ce qui a mené à un gain de fonction au niveau de la virulence, comme décrit plus tôt dans le manuscrit (115). Il existe également un promoteur inductible reposant sur un dérivé de l'opéron lactose, *lacI* optimisé pour *Borrelia* en association avec son promoteur *lacO*, qui active l'expression du gène lorsque l'analogue du lactose, l'IPTG, est introduit dans le milieu de culture (202). Ceci permet de contrôler l'expression d'un gène toxique ou retarder son activation. L'expression inductible a permis de déterminer le rôle de *mreB* dans la morphologie

cellulaire chez *L. biflexa* (19). Cependant, pour obtenir un clonage efficace, il faut prendre en compte l'usage particulier de codons chez *Leptospira*, qui peut parfois entrer en conflit avec celui de chez *E. coli*, qui sert de vecteur d'amplification des constructions plasmidiques – par exemple, certains codons rares chez *Leptospira* sont fréquemment utilisés chez *E. coli*, ce qui peut mener à une faible expression ou une toxicité et donc un échec du clonage (192).

L'expression de protéines sur un plasmide permet aussi d'étudier leur localisation au niveau cellulaire, ou le niveau d'expression généré par un promoteur en particulier. Pour déterminer la localisation d'une protéine au niveau de son compartiment cellulaire, on peut utiliser des marqueurs de type FLAG ou histidine fusionnés en N- ou C-terminal de la protéine, puis réaliser un fractionnement des extraits cellulaires et déterminer le compartiment contenant la protéine par détection immunohistochimique du marqueur sur un gel de protéines (192). Parmi les techniques d'étude de l'expression génique les plus anciennes, il y a le système rapporteur à la β -galactosidase qui a été développé dans le modèle saprophyte *L. biflexa* afin de suivre l'expression de certains de ses gènes (203). Additionnellement, plusieurs tentatives de fusion de promoteurs leptospiraux avec des protéines fluorescentes comme la GFP ou RFP (« green/red fluorescent protein ») ont été réalisées dans le but d'étudier leur expression *in vitro* ou *in vivo* (202,204). Toutefois, l'utilisation d'une souche exprimant la GFP n'est pas idéale pour observer les leptospires en culture, car la fluorescence reste faible (202). Une optimisation de la protéine fluorescente utilisée reste nécessaire pour obtenir des résultats satisfaisants. Une méthode de marquage fluorescent moins contraignant que la GFP a aussi été étudiée – les colorants à l'arsenic se fixant sur des motifs tétracystéine courts que l'on peut rajouter en N- ou C-ter des séquences de protéines (205). Ceci évite de trop modifier la structure de la protéine, dont la fonction biologique pourrait être impactée par la présence d'une grosse protéine comme la GFP. Le gène rapporteur *luc*, issu de la luciférase, précédé par un promoteur spécifique aux leptospires est aussi disponible chez *Leptospira* afin de suivre leur localisation dans l'animal par bioluminescence (**Figure 20-H**) (206). Similairement, le système *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* permet de visualiser les leptospires dans un contexte infectieux, avec l'avantage de ne pas nécessiter l'addition d'un substrat, à l'inverse du système luciférase (207).

5.4.3.4. Transcriptomique et protéomique

Dans l'ère actuelle des sciences « -omiques », il est naturel de se pencher sur les données qu'elles peuvent nous fournir sur la biologie des leptospires. La transcriptomique, ou l'étude de l'expression des ARN messagers de manière globale, est applicable à de nombreuses conditions – ainsi il nous est possible de comparer le profil transcriptomique de cultures en condition *in vitro* ou mimant certaines conditions lors de l'infection afin de pointer les gènes responsables de l'adaptation à l'hôte, comme les changements en osmolarité ou température, la présence de sérum ou encore la déplétion en fer (152,208–211). L'analyse du transcriptome d'un mutant peut aussi s'avérer utile pour déterminer d'éventuels effets polaires, ou de donner des indices sur l'implication du gène muté dans des mécanismes de régulation (139,140,211).

Néanmoins, il n'est pas toujours possible de faire le parallèle entre le niveau d'expression des ARN messagers et la quantité finale de la protéine correspondante – le transcriptome ne prend pas en compte les éventuelles régulations post-transcriptionnelles, traductionnelles et le renouvellement des ARNm (192). Ainsi, plusieurs études protéomiques (ou détermination des niveaux de protéines dans la cellule) ont été réalisées : la plus conséquente est celle de Malmström et ses collaborateurs, qui a pu déterminer la concentration relative de près de la moitié des protéines produites chez *L. interrogans* sérovar Fiocruz (~1800 sur ~3700 protéines au total, fonctions inconnues incluses) (212). La protéomique repose principalement sur l'analyse du contenu protéique par spectrométrie de masse quantitative, combinée à d'autres techniques complémentaires afin de, par exemple, déterminer la localisation de ces protéines (212,213).

La transcriptomique et la protéomique peuvent toutes les deux être utilisées soit du point de vue de la bactérie uniquement, dans des conditions de culture de laboratoire, soit en parallèle des transcriptomes et protéomes de l'hôte dans un contexte infectieux, afin d'évaluer la réponse adaptative de l'hôte à la présence de la bactérie (214,215).

5.4.3.5. Perspectives et outils en développement

De manière générale, les chercheurs travaillant sur les leptospires s'inspirent des travaux effectués sur un autre spirochète, *Borrelia* – ce modèle jouit d'une communauté de recherche plus étendue que celle des leptospires, et font ainsi des progrès plus rapidement (216). Néanmoins, il faut garder à l'esprit que malgré leurs similitudes, ces deux spirochètes possèdent des différences majeures, notamment au niveau de la structure de leur génome – comme

mentionné précédemment, le génome des leptospires est quatre fois plus grand que celui des borélias (~4 Mb versus ~1 Mb), et que les leptospires ont un génome circulaire, alors que les borélias possèdent un génome fragmenté et linéaire. Ces aspects ont sûrement un effet non négligeable sur les approches de manipulation génétique à adopter pour l'un comme pour l'autre.

Un effort conséquent est nécessaire pour améliorer l'annotation du génome des leptospires – ceci demande une curation manuelle extensive, mais la tâche est facilitée par le nombre grandissant de données protéomiques et transcriptomiques qui ont permis d'identifier des caractéristiques fonctionnelles de gènes inconnus jusqu'à lors (192). Une meilleure annotation de la composition du génome permettra déjà de faire certains parallèles avec les connaissances obtenues chez d'autres bactéries modèles, et orienter les axes futurs de recherche.

Un aspect prometteur pour évaluer les interactions hôtes-pathogènes est le développement des organes sur puce, ou « organ on chip » : ainsi on peut recréer sans nécessité de passer par l'animal les organes colonisés par les leptospires, comme le rein ou le foie, avec des conditions modifiables rapidement.

Enfin, afin de pouvoir profiter des progrès phénoménaux au niveau de l'imagerie à haute résolution, il serait très utile d'optimiser les protocoles de marquages fluorescents *in vivo*, tels que les fusions de protéines. Ces nouveaux marqueurs rendront possible les études de régulation génétique en direct.

En conclusion, la manipulation génétique et les outils adaptés à l'utilisation sur les leptospires est encore à ce jour balbutiante, mais des progrès sont réalisés en continu afin de faciliter l'étude de cette bactérie atypique et fascinante.

6. La motilité

On peut considérer que la motilité est un aspect inhérent au vivant – tout organisme vivant se déplace dans l'espace, que ce soit de manière active ou passive. La capacité de se mouvoir est primordiale pour la survie d'une espèce, afin de fuir des prédateurs, coloniser un nouvel environnement riche en nutriments ou se reproduire. Aujourd'hui, on identifie au minimum 18 types de motilité (217). Parmi eux, on compte la motilité médiée par des flagelles chez les bactéries et autres éléments équivalents chez les eucaryotes comme l'actine, le déplacement sur des surfaces par des protéines d'adhésion ou pili, mais aussi les systèmes moteurs complexes comme l'appareil musculosquelettique des métazoaires, ou les moteurs moléculaires kinésine-dynéine qui permettent le transport vésiculaire au sein d'une cellule (**Figure 23**).

D'après Miyata et collaborateurs, le premier mode de déplacement ayant apparu au cours de l'évolution est la motilité flagellaire des bactéries, suivi de son équivalent chez les archées, l'archaelle, et finalement les nombreuses variantes eucaryotes (217). Il est donc intéressant de regarder le développement des mécanismes de motilité d'un point de vue évolutif afin de comprendre, en partie, comment la vie s'est installée sur Terre.

Environ 80% des bactéries sont motiles, ou au moins possèdent dans leur génome des gènes de motilité (218,219). Leurs vitesses de déplacement sont très variées – des mouvements passifs presque imperceptibles au rythme des divisions cellulaires, jusqu'à 160 $\mu\text{m/s}$ pour *Bdellovibrio bacteriovorus* (220,221).

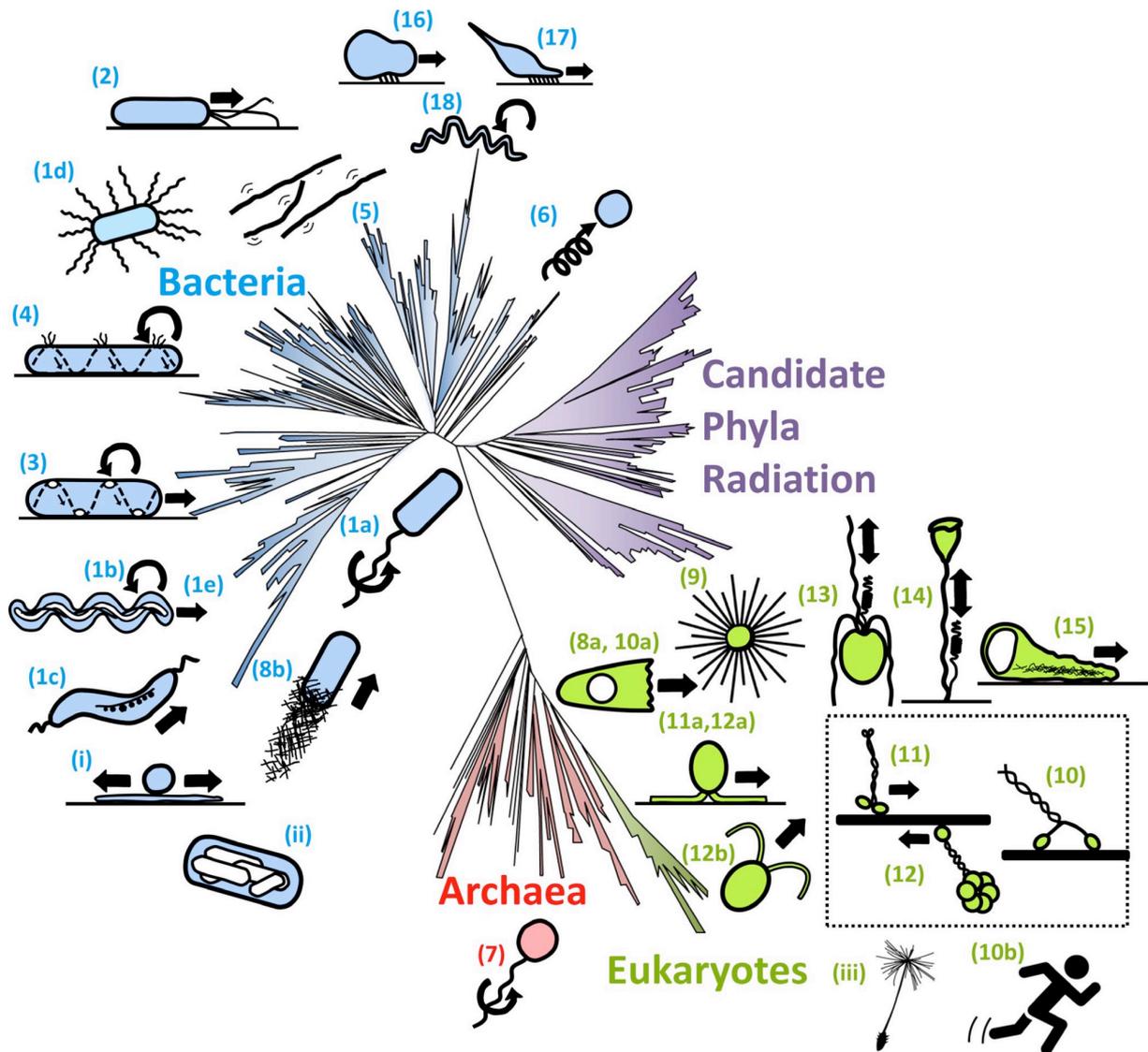


Figure 23 Arbre phylogénétique du vivant réalisé en fonction des types de motilité identifiés à ce jour. En bleu est représenté le règne bactérien, en rouge les archées, en vert les eucaryotes et en violet les espèces non classifiées. (1a) nage flagellaire bactérienne, (1b) nage flagellaire des spirochètes, (1c) nage flagellaire magnétotactique, (1d) essaimement bactérien, (1e) motilité rampante de *Leptospira*, (2) motilité bactérienne due aux pili de type IV, (3) motilité « aventurière » de *Myxococcus xanthus*, (4) glissement des *Bacteroidetes*, (5) motilité de surface de *Chloroflexus aggregans*, (6) nage non flagellaire de *Synechococcus*, (7) nage archaellaire, (8a) motilité basée sur la polymérisation de l'actine des amibes, (9) motilité par dépolymérisation des microtubules des protozoaires héliozoa, (10) glissement de la myosine, (11) glissement de la kinésine, (12) glissement de la dynéine, (10a) motilité des amibes basée sur la contraction de l'actine-myosine, (10b) contraction musculaire animale, (11a, 12a) motilité flagellaire de surface eucaryote, (12b) nage flagellaire eucaryote, (13) contraction de haptonèmes, (14) contraction de spasmonèmes, (15) motilité amiboïde des spermatozoïdes de nématodes, (8b) motilité bactérienne basée sur la création d'une comète d'actine, (16) glissement de *Mycoplasma mobile*, (17) glissement de *Mycoplasma pneumoniae*, (18) nage de *Spiroplasma*, (i) le glissement bactérien, (ii) vésicule de gaz, (iii) graine de pissenlit. Figure issue de (217).

6.1.Motilité des bactéries autres que les spirochètes

Si l'on se focalise sur le règne bactérien, on peut considérer cinq types de mouvements comme les plus notables (**Figure 24**) (222). Le premier, appelé « swarming » ou essaimement (**Figure 24-A**), correspond à un mouvement synchronisé de bactéries flagellées sur un support, parfois nécessitant la sécrétion d'un surfactant afin de diminuer la tension de surface (223): il a été décrit chez de nombreuses bactéries, dont *Serratia*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* ou *E. coli*, parmi de nombreuses autres (224–229). Ensuite, la nage, ou « swimming » concerne toutes les bactéries flagellées lorsqu'elles se déplacent dans un milieu liquide, cela dit ce moyen de locomotion a été le mieux décrit chez le paradigme des modèles bactériens, *E. coli* (**Figure 24-B**) (230). *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae* utilisent les contractions de pili de type IV pour se déplacer sur des surfaces, autrement appelé le « twitching » (**Figure 24-C**) (231–233). Les bactéries allongent leurs pili, s'accrochent à la surface, puis font avancer le corps cellulaire par la rétraction des pili, tel un grappin. Le « gliding », ou glissement est également un déplacement de bactéries le long d'une surface (**Figure 24-D**). *Myxococcus xanthus* se déplace sur une surface par la délocalisation progressive de complexes d'adhésion focale d'un pôle à l'autre (234). Les complexes d'adhésion focale sont composés du système Agl-Glt qui s'apparente au moteur flagellaire, sans le flagelle (235,236). Le déplacement peut également se réaliser de manière passive par les divisions cellulaires successives qui étendent la surface occupée par les bactéries de la colonie, le « sliding » (**Figure 24-E**) (237,238).

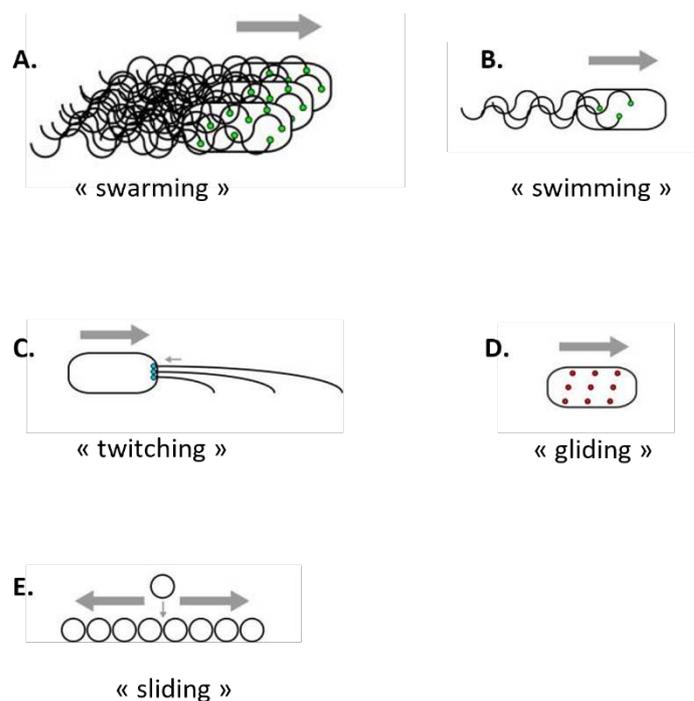


Figure 24 Cinq modes de déplacement chez les bactéries. (A) « swarming » ou essaimement sur une surface ; (B) « swimming » ou nage ; (C) « twitching » ou contractions des pili de type IV ; (D) « gliding » ou glissement ; (E) « sliding » ou déplacement passif dû à la croissance bactérienne. Figure adaptée de (222).

6.1.1. Organisation de la flagellation

Les motifs d'assemblage des flagelles sont propres à chaque espèce bactérienne, même si les raisons derrière l'adoption d'un motif de flagellation plutôt qu'un autre sont encore très peu claires (239–241). L'une des hypothèses avancées est que la présence d'un flagelle unique fournit un avantage pour les déplacements en milieux liquides, alors que de multiples flagelles performant mieux dans des milieux plus visqueux ou sur des surfaces, cependant, aucune preuve tangible allant dans ce sens n'a été établie (242).

Chez les bactéries à flagelles externes, on retrouve six types de répartition des flagelles vis-à-vis de la cellule : monotriche polaire ou subpolaire, péritriche, lophotriche, amphitriche ou lophotriche bipolaire (**Figure 25**) (243). Le nombre de flagelles présent sur une cellule est variable – de un à plusieurs centaines comme chez *Vibrio parahaemolyticus* (244). Les bactéries dites monotriches possèdent un flagelle unique situé le plus fréquemment à un des pôles de la cellule (comme *Vibrio cholerae* ou *Legionella pneumophila*), ou alors de façon subpolaire, vers le centre de la cellule (*Bradyrhizobium japonicum* ou *Rhodobacter sphaeroides*, par exemple). Ensuite, de nombreuses bactéries possèdent plusieurs flagelles répartis sur l'ensemble de la cellule – on les nomme péritriches. C'est le cas de *E. coli*, *Bacillus subtilis* ou *Clostridium difficile*, pour n'en citer que quelques-unes. Si les flagelles sont regroupés en

grappe à l'un des pôles, la bactérie est considérée comme lophotriche – *Pneumophila aeruginosa* et *Helicobacter pylori* font partie de ce groupe. *Spirillum*, qui présente des amas de flagelles aux deux pôles, est une bactérie lophotriche bipolaire. Enfin, la bactérie est amphitriche si chaque pôle est décoré d'un flagelle unique, comme dans le cas de *Campylobacter jejuni*.

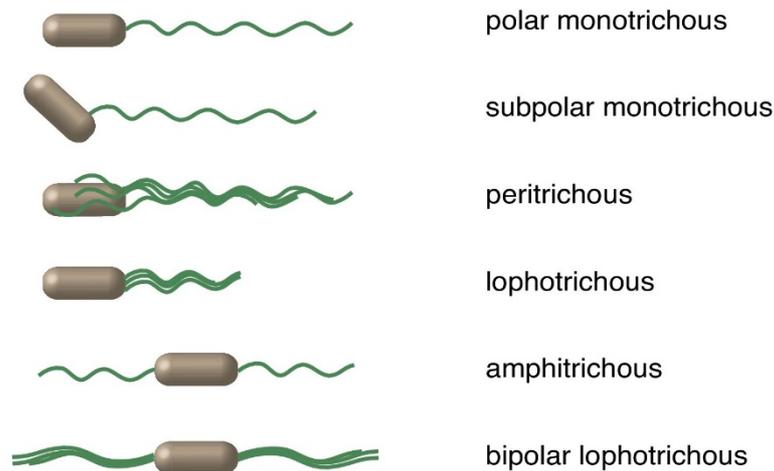


Figure 25 Organisation des flagelles chez les bactéries à flagelles externes. Figure issue de (243).

La répartition précise des flagelles au niveau du corps cellulaire implique la présence de mécanismes de régulation afin d'assurer le bon nombre et la bonne localisation des flagelles (240). Plusieurs acteurs ont été identifiés possédant ce rôle : FleQ/FlrA, FlhF/FlhG, HubP, et TipN/TipF (**Figure 26**). Une espèce bactérienne peut posséder une ou plusieurs de ces protéines.

De façon surprenante, aucune de ces protéines ayant un rôle régulateur spatio-numérique des flagelles n'a été identifiée chez *E. coli* ni *Salmonella* (**Figure 26**). Cependant, même si l'emplacement des flagelles peut avoir l'air aléatoire étant donné le profil péritriche de ces deux entérobactéries, il ne l'est pas tout à fait – on remarque que les pôles n'ont jamais de flagelles, et le centre de la cellule semble en abriter le plus grand nombre. Il doit donc exister un mécanisme sous-jacent à l'organisation de leurs flagelles dont la nature nous échappe encore à ce jour (245).

Caulobacter crescentus et d'autres α -protéobactéries utilisent le duo TipN et TipF, qui sont deux protéines transmembranaires de type « coiled-coil » (**Figure 26**). TipN relocalise au niveau du nouveau pôle cellulaire juste à la fin de la division pour orienter le recrutement des

structures flagellaires. En premier, il s'associe à son partenaire TipF. TipF est stabilisé au moment de l'entrée en phase de division par l'augmentation du niveau du messager secondaire, le di-GMP cyclique, et facilite ainsi son recrutement par TipN au pôle naissant. Le complexe TipN/TipF recrute à son tour les éléments du corps basal, notamment FliM, FliF et FliG, assurant sa formation à l'emplacement du nouveau pôle cellulaire (246,247).

(A)	TipN/F PflI	FlhF	FlhG	HubP	FleQ/ FlrA	Pattern
<i>Vibrio</i>	—	✓	✓	✓	✓	
<i>Shewanella</i>	—	✓	✓	✓	✓	
<i>Pseudomonas</i>	—	✓	✓	(✓)	✓	
<i>Helicobacter</i>	—	✓	✓	—	—	
<i>Campylobacter</i>	—	✓	✓	—	—	
<i>Bacillus</i>	—	✓	✓	—	—	
<i>E. coli/Salmonella</i>	—	—	—	—	—	
<i>Caulobacter</i>	✓	—	—	—	—	

Figure 26 Présence ou absence des régulateurs de nombre et de localisation des flagelles chez plusieurs espèces bactériennes. Figure adaptée de (240).

Le système de régulation du nombre et de la localisation des flagelles le plus fréquemment observé est sans doute le duo de protéines FlhF et FlhG (**Figure 26**). Toujours exprimés en opéron, le locus est très conservé à travers de nombreuses espèces. De plus, l'environnement génétique en amont de *flhF-flhG* est lui aussi conservé, avec notamment la présence de gènes du système de sécrétion flagellaire (FT3SS) dont *flhA*, juste en amont de *flhF*.

FlhF est une GTPase de type particule de reconnaissance de signal (SRP-like GTPase) composée de trois domaines distincts : (i) le domaine G qui correspond à la région à activité

GTPase et sert à créer les homodimères de FlhF en présence de GTP, (ii) le domaine régulateur N et (iii) le domaine B qui est le plus variable entre les espèces. Chez *Vibrio*, le domaine B recrute la protéine du C-ring FliF (voir partie suivante sur la composition du flagelle), mais il est possible que son rôle soit différent chez d'autres bactéries à cause de la forte variabilité de ce domaine (248).

FlhG, connue aussi sous ses anciennes dénominations FleN, YlxH, MotR ou MinD2, est une ATPase semblable à MinD. MinD joue un rôle crucial dans la formation du Z-ring lors de la division cellulaire, cependant aucun lien direct et universel de FlhG avec la division cellulaire n'a été démontré, bien qu'un défaut de division est observé chez le mutant *flhG*- de *Campylobacter jejuni* (249). FlhG, comme FlhF, forme des homodimères en présence d'ATP, mais aussi en présence de phospholipides auxquels elle se lie via un motif de liaison à la membrane présent en C-terminal (249). En N-terminal, FlhG possède un domaine d'interaction avec FlhF en forme d'hélice alpha. Cette interaction fournit à FlhF des résidus catalytiques supplémentaires pour hydrolyser son GTP en GDP et par conséquent relibérer FlhF dans le cytoplasme sous sa forme monomérique (250,251). Chez les bactéries polaires et péritriches, FlhG recrute et interagit avec les composants du C-ring du corps basal du flagelle (249).

Chez les bactéries monotriches et amphitriches, FlhF et FlhG semblent avoir des fonctions complémentaires quant à la régulation spatio-numérique des flagelles : les mutants délétés du gène *flhF* donnent des bactéries avec des flagelles désorganisés ou absents, tandis que les mutants *flhG* présentent souvent un surnombre de flagelles (252,253). En 2020, Yang et Chen ont pu élégamment prouver ce phénomène chez *Shewanella oneidensis*, une bactérie monotriche polaire (**Figure 27-A**) : la délétion de *flhF* délocalise le flagelle sur le côté latéral de la cellule, la délétion de *flhG* génère de multiples flagelles au niveau du pôle, et la délétion des deux gènes entraîne une dérégulation de la localisation et du nombre de flagelles, donnant à la bactérie un aspect de flagellation péritriche (254). On note aussi que la disruption de un ou des deux gènes a un effet délétère plus ou moins sévère sur la motilité, appuyant l'importance de l'organisation correcte des flagelles chez chaque espèce (**Figure 27-B**) (242,254).

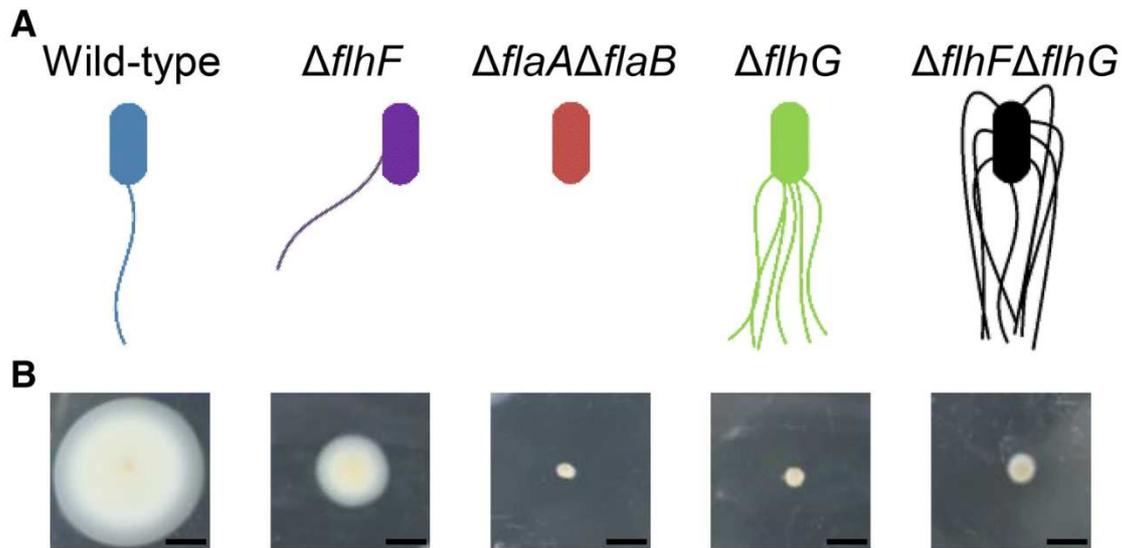


Figure 27 Modification de la flagellation et de la motilité de *Shewanella oneidensis* dues à la mutation d'un ou plusieurs gènes flagellaires. (A) Schémas illustrant les phénotypes de flagellation observés chez la souche sauvage et les mutants $\Delta flhF$, $\Delta flaA\Delta flaB$, $\Delta flhG$ et $\Delta flhF\Delta flhG$. (B) Halos de dispersion en milieu semi-solide des souches représentées en A. Le mutant $\Delta flaA\Delta flaB$ (gènes de flagellines) sert de contrôle aflagellé non motile. Figure issue de (254).

Chez *Helicobacter pylori* qui est lophotriche, la délétion de *flhG* (ou Y1xH) entraîne une absence de flagelles, comme l'est observé dans le cas des mutants *flhF* chez les bactéries polaires monotriches ou amphitriches – ceci indique que les fonctions de FlhF et FlhG ne sont pas consistantes dans leur impact sur le flagelle entre les espèces (255). Il en est de même entre deux espèces au sein d'un même genre : *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, toutes deux péritriches, ont un phénotype différent quant à l'absence de FlhF – chez *B. subtilis*, les flagelles sont désorganisés alors que chez *B. cereus* leur nombre est réduit. De plus, FlhG est présent chez *B. subtilis* mais étonnamment absent chez *B. cereus*. La mutation de FlhG chez *B. subtilis* crée des foci de touffes de flagelles répartis aléatoirement sur la cellule (242).

Les études mentionnées précédemment démontrent bien que FlhF et FlhG contrôlent le nombre et la localisation des flagelles, mais leurs rôles variables selon les espèces et les profils de flagellation suggèrent qu'ils n'interviennent pas seuls – quelques partenaires ont pu être identifiés chez certaines bactéries modèles.

FleN (*P. aeruginosa*) ou FlrA (*Aeromonas*, *Vibrio* et *Shewanella*) sont des orthologues de FlhG qui, couplés à FleQ forment un complexe capable de se lier aux régions promotrices de certains gènes flagellaires, dont *flhA* (**Figure 26**). L'inhibition de l'activité ATPase de FleQ par

FlhN/FlrA entraîne une diminution de l'expression des gènes flagellaires et par conséquent exerce un contrôle sur le nombre de flagelles synthétisés (256–259).

Vibrio possède une autre protéine associée à FlhF/FlhG, HubP (**Figure 26**). Il s'agit d'une protéine membranaire qui est adressée au pôle dès sa synthèse et est nécessaire au recrutement de FlhG, qui, en l'absence de HubP, est diffuse dans le cytoplasme. Cependant, FlhF localise aux pôles indépendamment de HubP (260,261).

Kazmierczak et Hendrixson ont proposé en 2013 un modèle du mécanisme emprunté par FlhF et FlhG afin d'assurer la présence d'un flagelle par pôle chez *C. jejuni* (**Figure 28**) (252). La cellule fille issue d'une division cellulaire ne possède qu'un seul flagelle : dès la fin de la cytokinèse, FlhF est adressée au nouveau pôle sous sa forme homodimérique liée au GTP. Une fois sur place, elle procède au recrutement des composants du MS- et C-ring du corps basal flagellaire. A la fin de cette étape, par un mécanisme encore inconnu, FlhG se lie à FlhF et le dissocie en hydrolysant le GTP en GDP – ainsi, aucun autre corps basal ne peut se former. FlhG continue à s'accumuler aux pôles, ce qui permet le positionnement du Z-ring et le démarrage d'une nouvelle division cellulaire.

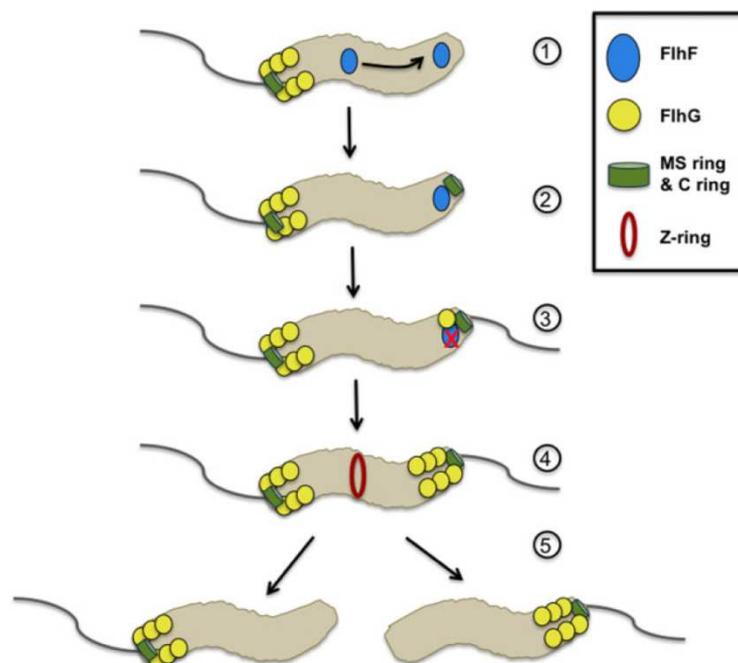


Figure 28 Proposition du mécanisme de régulation spatio-numérique des flagelles de *Campylobacter jejuni* par FlhF/FlhG. Figure issue de (252).

6.1.2. Composition et assemblage des flagelles

Le flagelles et toujours composé de trois structures : (i) le corps basal qui génère la force motrice, (ii) le crochet qui transmet la force générée au (iii) filament. En moyenne, 60 gènes sont impliqués dans la formation et modulation du flagelle (262). Malgré leur taille microscopique, ce sont des machines extrêmement performantes – les vitesses de rotation vont de 300 tours par seconde (*E. coli*) jusqu'à 1700 tours par seconde chez *Vibrio alginolyticus*, surpassant les voitures de courses les plus performantes construites à ce jour (263,264). Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur la structure générale du flagelle et comment est régulé son assemblage chez les bactéries à flagelles externes.

6.1.2.1. Corps basal

Le corps basal est la structure du flagelle qui l'enracine dans les membranes internes et externes et traversant le peptidoglycane (chez les bactéries à Gram négatif) (**Figure 29-A**). C'est aussi à ce niveau qu'est générée la force motrice permettant la rotation du flagelle.

6.1.2.1.1. Système de sécrétion

Le système de sécrétion flagellaire est issu du système de sécrétion de type 3 (T3SS), qui a pour rôle d'exporter les protéines flagellaire/flagellines à travers les membranes jusqu'à l'extrémité distale des structures flagellaires en formation (265) (**Figure 29-A**). Sa structure est conservée au travers du règne bactérien – il est composé de six protéines transmembranaires – FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR qui constituent le portail d'export de protéines par force motrice de protons, et d'un complexe ATPase cytoplasmique composé de trois protéines solubles, FliH, FliI, et FliJ, qui respectent une stœchiométrie de 12:6:1 unités une fois assemblés (157).

6.1.2.1.2. C- ring et MS-ring

Le C-ring, en plus de participer à la génération de torque par le rotor sert aussi d'interrupteur du mouvement de rotation, comme l'a été décrit chez *E. coli* et *Salmonella* (266). Il est situé au niveau de la face cytoplasmique du corps basal, en dessous du MS-ring, et est constitué d'une combinaison en forme d'anneau des protéines FliG, FliM et FliN (**Figure 29-A**). Chez *E. coli*, il a été démontré que le C-ring était une structure dynamique, avec un renouvellement rapide des protéines FliM et FliN à partir de leur réservoir cytoplasmique (267–269). Le MS-ring quant à lui est composé de plusieurs unités de l'unique protéine

transmembranaire FliF, aussi organisée en anneau et ancrée dans la membrane interne. FliG et FliF interagissent directement entre elles, créant un lien entre le C- et le MS-ring. Le MS-ring est en contact avec la protéine du stator MotA par le biais de FliG, faisant ainsi du MS-ring un constituant du rotor (262,266).

6.1.2.1.3. P- et L-ring

Le P- et le L-ring se situent au niveau du peptidoglycane et de la membrane externe, respectivement, et font partie des structures du corps basal qui sont anciennes et conservées, malgré leur absence chez les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*) et certains spirochètes (voir plus loin dans le manuscrit) (**Figure 29-A**) (270–272). Ces deux structures, composées de la protéine périplasmique FlgI (P-ring) et de la lipoprotéine FlgH (L-ring) servent de support et de protection à la tige flagellaire (262).

6.1.2.1.4. Stator

Les unités de stator, présentes en 10 à 12 exemplaires chez les bactéries exoflagellées, sont assemblées sur l'anneau du C-ring formé par FliG (262,273) (**Figure 29-A**). Le rôle des stators est de transmettre la force créée par la transduction d'ions au rotor – selon leur nature protéique et des ions utilisés par les stators, on peut les classer en trois catégories : les complexes MotAB (chez *E. coli*, par exemple) couplés aux protons H⁺, et les complexes PomAB (*Vibrio*) et MotPS (*Bacillus*) couplés aux cations sodium Na⁺ (274–279). Les trois complexes s'organisent de manière similaire : quatre unités de MotA/PomA/MotP et deux unités de MotB/PomB/MotS formant un canal ionique transmembranaire à protons ou Na⁺. Certaines bactéries possèdent des protéines motrices supplémentaires pour assurer la stabilité des unités de stator : MotCDE chez *Sinorhizobium meliloti* (bactérie symbiotique de plantes) ou MotXY chez *Vibrio alginolyticus* (280,281).

6.1.2.1.5. Tige, crochet et filament

La tige flagellaire est une structure creuse mais plutôt rigide et a pour fonction de transmettre le torque produit par le moteur jusqu'au crochet (**Figure 29-A**). Elle est divisée en sections proximales et distales : la section proximale est composée des protéines FliE, FlgB, FlgC et FlgF et la section distale de FlgG (262,272). FliE assure la liaison entre la tige et le MS-ring. Afin de percer le peptidoglycane lors de la formation de la tige, FlgJ, qui est une coiffe protéique, vient se placer sur la partie distale de la tige et use de son domaine muramidase pour

hydrolyser localement le peptidoglycane et ainsi permettre la traversée des composants du crochet et du filament vers l'extérieur de la cellule (282).

Le crochet est à l'inverse de la tige une structure très flexible mais robuste, malgré leur similarité structurale (**Figure 29-A**). A la fin de la synthèse de la tige distale, FlgJ est remplacée par la coiffe du crochet, FlgD (283). Ce mécanisme permet ensuite la sécrétion de FlgE, la protéine structurale du crochet. La longueur du crochet est finement régulée par la règle moléculaire FliK : en effet, un crochet trop court serait trop rigide et un crochet trop long engendrerait une rotation d'ampleur trop importante, nuisant au mouvement harmonique des flagelles chez les bactéries péritriches comme *Salmonella* (265,284).

Le filament de *E. coli* est composé de plus de 30 000 unités d'une seule protéine de type flagelline, FliC, organisée en hélice composée de 11 protofilaments (**Figure 29-A,B**) (262). FliC est constituée de quatre domaines : D0, D1, D2 et D3 (**Figure 29-C**). Les domaines D0 et D1 sont très conservés parmi les espèces, mais ce n'est pas le cas des domaines D2 et D3, qui sont relativement variables même au sein de bactéries du même genre. Cette variabilité n'est pas si surprenante, comme les flagelles sont les antigènes bactériens les plus exposés et les plus immunogènes – varier la structure des domaines les plus externes permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte (285). *Salmonella* code dans son génome une flagelline secondaire FljB, exprimée lors de l'infection, dans le même but de se faire discrète face aux défenses immunitaires de l'hôte (286). Plusieurs espèces bactériennes ont un filament composé de multiples flagellines : *Caulobacter crescentus* possède six flagellines à fonction redondante, FliJ-O, *Sinorhizobium meliloti* en possède quatre, FlaA-D, dont FlaA est la flagelline primaire (287–289). L'organisation exacte des flagellines multiples au sein du filament est encore méconnue, principalement à cause de leurs fortes homologues de séquences (85-95% d'identité en moyenne), les rendant difficiles à identifier individuellement par analyses structurales comme la reconstruction par cryo-tomographie.

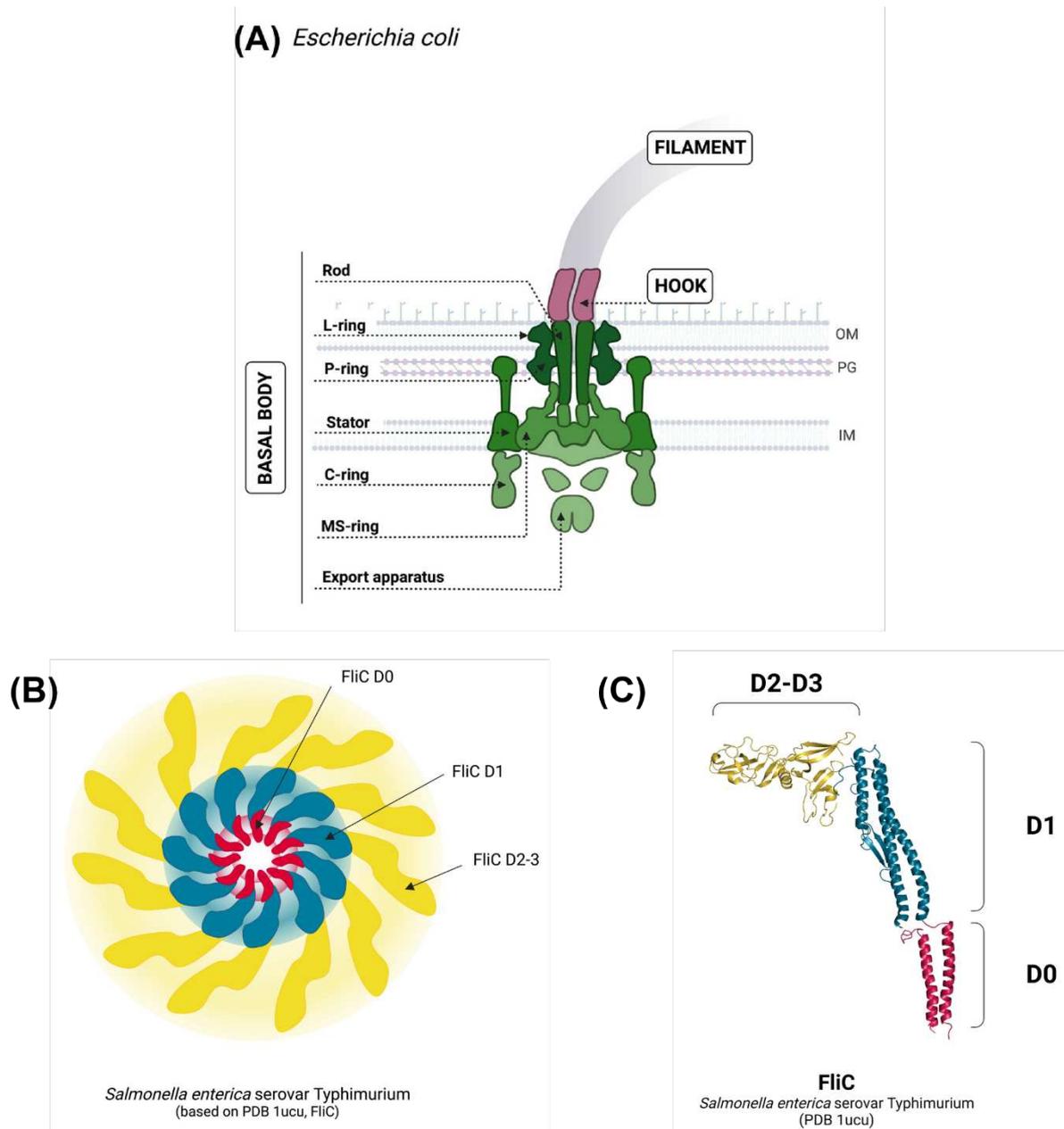


Figure 29 Structure du flagelle chez les bactéries exoflagellées. (A) Schémas des structures principales du corps basal de *E. coli*. (B) Représentation d'une coupe transversale du filament de *Salmonella enterica*. (C) Structure protéique de la flagelline FliC de *Salmonella*. OM = membrane externe ; PG = peptidoglycane ; IM = membrane interne ; PDB = Protein Data Bank. Figure adaptée de (272).

6.1.2.2. Assemblage et régulation

La complexité du flagelle nécessite une fine régulation spatio-temporelle de son assemblage. De nombreuses études ont été réalisées afin de déchiffrer la construction séquentielle de sa structure, principalement chez *E. coli* et *Salmonella* par l'analyse de la structure de flagelles de mutants d'un de ses composants (290,291). Les essais les plus anciens ont déterminé que le corps basal se construit d'abord par ses composants les plus internes, puis

ceux situés à l'extérieur – globalement, l'assemblage démarre par le système de sécrétion et le MS-ring, suivis de la tige, des P- et L-rings et finalement le crochet et le filament (291). Cependant, les progrès en techniques d'imagerie et de manipulation génétique ont pu nous fournir une image bien plus détaillée de la chronologie de cet assemblage, à la protéine près (292).

La première étape est initiée au niveau de la membrane interne par la protéine chaperon FliO qui permet l'oligomérisation de FliP, qui recrute à son tour FliR, FliQ et FlhB (**Figure 30-A**) (293). Ensuite, par un mécanisme encore méconnu, neuf unités de FlhA s'ajoutent au complexe pour former le cœur du système de sécrétion (294). Le système de sécrétion ainsi complété, vient FliF qui compose l'anneau du MS-ring. FliF à son tour recrute les composants du C-ring, à savoir FliG, FliM et FliN (**Figure 30-B**) (295–297). Finalement, la complétion du C-ring recrute le complexe ATPase (FliHIJ) avec les composants de la tige proximale et distale (FliE, FlgBCF) qui sont sécrétés à travers la membrane interne de manière séquentielle, aidés par la protéine chaperon FlgJ (**Figure 30-C**) (298,299). C'est à ce moment que les P- et L-rings sont assemblés chez les bactéries à Gram négatif. La sécrétion des protéines de la tige est arrêtée par l'intervention de FlhB qui sert d'interrupteur entre substrats, et ouvre la voie à la sécrétion de FlgE, composant du crochet (300). La protéine chaperon FlgD permet la polymérisation de FlgE, qui sinon ne survient pas spontanément (**Figure 30-D**). En parallèle, FliK régule la longueur du crochet et déclenche un second interrupteur de substrat qui stoppe la sécrétion de FlgE et la remplace par les protéines de jonction crochet-filament, FlgK et FlgL (284,301). La jonction mise en place, le substrat est changé une dernière fois pour laisser place à(aux) flagelline(s) (**Figure 30-E**). De la même manière que le crochet, la polymérisation du filament requiert la présence d'une coiffe, ici FliD – cependant il n'y a aucune limite de longueur du filament qui continuera à croître, mais de plus en plus lentement (302,303). La toute dernière étape consiste à l'addition des stators composés de MotA/MotB, ce qui enclenche enfin le mouvement rotatoire du flagelle.

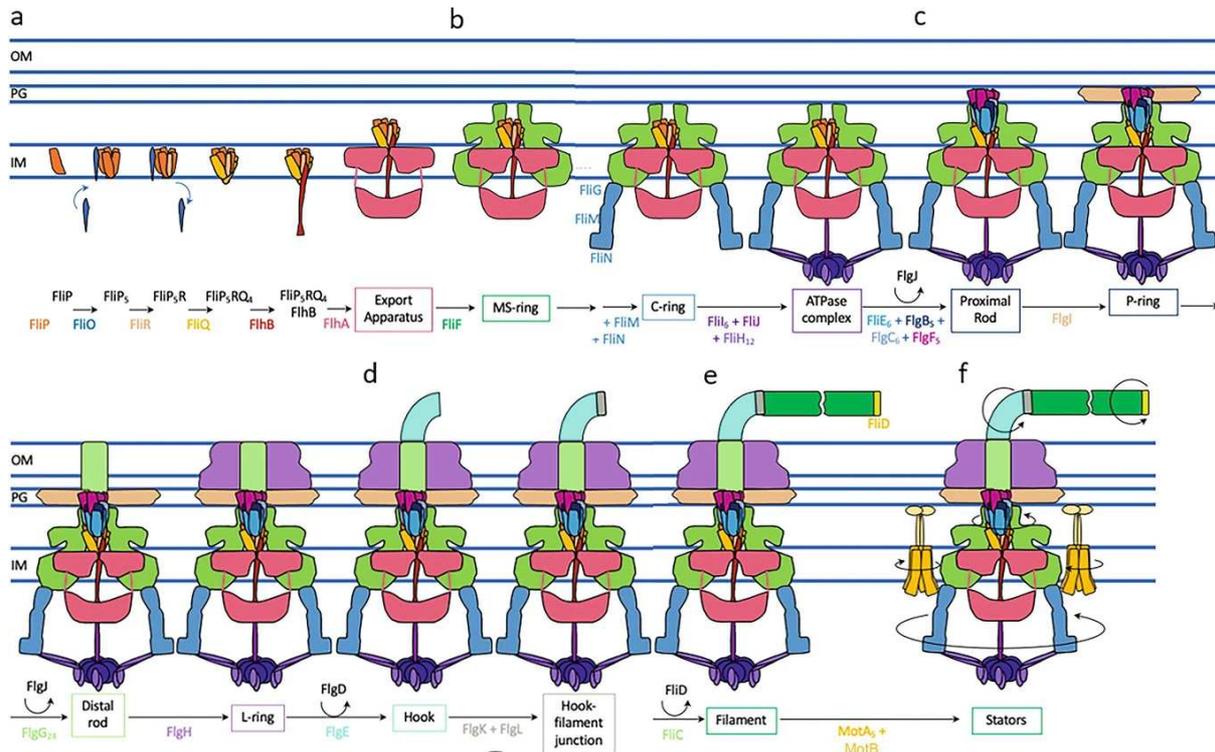


Figure 30 Chronologie de l'assemblage du flagelle externe de *E. coli*. OM = membrane externe ; PG = peptidoglycane ; IM = membrane interne. Figure issue de (292).

Le relargage séquentiel des protéines structurales du flagelle est régulé génétiquement : les connaissances les plus poussées concernent encore une fois les modèles *E. coli* et *Salmonella*, mais nous ne pouvons pas les considérer comme paradigmes car d'autres bactéries régulent différemment l'expression des gènes flagellaires, dont les spirochètes que l'on discutera en détail ultérieurement. La soixantaine de gènes flagellaires – dont la moitié code les composants du flagelle et l'autre les protéines régulatrices – est répartie en opérons sous le contrôle de promoteurs flagellaires (292). Les gènes sont regroupés en trois classes, selon la chronologie de leur expression (304). En plus d'une régulation hiérarchique, des mécanismes de contrôle positif ou négatif interviennent au fil de l'expression des gènes et de l'assemblage du flagelle (305).

La classe I est composée d'un seul opéron, *flhDC*, sous le contrôle d'un promoteur activé par un signal chimiotactique (**Figure 31**). FlhC et FlhD constituent le complexe du régulateur maître des gènes flagellaires – une fois formé, il recrute l'ARN polymérase associée au facteur sigma primaire, σ^{70} (306). Ceci permet la transcription des gènes de la classe II qui comprend les composants du corps basal et du crochet. Dans un premier temps sont exprimés les gènes *flhB*, *fliP*, *fliR*, *fliQ* et *flhA*, suivis des composants du MS- et C-ring, *fliF*, *fliG*, *fliM* et *fliN*. Puis, le complexe ATPase est transcrit (*fliH*, *fliI*, *fliJ*) et comme l'a été décrit dans la partie précédente, ceci déclenche la transcription des gènes de la tige proximale (*fliE*, *flgB*, *flgC* et

flgF), puis distale (*flgG*) et finalement le crochet (*flgE*), accompagnés des protéines chaperons et coiffes adéquates à chaque structure. FliK débute l'expression des gènes de la classe II lorsqu'elle a détecté que le crochet a atteint sa taille optimale. Ceci provoque l'export de FliD qui a son tour libère FliT – la protéine chaperon FliT séquestre ensuite FlhC provoquant l'inhibition de l'expression des gènes de classe II (307). FliT se lie également à la protéine anti-sigma FlgM, ce qui libère le facteur sigma alternatif FliA (σ^{28}). FliA peut ensuite se lier aux promoteurs des gènes de classe III et activer leur transcription (308). Les gènes de classe III comprennent la jonction crochet-filament, *flgK* et *flgL*, la flagelline *fliC* et les stators, *motA* et *motB*, ainsi que plusieurs gènes liés au chimiotactisme (309).

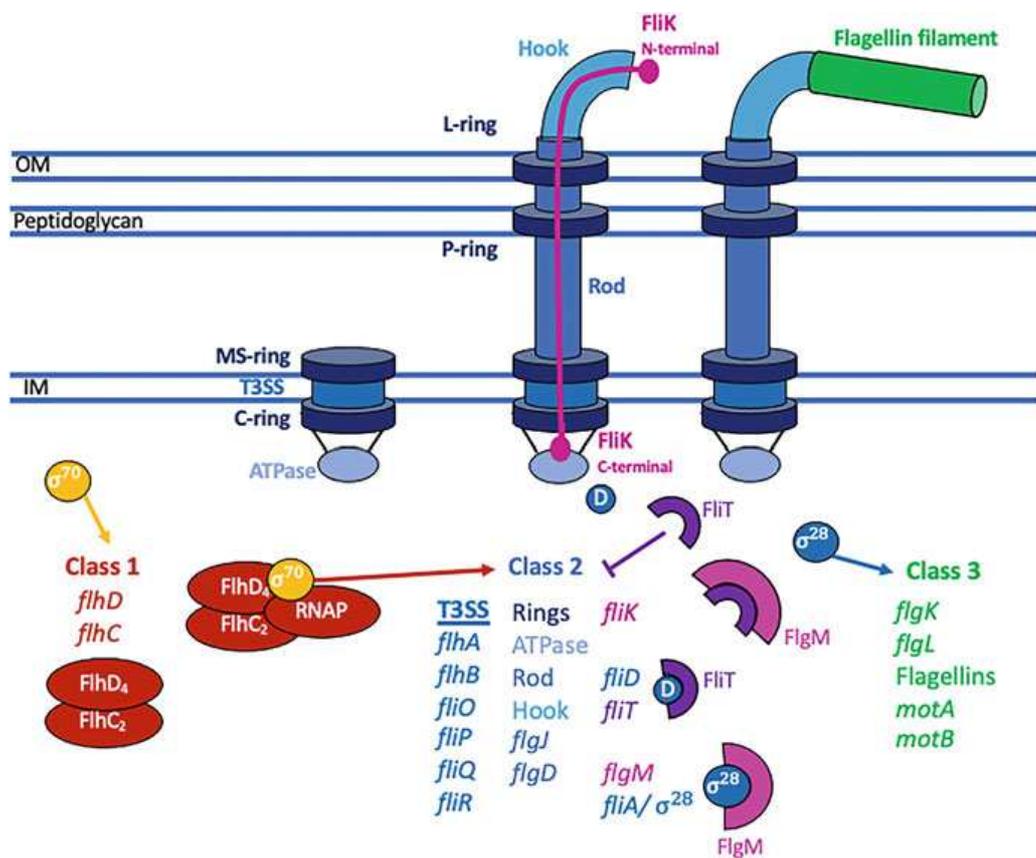


Figure 31 Classification des opérons de gènes de motilité. Les gènes de classe I sont représentés en rouge, ceux de la classe II en bleu ou violet et la classe III en vert. Figure issue de (292).

6.1.3. Chimiotactisme

Le chimiotactisme est décrit comme la capacité d'une bactérie à orienter son déplacement vers un environnement plus riche, ou pour s'éloigner de substances toxiques. Étudié en profondeur chez les entérobactéries, nous allons nous focaliser sur cet exemple pour présenter les principes généraux du chimiotactisme. Le chimiotactisme et la motilité sont étroitement liés – les chémorécepteurs transmettent le signal de la composition de l'environnement à l'organe locomoteur afin d'adapter le déplacement de la bactérie en conséquence (310).

Le chimiotactisme entre en jeu en réaction à la présence de deux types de substances dans le milieu : les attractants, ou molécules propices à la croissance de la bactérie, et les répellants, substances qui lui sont toxiques (311). En présence d'un milieu homogène, la bactérie – ici *E. coli* – se déplace de manière aléatoire dans l'espace, avec des phases de marche et de culbutes, ou « run and tumble » (**Figure 32-A**) (312). En présence d'un gradient de molécule attractante, *E. coli* montre un mouvement moins erratique, dirigé vers la concentration la plus élevée avec des phases de « tumble » minimales (**Figure 32-B**). Étant donné la petite taille de la bactérie (~2 µm de long), la bactérie ne réagit pas immédiatement à la concentration de la molécule dans le milieu, mais plutôt à son évolution dans le temps – elle se dirige dans la direction dans laquelle la concentration de l'attractant augmente (313).

Dès les débuts des études sur le chimiotactisme bactérien, il a été démontré que les bactéries se dirigeaient prioritairement vers leurs principaux nutriments, tels que les sucres ou les acides aminés, et fuyaient les environnements à pH ou concentrations en ions inorganiques trop élevés (314–316). Certaines bactéries, dont *Bacillus subtilis*, sont aussi attirées par des intermédiaires métaboliques de leurs sources d'énergie primaire, ou par des indices environnementaux comme l'élévation du taux d'éthanol qui suggère qu'il y a un fruit en fermentation à proximité, source de nombreux nutriments (317,318).

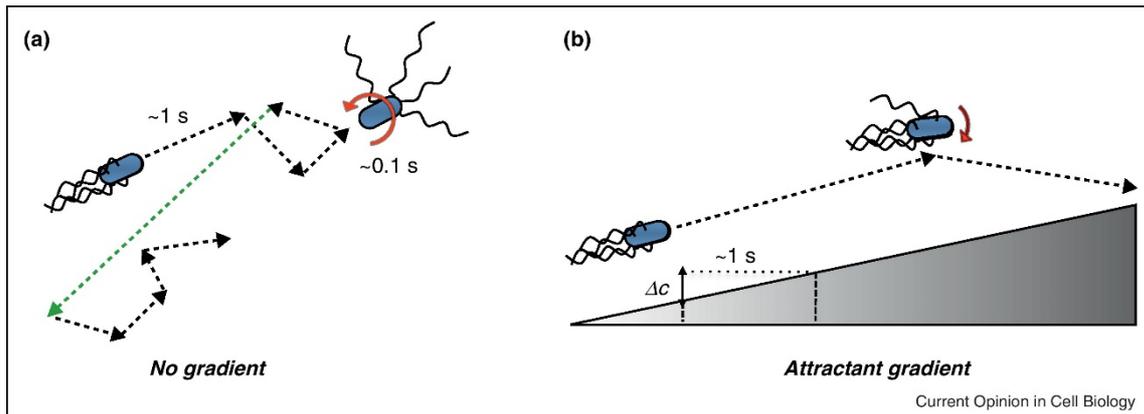


Figure 32 Chimiotactisme et déplacement de *E. coli* en milieu homogène (a) et en présence d'un gradient d'attractant (b). Figure issue de (312).

Les structures cellulaires qui reçoivent les informations chimiotactiques sont appelées chémorécepteurs. *E. coli* possède cinq chémorécepteurs, chacun spécifique au substrat qu'ils reconnaissent : Tsr (sérine), Tar (aspartate et maltose), Tap (dipeptides), Trg (ribose et galactose) et Aer (oxygène) (**Figure 33**) (313). Ces récepteurs, aussi appelés protéines accepteur de méthyle (MCP – « methyl accepting protein »), sont des protéines transmembranaires organisées en clusters denses aux régions polaires de la bactérie (dans la plupart des cas) (24,319). Les signaux de chimiotactisme sont ensuite transduits aux protéines cytoplasmiques CheA, CheB, CheR, CheW, CheY et CheZ (**Figure 33**). CheA et CheW correspondent au complexe sensoriel, où CheW sert de protéine de couplage entre le chémorécepteur et la suite de la cascade de signalisation, dont l'interlocuteur suivant est l'histidine kinase CheA (320). CheA s'autophosphoryle soit en présence de repellants, soit à l'aide de CheW et transmet le groupement phosphate aux protéines régulatrices de réponse, CheB ou CheY. Une fois phosphorylé, CheY vient se lier au moteur flagellaire et déclenche la réponse chimiotactique adéquate. CheY est ensuite déphosphorylé par CheZ. CheR et CheB fonctionnent en tandem pour méthyler les bases des chémorécepteurs afin d'accélérer la réponse chimiotactique.

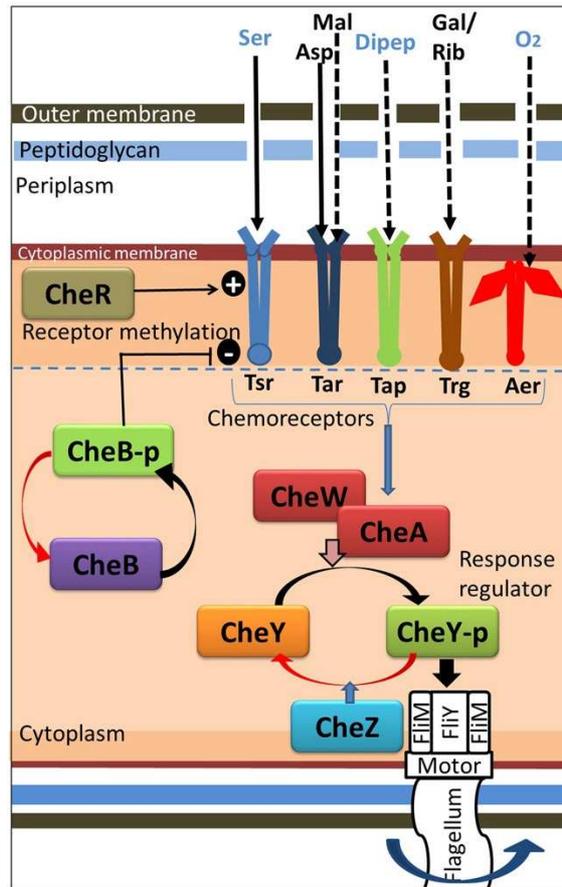


Figure 33 Schéma du mécanisme de chimiotactisme chez *E. coli*. Figure issue de (313).

6.2. Motilité chez les spirochètes

La motilité des spirochètes est unique en son genre – les endoflagelles, ancrés au sein du périplasm, déforment la cellule entière pour générer leur déplacement (**Figure 34**). Chez *Borrelia* et *Treponema*, possédant de multiples endoflagelles à chaque pôle qui se rencontrent au milieu de la cellule (voir **Figure 2-A,B**), leur rotation engendre une ondulation tout le long de la cellule (**Figure 34-A,B**) (321,322). *Leptospira*, qui à l'inverse de *Borrelia* et *Treponema* possède un seul endoflagelle par pôle, plus courts et ne s'entrecroisant pas au centre de la cellule, a un mode de motilité un peu différent : la rotation du moteur flagellaire en sens horaire ou antihoraire déforme les extrémités des cellules soit en forme de crochet, soit en forme de spirale, respectivement (**Figure 34-C,D**) (323,324). Afin de générer un mouvement translationnel, la leptospire doit impérativement adopter une conformation asymétrique de type « crochet-spirale », le côté « spirale » correspondant au pôle mineur de la bactérie, le côté « crochet » étant le pôle postérieur. Si les deux pôles ont la même conformation « crochet-crochet » ou « spirale-spirale », la bactérie ne se déplace pas et tourne sur elle-même (324).

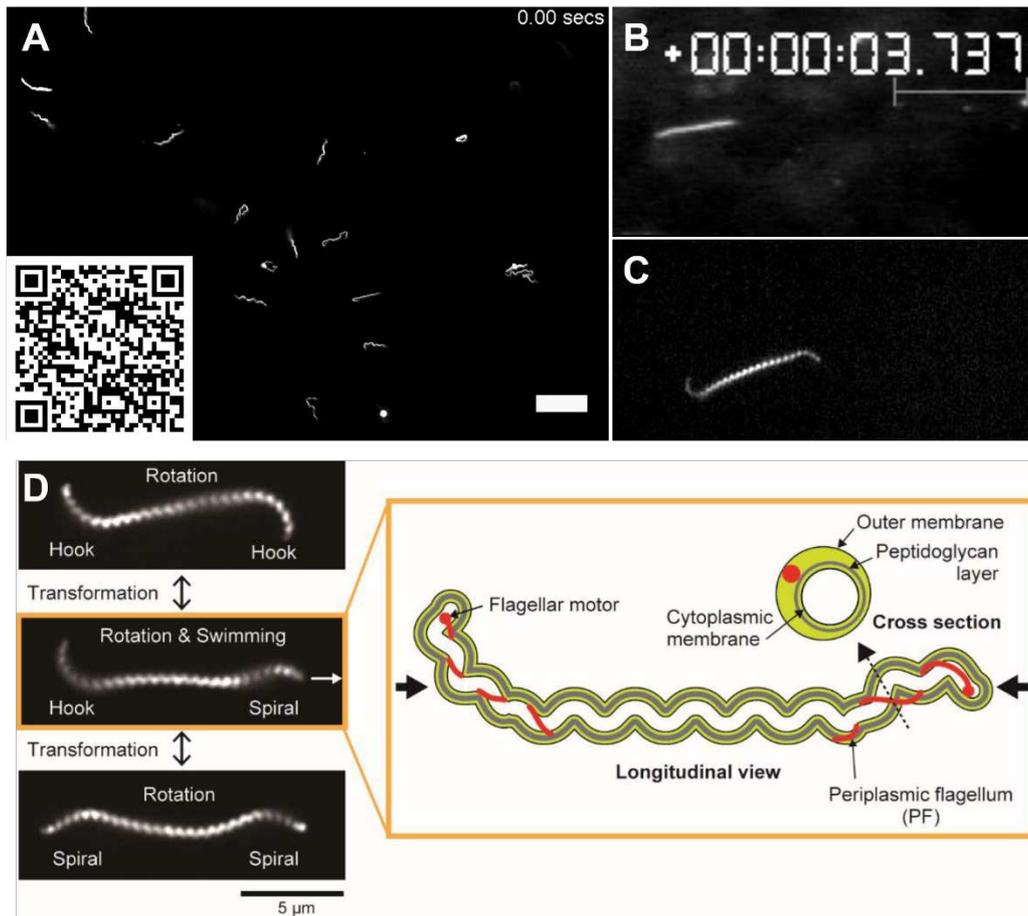


Figure 34 Motilité particulière des spirochètes. (A) motilité de *Borrelia burgdorferi* ; (B) motilité de *Treponema denticola* ; (C) motilité de *Leptospira biflexa* ; (D) détail des conformations cellulaires à l'origine du mouvement chez *Leptospira* et rappel de sa morphologie. Le QR code mène aux vidéos correspondantes aux panneaux A, B et C. Figure et vidéos issues de (321–323).

Le mécanisme par lequel les leptospires contrôlent la conformation des pôles et le changement rapide entre eux est encore peu décrit. Il a été néanmoins démontré que la conformation « crochet » correspondait à la conformation « au repos » due au surenroulement de l'endoflagelle, et que l'interaction de l'endoflagelle avec la membrane interne et le peptidoglycane lors de la rotation des pôles avait des répercussions sur l'ensemble de la cellule (325). Le comportement motile des leptospires est variable selon la viscosité du milieu (**Figure 35**) (326). En milieu liquide, la leptospire avance pendant plusieurs secondes dans une même direction, tandis qu'à la bordure d'un milieu visqueux, elle fait de nombreux aller-retours (**Figure 35-B,C,D**). Ainsi, la leptospire procède par tâtonnement pour trouver le passage idéal dans la maille de l'agar (ou du derme, *in vivo*) (**Figure 35-E**). Il reste à élucider la nature du système responsable des inversions répétées des leptospires pour faciliter l'entrée en milieux visqueux – il pourrait s'agir d'un mécanisme mécanosenseur, qui a été étudié chez *E. coli*, *Vibrio* et *Salmonella* : les stators du moteur flagellaire réagissent aux changements de la

viscosité du milieu – la pression supplémentaire engendrée par un milieu visqueux modifie les liaisons entre les stators et les rotors, ce qui a pour conséquence le recrutement d’unités de stator supplémentaires afin de pallier la résistance ressentie et augmenter la vitesse de déplacement (327–330). Néanmoins, cette hypothèse ne prend pas en compte la transduction du signal mécanique vers l’autre pôle cellulaire afin de provoquer son changement de conformation chez *Leptospira*, nécessaire pour modifier la direction du mouvement comme observé sur le panneau droit de la **Figure 35-B**. Il y a cependant une réponse chimiotactique qui résulte des modifications mécaniques du moteur flagellaire – on pourrait apparenter ce phénomène à la proprioception décrite chez les organismes supérieurs (331,332).

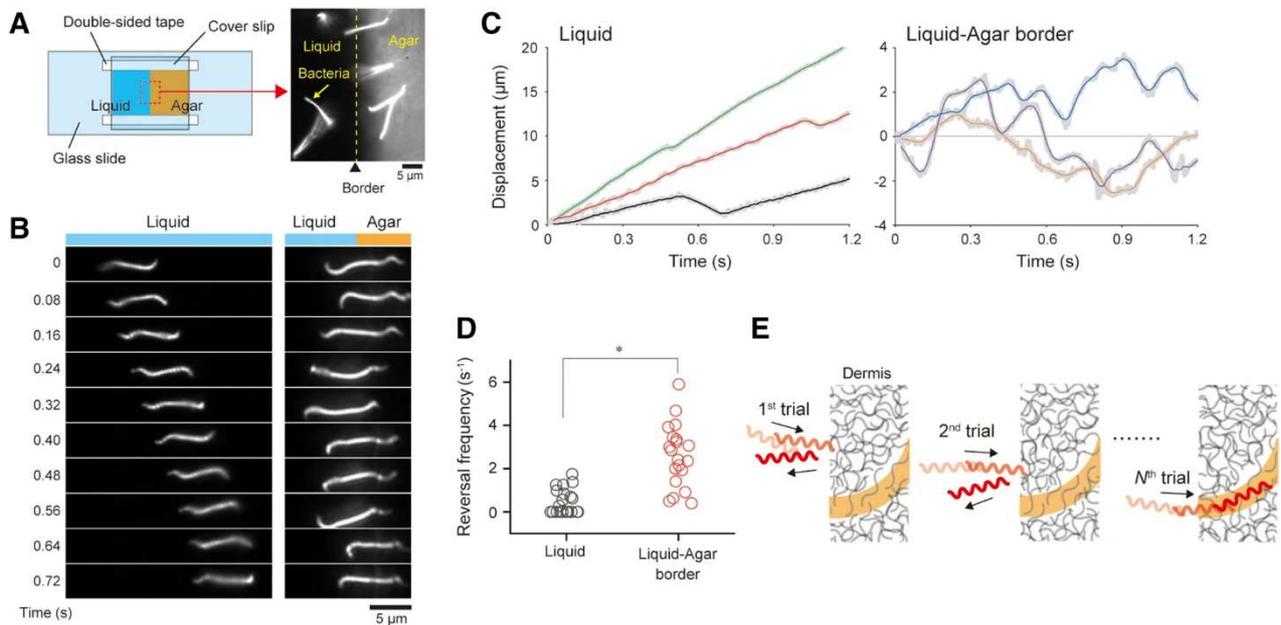


Figure 35 Étude du comportement de motilité de *Leptospira* face à une transition entre environnement liquide et visqueux. (A) Montage expérimental permettant d’évaluer le comportement des leptospires lors de la transition entre un milieu liquide et un milieu visqueux. (B) Clichés de leptospires au cours du temps se déplaçant en milieu liquide (gauche) versus au contact d’un milieu visqueux (droite). (C) Déplacement en μm mesuré au cours du temps en milieu liquide (gauche) et visqueux (droite). (D) Fréquences d’inversions du mouvement. (E) Modèle proposé du mécanisme par tâtonnement des leptospires pour pénétrer le derme. Figure issue de (326).

La caractéristique des spirochètes qui les rend particulièrement invasifs demeure dans leur capacité à progresser dans des milieux visqueux rapidement, alors que cela ralentit les espèces à flagelles externes. En effet, plus la viscosité du milieu augmente, plus la vitesse de déplacement des spirochètes augmente (**Figure 36**) (333–335)

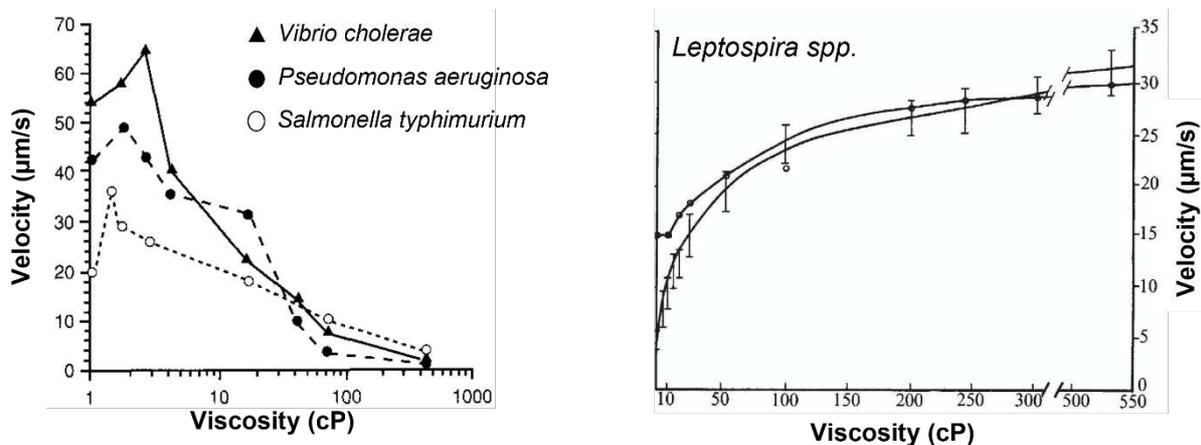


Figure 36 Effet de la viscosité du milieu sur la vitesse de plusieurs espèces bactériennes. *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (panneau gauche) et *Leptospira* spp. (panneau droit). Figures adaptées de (334,335).

6.2.1. Organisation des endoflagelles

Au fil de ce manuscrit, nous avons mis l'accent sur ce que rendait les spirochètes uniques au sein du règne bactérien, et il est désormais temps de se pencher sur leurs flagelles – ou plutôt, endoflagelles – qui résident au sein du périplasme. Comme l'a été mentionné dans le chapitre « morphologie », les corps basaux des endoflagelles sont ancrés dans la membrane interne et le crochet ainsi que le filament s'étendent vers le milieu de la cellule, sans percer la membrane externe et en restant confinés au sein du périplasme (voir **Figure 2**). Ici commencent les premières différences observées au sein des spirochètes : les endoflagelles de *Borrelia*, *Treponema* et *Brachyspira* sont longs et s'entrecroisent au milieu de la cellule et ont un diamètre entre 15 et 20 nm. Ainsi, chaque flagelle mesure un peu plus de la moitié de la taille de la cellule (**Tableau 3**). La longueur exacte des flagelles de *Brachyspira* n'a jamais été évaluée, mais en faisant le parallèle avec *Borrelia* et *Treponema*, on peut supposer qu'ils font environ 6 µm de long (336–338). Purifiés, les flagelles de *Borrelia*, *Treponema* et *Brachyspira* sont droits ou légèrement ondulés (339–341). Ces trois espèces ont aussi en commun la multiplicité de leurs endoflagelles : *Treponema* en possède 2 ou 3 par pôle, et *Borrelia* et *Brachyspira* en ont jusqu'à plus d'une dizaine à chaque pôle, organisés en rubans (**Tableau 3** et **Figure 2**). Les trois spirochètes partagent aussi leur morphologie cellulaire en forme de vague plane (irrégulière pour *Treponema*), avec les endoflagelles faisant partie du cytosquelette (10,342,343). Le quatrième représentant de la famille des spirochètes, *Leptospira*, diffère des

trois autres. En effet, les leptospires ne possèdent qu'un seul endoflagelle à chaque pôle, plus court (environ 3 μm , approximativement le tiers de la taille de la cellule, et 21-23 nm de diamètre) et sous forme surenroulée lorsqu'il est purifié (**Tableau 3**). La morphologie des cellules des leptospires est hélicoïdale tel un tire-bouchon. Cependant, des mutants altérant la structure de l'endoflagelle chez *Leptospira* (rendant le filament flagellaire droit au lieu de surenroulé) conservent l'hélicité de la cellule – les endoflagelles des leptospires ne participent donc pas au cytosquelette de la même façon que *Borrelia*, *Treponema* et *Brachyspira* (135,344,345).

Comment les endoflagelles sont-ils apparus au cours de l'évolution ? Quelles sont les origines de cette diversité ? Quels sont les mécanismes de régulation impliqués dans la mise en place et synthèse des flagelles internes ? Ces questions sont encore d'actualité aujourd'hui, avec seulement peu de réponses disponibles pour les expliquer. La majorité des connaissances à ce sujet proviennent des études réalisées chez *Borrelia*, nous allons donc nous baser sur ce modèle pour apporter des débuts de réponses à ces questions.

L'émergence des flagelles internes lors de l'évolution des bactéries n'est pas encore claire, mais ils sont probablement apparus après les flagelles externes : par exemple, il a été démontré qu'une mutation ponctuelle d'un acide aminé de la protéine de la tige flagellaire FlgG chez *Salmonella* provoquait la croissance des flagelles au sein du périplasme au lieu de percer la membrane externe (346). *Vibrio* et *Helicobacter* possèdent une gaine membranaire autour de leur flagelle, bien qu'ils sont considérés comme « externes » à la cellule (347). De la même manière que *Salmonella*, la délétion des gènes *flgT* et *flgO* qui constituent des éléments du flagelle associés à la membrane externe chez *Vibrio alginolyticus*, le transforme en flagelle périplasmique semblable aux spirochètes (348). Donc, ces espèces possédant une gaine membranaire autour de leur flagelle pourraient être l'intermédiaire évolutif entre les bactéries exoflagellées et les spirochètes.

Species	Strain	Cell			Genome			Endoflagella				Velocity
		Length	Diameter	Morphology	Size	Flagellar genes***	Chemotaxis genes**	Number (per cell)	Length	Diameter	Shape	Liquid culture medium
<i>Borrelia burgdorferi</i>	B31	3-20 µm	0,3 µm	flat wave	1.4 Mb*	43	19	14-22	>5 µm	21 nm	left-handed helix	7 µm/s
<i>Treponema pallidum</i>	SS14	6-15 µm	0,2 µm	flat wave	1.1 Mb	45	11	2-16	ND	16-22 nm	straight, sheathed	2 µm/s
<i>Treponema denticola</i>	ATCC 35405	6-16 µm	0,3 µm	irregular flat wave	2.8 Mb	46	28	2-16	6 µm	15-19 nm	wave-like, sheathed	0 µm/s
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	WA1	4-12 µm	0,3-0,5 µm	flat wave	3.1 Mb	45	61	8-14	ND	18 nm	straight, sheathed	5 µm/s ****
<i>Leptospira biflexa</i>	Patoc 1 (Paris)	6-20 µm	0,15 µm	right-handed helix	3.9 Mb	55	42	2	3 µm	21-23 nm	supercoiled, sheathed	15 µm/s
<i>Leptospira interrogans</i>	Fiocruz L1-130	6-20 µm	0,15 µm	right-handed helix	4.6 Mb	55	29	2	3 µm	21-23 nm	supercoiled, sheathed	11 µm/s

Tableau 3 Caractéristiques principales de plusieurs représentants des spirochètes, incluant la morphologie cellulaire, les spécificités du génome, l'organisation des endoflagelles et la vitesse moyenne en milieu liquide. *plasmides inclus ; **données issues de MiST3 (<https://mistdb.com/>) ; ***gènes identifiés à ce jour ; **** *B. pilosicoli*. Références utilisées pour la compilation de ce tableau : (4,10,23,135,334,342,344,349–360)

Les spirochètes peuvent être considérés comme possédant une flagellation polaire au vu de l'ancrage des corps basaux flagellaires au niveau des pôles de la cellule. Des études génomiques ont révélé que les spirochètes codent aussi pour les déterminants de flagellation polaire, FlhF et FlhG (voir partie 6.1.1. plus haut dans le manuscrit) et sont présents dans le génome chez *Borrelia*, *Treponema* et *Leptospira* avec une organisation du locus très similaire à celle des bactéries exoflagellées (139). Cependant, jusqu'à récemment, aucune connaissance sur la fonction de ces deux protéines n'était connue chez les spirochètes – Zhang et collaborateurs ont étudié le rôle de FlhF chez *Borrelia* qui sera détaillé dans cette partie (361) et je me suis penchée sur la fonction de FlhG chez *Leptospira* dans le cadre de ma thèse, dont les résultats seront discutés au cœur du manuscrit (139). Pour le moment, il s'agit des seules connaissances sur les rôles de FlhF et FlhG chez les spirochètes, et des facteurs associés à l'organisation de la flagellation en général.

Comme le suggèrent les observations faites chez les bactéries à flagelles externes, il semblerait que FlhF et FlhG se sont diversifiés en même temps que leurs partenaires d'interaction dans chaque espèce, menant à des rôles certes toujours impliqués dans l'organisation des flagelles, mais qui peuvent différer au niveau de l'implication de FlhF ou FlhG dans la localisation ou le nombre de flagelles (362). Ainsi, Zhang et ses collaborateurs ont construit un mutant de délétion du gène *flhF* chez *Borrelia burgdorferi* et étudié son phénotype afin d'évaluer son implication dans la flagellation (361). Rien qu'en observant la morphologie cellulaire de ce mutant, ils ont remarqué qu'il présentait une altération de sa forme – les mutants *flhF* sont linéaires au lieu d'adopter une forme de vague plane comme le sauvage (Figure 37-B). En plus de cela, il présente un défaut de croissance et de motilité en milieu semi-solide ainsi que liquide supplémenté par 1% de méthylcellulose, suggérant un effet pléiotrope de cette délétion (Figure 37-A,C).

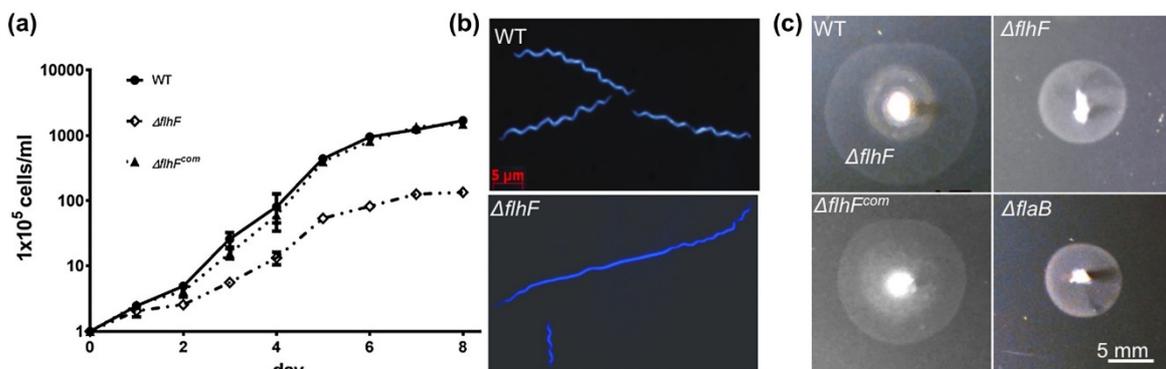


Figure 37 Phénotype de croissance, morphologie et motilité du mutant *flhF* chez *B. burgdorferi*. (A) Courbe de croissance. (B) Clichés de cellules sauvages et mutantes dans *flhF*. (C) Dispersion sur milieu semi-solide des souches sauvages, mutant *flhF*, mutant *flhF* complémenté et mutant *flaB* (contrôle non-motile). Figure issue de (361).

Le défaut de morphologie s'accompagne d'un défaut au niveau de la division : la souche mutante *flhF* croît en chaînettes et présente deux types de morphologies au sein de la population – deux tiers de bactéries longues et droites (environ deux fois la taille du sauvage), et un tiers de petites cellules spiralées (moitié de la taille du sauvage).

Ensuite, les auteurs ont regardé le profil de flagellation du mutant *flhF* par rapport au sauvage. Ils ont découvert par reconstruction cryo-tomographique des cellules que le nombre de flagelles chez le mutant était diminué au niveau des pôles (2 à 6 contrairement à 7 à 11 chez le sauvage) (**Figure 38-L,N**). De plus, les moteurs flagellaires étaient désorganisés avec des distances entre chaque corps basal très variables, alors que chez le sauvage les moteurs sont alignés et régulièrement espacés. La complémentation du mutant *flhF* par la copie sauvage du gène insérée en *trans* a restauré le phénotype sauvage, mais ce n'était pas le cas avec les constructions *flhF* mutées dans leur domaine GTPase – ceci indique que le rôle de FlhF dépend fortement de son activité GTPase. La désorganisation des moteurs flagellaires a aussi eu un effet sur l'intégrité du ruban de filaments flagellaires et leur organisation est plutôt anarchique chez le mutant (**Figure 38-D,E,I,J**).

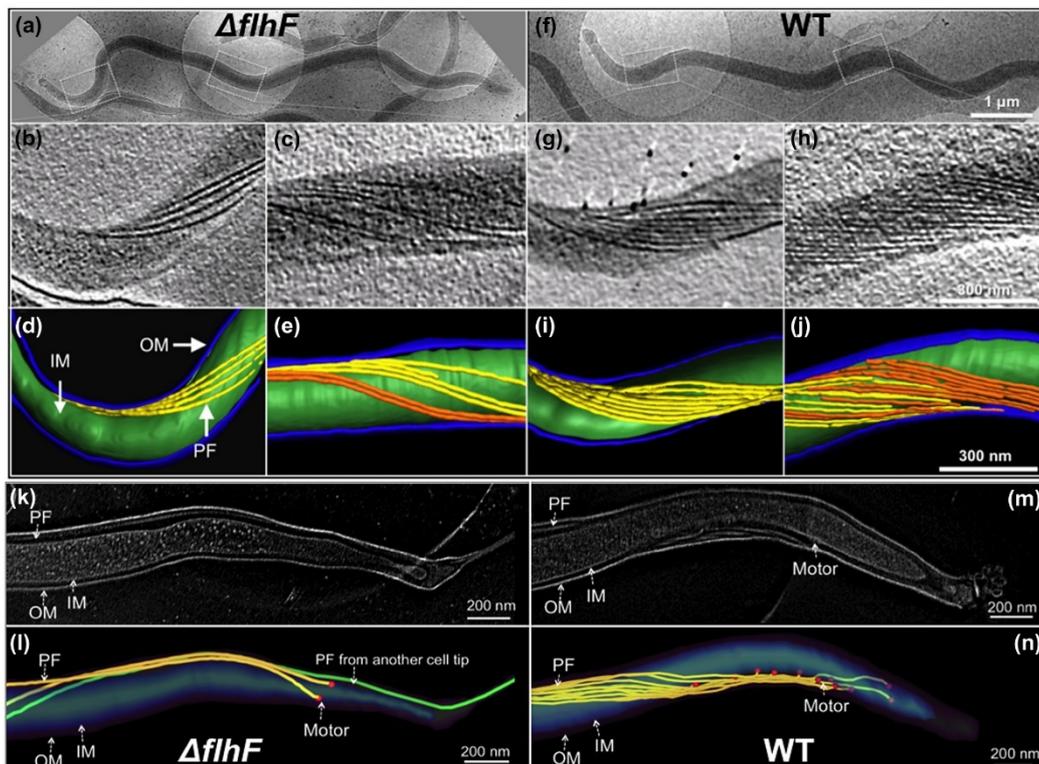


Figure 38 Reconstructions cryo-tomographiques de la morphologie des souches sauvages et mutantes en *flhF* de *B. burgdorferi*. Figure issue de (361).

Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'expression et la stabilité d'autres protéines du flagelle – notamment FliF, FlgG, FlgE et FlaB qu'ils ont choisi comme représentants du MS-ring, de la tige flagellaire, du crochet et du filament, respectivement. L'expression de ces quatre protéines était diminuée de 50 à 75% par rapport au sauvage, ce qui est cohérent avec la diminution du nombre de flagelles observée chez le mutant *flhF* – suggérant, de plus, une implication de FlhF dans la régulation du niveau d'expression des protéines flagellaires. Cela va dans le sens des données obtenues chez *Pseudomonas aeruginosa* par exemple, où FlhF a été confirmée comme régulateur de la transcription de la flagelline FliC (363). Cependant, chez *Borrelia*, la régulation se situe plutôt au niveau traductionnel ou post-traductionnel, car aucune différence significative des niveaux d'ARN messagers n'a été constatée entre le sauvage et le mutant *flhF*. Afin de vérifier cette hypothèse, les auteurs ont évalué la stabilité de ces quatre protéines flagellaires au fil du temps : en effet, la quantité de FliF, FlgG et FlgE diminuait assez rapidement chez le mutant après ajout de spectinomycine à 100 µg/ml afin d'arrêter la production de protéines, mais les quantités de FlaB restaient stables même 12h après l'ajout de l'antibiotique. Ceci peut s'expliquer par la résistance naturelle des flagellines une fois polymérisées face à la dégradation par des protéases (364). Donc, FlhF interviendrait au niveau post-traductionnel (FliF, FlgG, FlgE) et transcriptionnel (FlaB), selon le gène flagellaire considéré.

Finalement, ils ont vérifié la localisation polaire de FlhF par imagerie à fluorescence en complétant le mutant *flhf* par une construction FlhF-GFP et ont obtenu les résultats attendus en concordance avec ce qui a été décrit chez les autres bactéries – c'est-à-dire une localisation polaire. Leur dernière expérience consistait à déterminer si FlhF participait au recrutement du composant du MS-ring, FliF, au niveau des pôles cellulaires comme décrit chez plusieurs autres espèces (240). Pour ce faire, ils ont détecté par immunofluorescence la localisation de FliF chez le mutant et le sauvage – le sauvage présentait des puncta intenses au niveau des pôles, alors que chez le mutant *flhf* leur intensité était plus faible et étaient moins nombreux, confirmant une implication de FlhF dans le recrutement de FliF en plus du contrôle de sa stabilité.

Ces résultats suggèrent donc que FlhF exerce bien un rôle au niveau de la régulation spatio-numérique des flagelles chez *Borrelia burgdorferi*. De manière intéressante, il semblerait que FlhF endosse les fonctions de FlhF et FlhG à elle seule : cependant, les auteurs n'ont pas étudié l'effet de la délétion de *flhF* sur l'expression de *flhG* situé juste en aval et

certainement en opéron avec ce dernier comme c'est le cas chez les bactéries exoflagellées. Il est fort probable que l'expression de *flhG* soit diminuée, donc le phénotype observé chez le mutant *flhF* de *Borrelia* serait en réalité un double mutant *flhF-flhG*. Des études supplémentaires visant à évaluer le rôle de FlhG chez *Borrelia* seraient utiles afin de distinguer la spécificité des fonctions de FlhF et FlhG séparément.

6.2.2. Composition et assemblage des endoflagelles

Les spirochètes se distinguent des bactéries exoflagellées par la complexité de la structure de leurs endoflagelles, en plus de leur situation au sein du périplasme : en effet, le corps basal est plus grand en taille (environ 80 nm de diamètre chez *Borrelia* contre environ 45 nm chez *E. coli*) et leurs filaments sont composés à minima de deux protéines, une protéine de cœur et une formant une gaine protéique autour du filament. Le nombre de protéines du filament peut dépasser la dizaine dans le cas de *Leptospira*. Cette complexité est probablement liée aux vitesses élevées que subissent les flagelles des spirochètes lors de leurs déplacements en milieux visqueux. Dans cette partie, nous allons mettre en avant les principales différences entre les spirochètes et les bactéries à flagelle externe, mais aussi prendre en compte la variabilité présente au sein même du phylum des Spirochaetes.

6.2.2.1. Corps basal

Le corps basal des spirochètes est limité au niveau de la membrane interne et du peptidoglycane au sein du périplasme (**Figure 39-A**). Les forces élevées que les endoflagelles subissent se reflètent dans la complexité de la structure du moteur flagellaire, notamment par la présence de structures uniques aux spirochètes tel que le collar. Comme dans le chapitre dédié aux bactéries exoflagellées, nous allons décrire les différentes structures de l'endoflagelle, puis discuter des connaissances actuelles sur leur assemblage chronologique et la régulation de l'expression des gènes flagellaires.

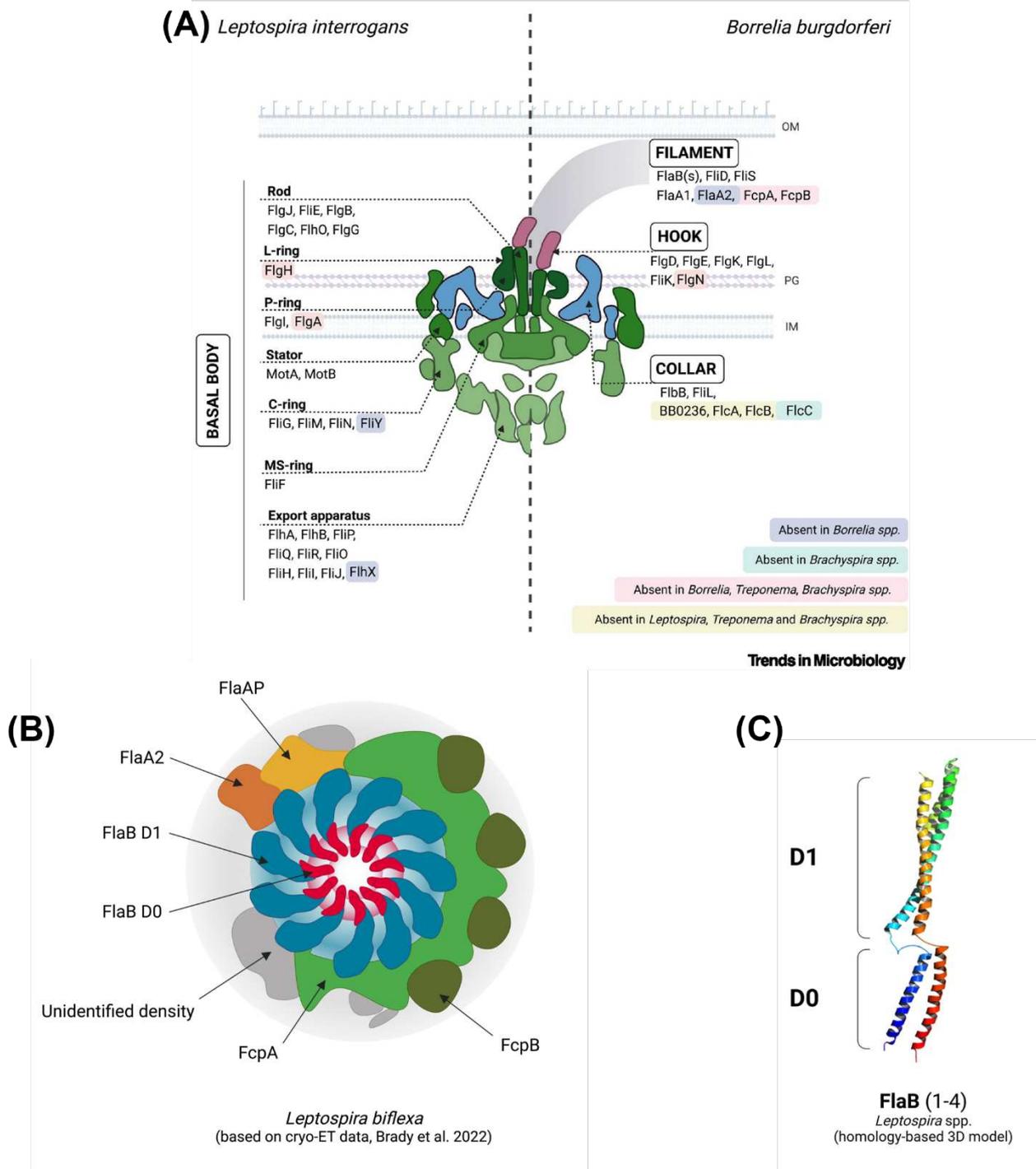


Figure 39 Représentations schématiques du corps basal, du filament et de la flagelline principale des spirochètes. (A) Schéma des corps basaux de *L. interrogans* et *B. burgdorferi*. Les éléments absents chez les autres espèces de spirochètes sont indiqués par le code couleur décrit dans la légende. (B) Schéma de la coupe transversale du filament de *L. biflexa*. (C) Modélisation en 3D de la structure de la flagelline FlaB de *Leptospira*. Figure issue de (272).

6.2.2.1.1. Système de sécrétion

Le système de sécrétion étant fortement conservé chez toutes les espèces bactériennes, celui des spirochètes n'échappe pas à la règle et on retrouve les orthologues des six protéines transmembranaires décrites précédemment, à savoir FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR, ainsi que du complexe ATPase cytoplasmique composé de FliH, FliI et FliJ (157,272) (**Figure 39-A**). Cependant, certaines différences par rapport aux bactéries entériques sont à noter au niveau du complexe ATPase : par exemple, le complexe ATPase de *B. burgdorferi* possède un nombre plus important d'unités de FliH qui, pour rappel, sert de lien entre FliL et le C-ring (365). FlhX, qui est un substituant du domaine C-terminal de FlhB chez *Helicobacter pylori* est également retrouvé chez les spirochètes, bien que sa fonction reste inconnue (366). Contrairement aux entérobactéries, le complexe FliH-FliL n'est pas responsable de l'export des protéines de la tige, crochet et filament flagellaire, mais les mutants de délétion de ce duo de gènes chez *B. burgdorferi* et *B. hermsii* présentaient des défauts de motilité (367,368). Finalement, la taille supérieure du complexe ATPase cytoplasmique des spirochètes par rapport à celui des entérobactéries suggèrent l'existence de nouvelles protéines encore non identifiées à ce jour (22,365).

6.2.2.1.2. MS- et C-ring

Le MS-ring des spirochètes est sensiblement similaire à celui des bactéries exoflagellées : ancré dans la membrane interne et composé d'un anneau de plusieurs unités de la protéine FliF (**Figure 39-A**). Le C-ring qui contient le rotor et l'interrupteur rotationnel du flagelle est également composé des protéines FliG et FliM. Cependant, bien que la plupart des bactéries expriment exclusivement soit FliN, soit FliY, de la même manière que *Helicobacter* ou *Campylobacter*, *Leptospira* produit les deux (369,370). Les études effectuées chez *Campylobacter* démontrent que FliN et FliY remplissent des rôles différents au sein du C-ring, il en est probablement ainsi chez les leptospires aussi. Les mutants *fliY* et *fliM* chez *L. interrogans* sont atténués en virulence et présentent un défaut de motilité (137,138). FliG, en lien étroit avec les stators, est généralement présent en une seule copie dans le génome, mais les spirochètes codent deux isoformes, voire trois chez *Leptospira*. Chez *B. burgdorferi*, Le C-ring accueille uniquement FliG2 et la délétion de *fliG1* n'affecte pas la formation des flagelles, mais la motilité en milieu visqueux est toutefois altérée (273,371).

6.2.2.1.3. P- et L-ring

La protéine FlgI du P-ring est présente chez plusieurs genres de la famille des spirochètes, notamment *Leptospira*, *Leptonema*, *Turneriella* et *Borrelia* (**Figure 39-A**). Cependant, la protéine chaperon associée à la formation du P-ring, FlgA, n'est présente que chez *Leptospira*. Chez *Borrelia*, FlgI est essentielle à l'assemblage du crochet et du filament (372). Le L-ring constitué de la protéine FlgH n'est retrouvé que chez *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneriella* – néanmoins, elle ne remplit pas la fonction décrite chez les bactéries à Gram négatif, à savoir la formation d'un pore au niveau de la membrane externe afin de permettre la sécrétion des protéines du crochet et du filament. Il doit probablement s'agir d'un vestige conservé chez les spirochètes après la transition du flagelle externe vers l'endoflagelle (271).

6.2.2.1.4. Stator

La taille supérieure du corps basal des spirochètes comparé aux bactéries entériques s'explique également par le fait que 16 unités de stator ont été décomptées chez *Borrelia*, alors que les bactéries exoflagellées n'en présentent pas plus de 12 – on peut associer cette particularité au fort torque que génèrent les endoflagelles des spirochètes (273) (**Figure 39-A**). *Leptospira* se démarque des autres spirochètes par la présence de deux copies pour MotA (MotA/MotA2) ainsi que pour MotB (MotB/MotB2). Cette redondance permet probablement à *L. biflexa* d'utiliser des ions sodium (Na^+) ainsi que des protons (H^+) pour générer la force motrice (373). Enfin, une protéine présente chez tous les spirochètes, FlbD, homologue à la protéine SwrD (« swarming motility protein D ») de *Bacillus subtilis* pourrait être responsable de l'augmentation de la puissance du moteur flagellaire, comme l'est décrit chez *B. subtilis* (374).

6.2.2.1.5. Collar

Le collar (ou collier) est une structure unique aux spirochètes qui se situe au niveau de la membrane interne et du peptidoglycane, entre les stators et le MS-ring (**Figure 39-A**). Le collar interagit avec FliL, qui à son tour interagit avec le rotor, mais la fonction exacte de FliL est encore méconnue (375,376). Le collar est une structure d'une taille relativement conséquente : chez *B. burgdorferi*, elle mesure environ 70 nm de diamètre sur 25 nm de haut. Peu de choses sont connues à ce jour sur la fonction du collar – ce n'est que récemment que plusieurs protéines le composant ont été identifiées chez *B. burgdorferi*. Parmi elles, on compte BB0326 (ou FlcA, pour « flagellar collar protein A »), BB0286 (FlbB), BB0236, BB0058 (FlcB), et BB0624 (FlcC) (377–380). La localisation de FlcA a pu être déterminée par la

combinaison des techniques de cryo-tomographie et d'interactions protéine-protéine : elle se situe en proche association avec la membrane interne et se replie en une structure en forme de turbine. FlcB forme un anneau à la base du collar et FlcC se pose juste au-dessus, FlbB se place au centre de la structure du collar et finalement, BB0236 s'assemble sur FlbB (378,380). L'étude des phénotypes des mutants de délétion de ces composants du collar a pu apporter quelques indices sur le rôle de cette structure : les mutants produisaient des endoflagelles plus courts, moins nombreux et anormalement orientés vers les pôles cellulaires (377). On peut remarquer sur la **Figure 39-A** que les collars de *L. interrogans* et *B. burgdorferi* ont des organisations assez différentes – et effectivement, il se trouve que les protéines du collar sont très peu conservées entre les espèces, suggérant que chacune possède ses propres alternatives pour le moment inconnues.

6.2.2.2. Tige, crochet et filament

La tige flagellaire chez les spirochètes est composée des mêmes protéines que chez les autres bactéries, à l'exception de FlgF (région proximale), qui est remplacée par son orthologue FlhO (381) (**Figure 39-A**). De plus, la coiffe protéique FlgJ est composée uniquement de son domaine N-terminal, le domaine muramidase nécessaire à la pénétration du peptidoglycane est absent, et donc probablement exprimé sur une autre protéine (377). Il semblerait qu'à l'inverse des bactéries exoflagellées, la lyse du peptidoglycane ne soit pas essentielle à la formation du flagelle. Néanmoins, une protéine à fonction glycosyltransférase lytique a été identifiée chez *B. burgdorferi*, qui interagit visiblement avec FlgJ et permet la pénétration du peptidoglycane (377).

Le crochet des spirochètes quant à lui présente un trait totalement inédit : les unités de FlgE créent entre elles des liaisons lysoalanine covalentes par un mécanisme d'autocatalyse. Le complexe de haut poids moléculaire ainsi formé est d'une stabilité et rigidité exceptionnelle, sans doute un moyen qu'usent les spirochètes pour résister au stress mécanique élevé de la rotation du moteur (382,383). Hormis cela, l'assemblage du crochet est un mécanisme relativement conservé, à l'exception de la protéine chaperon FlgN de la jonction crochet-filament qui n'est présente que chez *Leptospira*. Les autres spirochètes remplissent cette fonction à l'aide de protéines chaperon à large spectre de substrats, tel que FliS (381,384).

A l'origine, les filaments des spirochètes étaient imaginés comme une structure composée d'un cœur de flagellines (FlaBs) entourées d'une gaine protéique symétrique (FlaAs), mais les données structurales récentes vont à l'encontre de cette hypothèse initiale et

démontrent un assemblage asymétrique de la gaine flagellaire (135,360,385). Les deux familles de protéines sont essentielles à la motilité et à la virulence chez de nombreux spirochètes (136,194,337,340,341,386,387). Les filaments de spirochètes sont habituellement composés d'une à quatre flagellines FlaB (**Tableau 4**), qui sont orthologues à la flagelline FliC de *Salmonella* ou *E. coli* (**Figure 39-B**). Cela dit, les FlaBs ne possèdent pas les domaines D2 et D3 de FliC qui sont orientés vers la face externe du filament chez *Salmonella* – l'homologie réside uniquement au niveau des domaines D0 et D1 (**Figure 29-B,C** et **Figure 39-C**). Les domaines D0 et D1 sont responsables de la polymérisation du filament et celui des spirochètes respecte la structure hélicoïdale composée de 11 protofilaments observée chez les autres bactéries. Le cœur flagellaire est entouré d'une gaine composée d'une ou deux FlaAs – ces deux homologues, FlaA1 et FlaA2, ont été identifiés relativement tôt dans l'étude des spirochètes, même s'ils ne partagent qu'environ 30% d'homologie de séquences (385). Ils sont organisés en opéron, probablement issus d'une ancienne duplication de gènes suivie d'une diversification importante de leurs séquences (136). *Brevinema*, *Brachyspira*, *Treponema* et *Spirochaeta* possèdent un troisième homologue de FlaA, de même pour *Leptospira* mais l'homologie de séquences est tellement faible qu'il est nécessaire de réaliser des études plus poussées pour confirmer leur nature, et s'il s'agit de protéines exprimées et associées au filament. En plus des FlaA, les Leptospiraceae possèdent des protéines de gaine qui leur sont spécifiques : historiquement, les premières à avoir été identifiées sont FcpA et FcpB pour « flagellar coiling proteins A/B », ne présentant aucune homologie entre elles (135,359). FcpA se distingue aussi par un repliement protéique inédit, absent jusqu'à lors dans la base de données Protein Data Bank. Les deux protéines se fixent de manière asymétrique du côté convexe du filament et intensifient ainsi sa courbure, essentielle au bon fonctionnement du flagelle (**Figure 39-B**) (135,359,360,388). La face concave de la gaine est probablement recouverte des protéines FlaA2 et FlaA1, même si les données de cryo-tomographie ne sont pas encore suffisamment résolutes pour placer FlaA1 sur la structure du filament (360,388). D'autres protéines de la gaine flagellaire restent à être identifiées, représentées par les densités de couleur grise sur le schéma de la Figure 39-B. L'une d'entre elles, FlaAP (« FlaA associated protein ») a récemment rejoint la structure du filament de *L. biflexa* (388). Des travaux extensifs sont en cours pour compléter la structure en retrouvant les protéines manquantes, probablement encore annotées comme protéines hypothétiques. Les protéines de la gaine du filament sont exportées par la voie de sécrétion SecA, car des peptides signal ont été identifiées en N-terminal de chacune d'entre elles.

component	<i>L. interrogans</i> str L495	Localization	<i>B. burgdorferi</i> str B31	<i>T. pallidum</i> str SS14
FlaB1	LIMLP_09410	core		TPASS_0870
FlaB2	LIMLP_09405	core		TPASS_0868
FlaB3	LIMLP_07480	core		
FlaB4	LIMLP_07475	core	BB0147	TPASS_0792
FlaA1	LIMLP_13775	sheath	BB0668	TPASS_0663
FlaA2	LIMLP_13780	sheath		TPASS_0664
FcpA	LIMLP_01630	sheath		
FcpB	LIMLP_09180	sheath		

Tableau 4 Liste des composants du filament flagellaire chez *L. interrogans*, *B. burgdorferi* et *T. pallidum*.

6.2.2.3. Assemblage et régulation

Les seules données concernant l'assemblage de la machinerie de l'endoflagelle proviennent des études chez *B. burgdorferi* (376,381). Globalement, la chronologie des événements est assimilable à celle des bactéries exoflagellées : dans un premier temps sont assemblés le système de sécrétion, le C- et MS-ring, les stators et l'élément unique aux spirochètes, le collar (**Figure 40**). Ensuite viennent les protéines de la tige proximale et distale, suivies du P-ring (et L-ring chez *Leptospira*) et de la coiffe du crochet. S'en suit la constitution du crochet dont les monomères se lient de manière covalente entre elles, puis se crée la jonction crochet-filament, et finalement sont sécrétées toutes les protéines du filament.

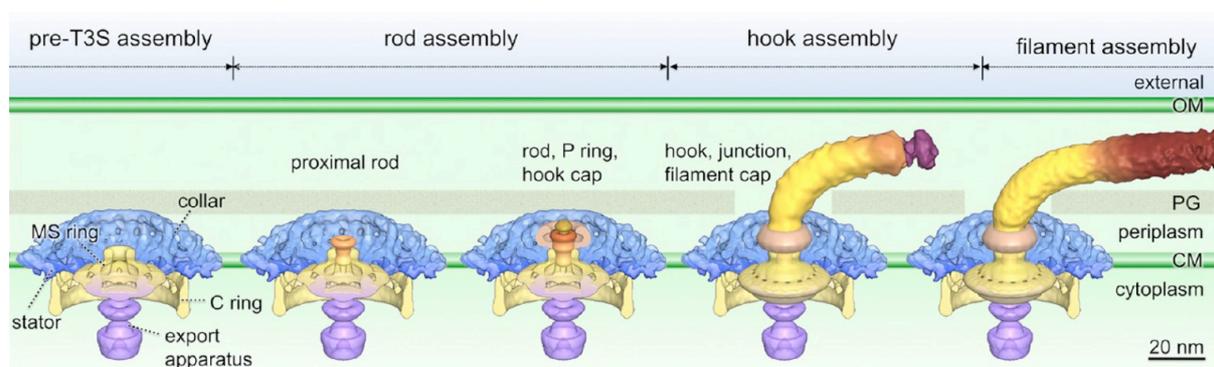


Figure 40 Assemblage de l'endoflagelle de *B. burgdorferi*. Figure issue de (376).

Quant à la régulation de l'expression des gènes flagellaires chez les spirochètes, peu de choses sont connues à ce jour. Le mécanisme de régulation ne correspond pas au schéma des bactéries exoflagellées, avec une répartition claires des opérons flagellaires en trois classes, régulées par les facteurs sigma 70 et 28 ainsi que le régulateur maître FlhDC (voir chapitre 6.1.2.3.). Notamment, *B. burgdorferi* ne possède qu'un seul facteur sigma pour réguler la transcription des gènes – σ^{70} , aussi appelé SigA ou RpoD (389). De ce fait, la plupart des gènes flagellaires semblent être exprimés de manière constitutive et leur régulation aurait plutôt lieu

à un niveau post-transcriptionnel (367,389). La complétion réussie des structures primaires du corps basal (MS-ring, C-ring, les stators et le système de sécrétion) déclenche la transcription et production des protéines flagellaires de la tige, du P-ring et du crochet (**Figure 40**). Tous les spirochètes à part *Borrelia* possèdent le facteur sigma alternatif σ^{28} (FliA ou RpoF), et son facteur anti-sigma associé FlgM, suggérant que des mécanismes de régulation plus ou moins similaires à ceux des bactéries exoflagellées entrent en jeu, mais nous ne possédons pas les données pour pouvoir le confirmer (390). FlhF et FlhG semblent aussi entrer en jeu lors de la régulation de la transcription de certains gènes flagellaires chez *Borrelia* et *Leptospira* (139,361). Le régulateur de stockage du carbone, CsrA a récemment prouvé son implication dans la régulation de l'expression de certaines flagellines, chez *Borrelia* comme chez *Leptospira* (391,392). Finalement, il faut noter le rôle non négligeable du messenger secondaire – le di-GMP cyclique – dans le contrôle de la motilité de plusieurs spirochètes, dans certains cas au niveau des interactions protéine-protéine (153,393–395).

L'ensemble de ces informations sur les composants des endoflagelles chez les spirochètes est regroupé dans une revue dans Trends in Microbiology, « Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum » où je suis co-première auteure (texte intégral disponible en **Annexe 1**)

6.2.3. Chimiotactisme

Les bases du chimiotactisme des spirochètes ont été posées chez *B. burgdorferi* (389). Les spirochètes possèdent entre 10 et 60 gènes associés au chimiotactisme, annotés de manière automatique par homologies de séquences (voir **Tableau 3**) (182,396). Les chémorécepteurs (MCPs) des spirochètes sont situés à proximité des moteurs flagellaires, à l'inverse de ce qui a été décrit chez les entérobactéries, chez qui on les retrouve au pôle opposé au flagelle (voir **Figure 2**) (397). Les mutants de gènes du chimiotactisme chez *B. burgdorferi* ont souvent présenté un défaut de motilité, principalement des difficultés à changer de direction en présence d'attractants, comme par exemple le mutant $\Delta cheX$ (homologue de la protéine régulatrice de réponse CheY) qui était bloqué dans un mouvement perpétuel de flexion et ne pouvait pas générer de mouvement translationnel (375,398–402).

Jusqu'en 2014, aucun mutant de chimiotactisme n'a été étudié chez les leptospires, seulement des expressions hétérologues dans *E. coli* ont été réalisées dans ce but (403–405). Les raisons derrière ce manque de données étaient principalement dues à l'absence d'outils

d'études du chimiotactisme adéquats. Ambroise Lambert, à l'époque étudiant en thèse au sein du laboratoire, a mis en place une étude du chimiotactisme par essais capillaires : le principe consiste à présenter des leptospires motiles et cultivées dans un milieu dépourvu de tout attractant à des capillaires remplis de substances attractantes putatives. Au bout d'un certain temps d'incubation, les capillaires sont récupérés et le nombre de leptospires ayant progressé dans le capillaire est évalué – plus la concentration bactérienne est élevée, plus la substance constitue un attractant efficace (406,407). Il a ainsi pu identifier plusieurs attractants de leptospires jusqu'à lors non définis, dont le pyruvate ou l'acide palmitique, mais aussi de noter une différence significative entre le comportement chimiotactique des souches pathogènes et saprophytes (406). Depuis, quelques études ont permis de creuser les mécanismes du chimiotactisme de *Leptospira*, mais nous sommes malheureusement encore loin d'avoir l'image complète derrière le chimiotactisme particulier des spirochètes (408–410).

Objectifs de la thèse

La motilité est un élément indissociable de la vie, permettant aux organismes de partir à la recherche de niches environnementales riches en nutriments et fuir les éventuels dangers. En ce qui concerne les bactéries, la motilité est aussi étroitement liée à leur pathogénicité – comprendre son fonctionnement nous fournit des pistes à explorer pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme l'utilisation de souches non motiles dans la formulation d'un vaccin, par exemple.

Depuis l'essor des sciences en microbiologie, *Escherichia coli* a été considérée comme le représentant de la physiologie bactérienne, notamment pour la facilité à travailler avec. De ce fait, une majorité des outils de manipulation génétique ont été développés en se basant sur ce modèle. Cependant, il est de plus en plus évident qu'aucune bactérie ne se ressemble et que chaque espèce devrait être étudiée sous toutes ses coutures afin de dévoiler l'incroyable diversité du règne bactérien.

Les spirochètes illustrent parfaitement l'ampleur des différences présentes au sein des bactéries : leur morphologie en forme de spirale et la présence de flagelles à l'intérieur de la cellule.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes de motilité en se basant sur le modèle de l'endoflagelle de *Leptospira* spp. – chez l'espèce saprophyte (*L. biflexa*) ainsi que la pathogène (*L. interrogans*). Le choix d'utiliser cette bactérie modèle en particulier se justifie par l'absence de connaissances approfondies sur la motilité des leptospires, à l'inverse de l'agent de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, qui est mieux étudié à ce sujet, en partie grâce à la mise en place d'outils de manipulation et d'analyse plus élaborés.

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur les similarités et divergences au niveau de la composition de l'endoflagelle au sein du phylum des Spirochaetes grâce à une étude génomique comparative décrite en fin d'introduction. La première partie de ce manuscrit sera consacrée à l'évaluation du rôle du déterminant spatio-numérique des endoflagelles, FlhG, et la seconde partie traitera la structure du filament flagellaire atypique en se basant sur l'étude phénotypique d'un mutant de la flagelline majoritaire, FlaB1.

Avec l'ensemble de ces résultats, nous espérons apporter de nouvelles notions utiles à la compréhension de la motilité et physiologie des leptospires.

Résultats

Chapitre 1 : Le rôle du déterminant majeur de la flagellation polaire, FlhG, chez *Leptospira* spp.

FlhG, en complément de son partenaire FlhF avec qui elle est en opéron, déterminent la localisation et le nombre corrects des flagelles au niveau de la cellule bactérienne, peu importe leur distribution finale – polaire, amphitriche ou péritriche.

Chez *Borrelia*, FlhF a été identifiée comme responsable de la numération des endoflagelles : le mutant de délétion $\Delta flhF$ présentait un nombre diminué de flagelles, mais dont les corps basaux sont toujours localisés aux pôles cellulaires (voir **Figure 38** de l'introduction). Comme *Leptospira* ne possède qu'un seul endoflagelle par pôle, nous souhaitons déterminer si le rôle de FlhF-FlhG était comparable à celui décrit chez les autres bactéries.

Ce projet est né au sein du laboratoire il y a déjà plusieurs années, initié par Ruben Halifa qui a identifié un mutant d'insertion dans le gène *flhG* chez *L. biflexa* lors du crible d'une banque de mutants par transposition. Ce mutant présentait un défaut de motilité sur milieu gélosé semi-solide – ceci a servi comme premier indice que *flhG* jouait bel et bien un rôle dans la motilité des leptospires.

Néanmoins, l'histoire s'est avérée plus compliquée qu'il n'y paraît : le défaut de motilité semblait être l'unique phénotype clair de ce mutant. Effectivement, la motilité en milieu liquide n'était pas impactée et le marquage des flagelles par immunofluorescence a montré que le mutant possédait au minimum un flagelle à chaque pôle, semblablement au sauvage.

Ce n'est qu'en comparant les transcriptomes du mutant *flhG* et de la souche sauvage que nous avons pu observer une légère augmentation (facteur 2) de l'expression au niveau des gènes impliqués dans la synthèse des éléments de la tige et du crochet de l'endoflagelle, suggérant une implication directe ou indirecte de FlhG dans la modulation de l'expression de cette famille de gènes. Entre autres, le transcriptome a révélé un fort effet polaire (diminution de l'expression d'un facteur 30) sur le gène en aval de l'opéron *flhF-flhG* – ce gène de fonction inconnue, LEPB1a_0945, coderait une protéine chaperon de type Hfq identifiée par homologie de séquences avec l'équivalent chez *Borrelia burgdorferi*. Afin de déterminer si cette diminution de l'expression participait au phénotype de motilité, le mutant de délétion $\Delta LEPB1a_0945$ a été construit par échange allélique, puis son phénotype et son transcriptome ont été analysés. Premièrement, le mutant $\Delta LEPB1a_0945$ ne présentait aucun défaut de motilité. Ensuite, par comparaison des familles de gènes dérégulés dans les transcriptomes respectifs des mutants $\Delta LEPB1a_0945$ et *flhG*, nous avons remarqué que leur profil de dérégulation était totalement différent, avec une majorité de dérégulations dans les gènes de motilité pour *flhG*, et dans les gènes codant les protéines chaperon pour $\Delta LEPB1a_0945$. Ces résultats nous ont confortés dans

l'hypothèse que le phénotype de motilité observé chez le mutant était dû uniquement à la disruption du gène *flhG*. De plus, les données de modélisation ont montré que contrairement à celles de la publication chez *Borrelia*, LEPB1a_0945 ne présentait pas une structure correspondant à une protéine de type Hfq.

Enfin, le mutant par transposition *flhG* chez la souche pathogène, *L. interrogans*, nous a confirmé le phénotype de motilité altéré observé chez le saprophyte – ces défauts se sont traduits par une abolition de la virulence lors de l'infection chez le hamster et une capacité diminuée à traverser les barrières épithéliales. Bien que cela renforce l'hypothèse de l'implication de FlhG dans la motilité des leptospires, le mécanisme exact à l'origine du défaut restait encore un mystère à ce stade.

Grâce à la reconstruction par cryo-tomographie de la morphologie cellulaire des mutants *flhG* et du sauvage, un indice supplémentaire nous a été révélé : le corps basal de l'endoflagelle des mutants se situait plus proche de l'extrémité des pôles cellulaires comparé à la souche sauvage. De part ces observations, nous avons pu évoquer l'hypothèse que FlhG participait à la localisation correcte des corps basaux des endoflagelles au niveau des pôles cellulaires, comme proposé chez certains modèles bactériens, bien que le phénotype observé soit moins flagrant. Cette légère délocalisation du corps basal engendre probablement une déformation anormale de la cellule lors de la rotation du moteur endoflagellaire, diminuant ainsi la performance des leptospires à progresser dans des milieux visqueux.

L'étude des mutants *flhG* chez les souches saprophytes et pathogènes de *Leptospira* nous ont permis d'élucider, en partie, le rôle de FlhG dans la localisation des endoflagelles au niveau polaire. Il reste cependant à explorer le mécanisme exact permettant de déterminer le positionnement du corps basal ainsi que les systèmes de régulation inhérents. De plus, il serait intéressant d'étudier un mutant *flhF* chez *Leptospira* pour mieux comparer son rôle avec ce qui a été décrit chez *Borrelia*, mais pour le moment les tentatives de mutagenèse dirigée ont été infructueuses.

Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira*

Lenka Fule^{1,2,3} | Ruben Halifa¹ | Celia Fontana⁴ | Odile Sismeiro⁵ | Rachel Legendre^{5,6} | Hugo Varet^{5,6} | Jean-Yves Coppée⁵ | Gerald L. Murray⁷ | Ben Adler⁷ | David R. Hendrixson⁸ | Alejandro Buschiazzi^{9,2} | Shuaiqi Guo¹⁰ | Jun Liu¹⁰ | Mathieu Picardeau ^{1,2}

¹Institut Pasteur, Biology of Spirochetes Unit, Paris, France

²Pasteur International Unit, Integrative Microbiology of Zoonotic Agents, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay/Institut Pasteur, Paris, France

³Université de Paris, Paris, France

⁴Boehringer Ingelheim Santé Animale, Saint Priest, France

⁵Transcriptome and Epigenome Platform, Biomix, Center for Technological Resources and Research (C2RT), Institut Pasteur, Paris, France

⁶Bioinformatics and Biostatistics Hub, Department of Computational Biology, Institut Pasteur, Paris, France

⁷Infection and Immunity Program, Monash Biomedicine Discovery Institute and Department of Microbiology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia

⁸Department of Microbiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

⁹Laboratory of Molecular and Structural Microbiology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

¹⁰Microbial Sciences Institute & Department of Microbial Pathogenesis, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

Correspondence

Mathieu Picardeau, Institut Pasteur, Biology of Spirochetes Unit, Paris, France.
Email: mpicard@pasteur.fr

Present address

Celia Fontana, Evotec ID (Lyon) SAS, Lyon, France

Funding information

Pasteur International Unit; Foundation for the National Institutes of Health, Grant/Award Number: R01AI065539; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Grant/Award Number: R01AI087946; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: 18-CE15-0027-01

Abstract

Spirochetes can be distinguished from other bacteria by their spiral-shaped morphology and subpolar periplasmic flagella. This study focused on FlhF and FlhG, which control the spatial and numerical regulation of flagella in many exoflagellated bacteria, in the spirochete *Leptospira*. In contrast to *flhF* which seems to be essential in *Leptospira*, we demonstrated that *flhG*⁻ mutants in both the saprophyte *L. biflexa* and the pathogen *L. interrogans* were less motile than the wild-type strains in gel-like environments but not hyperflagellated as reported previously in other bacteria. Cryo-electron tomography revealed that the distance between the flagellar basal body and the tip of the cell decreased significantly in the *flhG*⁻ mutant in comparison to wild-type and complemented strains. Additionally, comparative transcriptome analyses of *L. biflexa flhG*⁻ and wild-type strains showed that FlhG acts as a negative regulator of transcription of some flagellar genes. We found that the *L. interrogans flhG*⁻ mutant was attenuated for virulence in the hamster model. Cross-species complementation also showed that *flhG* is not interchangeable between species. Our results indicate that FlhF and FlhG in *Leptospira* contribute to governing cell motility but our data support the hypothesis that FlhF and FlhG function differently in each bacterial species, including among spirochetes.

KEYWORDS

endoflagellum, FlhG, *Leptospira*, motility, spirochetes

1 | INTRODUCTION

The phylum Spirochaetes consists of a large group of bacteria that are widespread in the environment and also the causative agents of many important diseases including syphilis, leptospirosis, and Lyme disease. Spirochetes have a flat-wave or helical cell morphology and internal flagella, also called endoflagella, inserted sub-terminally at both poles of the cell and extending their filaments within the periplasm. These unique morphological features confer spirochetes powerful swimming capabilities that enable them to swim in highly viscous gel-like media that typically slow down or stop the motility of exoflagellated bacteria (Charon & Goldstein, 2002). The subsurface localization of the filament also mediates evasion from the TLR5-flagellin recognition pathway (Holzapfel et al., 2020). These motile bacteria can thus rapidly disseminate through connective tissue, blood, and all organs; accordingly, motility is a key virulence determinant for pathogenic spirochetes (Lambert et al., 2012; Li et al., 2010; Sultan et al., 2015; Wunder Jr et al., 2016).

The overall architecture of spirochetal endoflagella is similar to the exoflagella from the extensively studied model bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Briefly, these appendages comprise three main structures: the basal body which functions as a rotary molecular motor enabling the flagellum to rotate, the hook coupling the basal body to the filament and the filament, a very long extension composed of protein subunits that polymerize in situ, which by rotation generates thrust. However, some important features distinguish spirochete endoflagella from "typical" exoflagella. The spirochete basal body is associated with the inner membrane, a trans-inner membrane ring, and a rod that spans the peptidoglycan wall but does not penetrate the outer membrane. The basal body is also more complex in terms of protein composition as compared to bacteria with extracellular flagella (Picardeau, 2017). The periplasmic hook is heavily cross-linked via a self-catalyzed mechanism unique to spirochetes (Miller et al., 2016), instrumental in bearing with the higher torques that spirochete motors deal with (Beeby et al., 2016). Finally, besides their singular localization within the periplasmic space, spirochetes' filaments are multi-protein complexes consisting of an inner core surrounded by a sheath (Zhao et al., 2014), in stark contrast with exoflagella whose filaments are composed of a single flagellin protein.

In contrast to other spirochetes that possess multiple flagellar filaments per cell pole (e.g., *Borrelia* and *Treponema*), *Leptospira* has only a single flagellum at each cell pole (Charon et al., 2012). The filament in *Leptospira* is composed of a core surrounded by an asymmetric sheath that confers a curved filament morphology when isolated (Gibson et al., 2020; Wunder et al., 2018). In addition, the endoflagella in *Leptospira* are not important factors in maintaining cell morphology like in *Borrelia* (Motaleb et al., 2000; Picardeau et al., 2001).

Taken together, these data show that despite common organization features, there are major structural differences of polar endoflagella among spirochetes.

In exoflagellated bacteria, the spatial and numerical regulation of flagella is controlled by FlhF and FlhG in monotrichous (e.g., *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Shewanella*), amphitrichous (e.g., *Campylobacter*), lophotrichous (e.g., *Helicobacter*), and peritrichous (e.g., *B. subtilis*, *Clostridium*) bacteria (Kazmierczak & Hendrixson, 2013; Schuhmacher, Thormann, et al., 2015). However, most other peritrichous bacteria like *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, do not possess FlhF and FlhG and the localization of flagellar systems in these bacteria might occur randomly or be mediated by landmark proteins (Schuhmacher, Thormann, et al., 2015). A recent study showed that FlhF in the spirochete *B. burgdorferi* also plays an essential role in the regulation of the number and position of the endoflagella attached at each cell end (Zhang et al., 2020; Table S1). Genome analysis indicates that ~30% of all bacteria possess the two genes that are co-localized (Bange et al., 2011).

FlhF and FlhG are ancestral homologs of the signal-recognition particle (SRP)-type GTPase and of the MinD-like ATPase, respectively (Balaban et al., 2009; Bange et al., 2011; Leipe et al., 2002; Schuhmacher, Rossmann, et al., 2015). They have probably evolved from SRP and MinD through accumulating modifications to constitute a novel regulatory module involved in various flagellation patterns in bacteria (Altegoer et al., 2014). FlhF and FlhG interact with each other and they localize at the cell poles and generally serve as positive and negative factors, respectively, in the regulation of flagellar number (Kazmierczak & Hendrixson, 2013). Thus, overexpression of FlhF or a loss of FlhG induces an increase in the number of flagella, whereas overexpression of FlhG or a loss of FlhF results in reduced or lack of flagellar formation or flagellar mislocalization (Altegoer et al., 2014; Schuhmacher, Thormann, et al., 2015). However, the detailed mechanisms of flagellar positioning and regulation of flagella number are still poorly understood in most bacteria. In addition, a number of studies have suggested that FlhF and FlhG diversified together with their interaction partners in different bacteria, and the mechanisms might therefore be species and/or pattern specific (Altegoer et al., 2014).

To further elucidate the complex regulatory network that mediates flagellar formation in bacteria, we characterized the roles of *flhF* and *flhG* in the spirochete *Leptospira*. Here we were not able to inactivate *flhF* but we show that a *flhG*⁻ mutant in *Leptospira* exhibited motility defects in viscous gel-like media but that the loss of FlhG was not involved in regulating the number of flagella like in other bacteria. Additionally, we found that FlhG influences the expression of a wide range of flagellar genes, and that, in the absence of FlhG, the flagellar basal body is formed at different positions compared to the wild-type strain. Altogether our results suggest that *Leptospira*

FlhG is involved in the flagellar assembly by a process different from other bacteria. We also show that inactivation of *flhG* in the pathogen *L. interrogans* results in virulence attenuation.

2 | RESULTS

2.1 | Genetic organization of the bacterial *flhF-flhG* locus

Genes encoding homologs of FlhF and FlhG (the latter also called FleN in *Pseudomonas*) proteins are present in bacteria with different flagellation patterns with notable exceptions such as *Escherichia coli* and *Caulobacter* (Schuhmacher, Thormann, et al., 2015). The genetic organization of the *flhF-flhG* locus is relatively well conserved among the different bacterial species (Figure 1). *flhF* and *flhG* always appear as a transcriptional unit with *flhG* downstream of *flhF*. In some bacteria such as *Pseudomonas putida* and *Vibrio cholerae*, *flhF* and *flhG* are also transcribed with the flagellar sigma factor *fliA* (Navarrete et al., 2019; Prouty et al., 2001; Figure 1). In the spirochetes *Treponema*, *Leptospira*, and *Borrelia*, a gene previously described in *B. burgdorferi* as encoding the RNA chaperone Hfq (Lybecker et al., 2010) is inserted between *flhG* and *fliA*. Other genes surrounding *flhF-flhG* are involved in flagellar biosynthesis or

chemotaxis, such as *flhA* and *flhB*, located immediately upstream of *flhF*, which code for the transmembrane proteins that are part of the proton motive force-driven export gate complex of the flagellar secretion apparatus (Figure 1).

The FlhF protein is subdivided into a N-terminal basic (B) domain, a central N domain and a C-terminal GTPase (G) domain. Except for the G domain, the FlhF proteins in the Gram-positive *B. subtilis*, Gram-negative *C. jejuni* and the spirochetes *B. burgdorferi*, *L. biflexa* and *L. interrogans*, differ from each other significantly; this is particularly true for the B domain. Interestingly, despite an overall high sequence identity, the *L. interrogans* FlhF is smaller in size than *L. biflexa* FlhF, missing a 28 amino acid fragment in the B domain (Figure S1). The B domain, which is thought to be unstructured (Bange et al., 2007), may have a regulatory role in the dimerization process of FlhF, which depends on the presence of GTP bound to the NG domains. The low sequence conservation among the B domains, including within spirochetes, may have consequences for how FlhF and FlhG interact with each other.

Sequence alignments of FlhG homologs show strong conservation of motifs such as the N-terminal extension DQAxLR which may stimulate the GTPase activity of cognate FlhF proteins (Bange et al., 2011) and the C-terminal transplantable membrane-targeting sequence (MTS) which in MinD interacts with the inner membrane (Szeto et al., 2003; Zhou & Lutkenhaus, 2003; Figure S1).

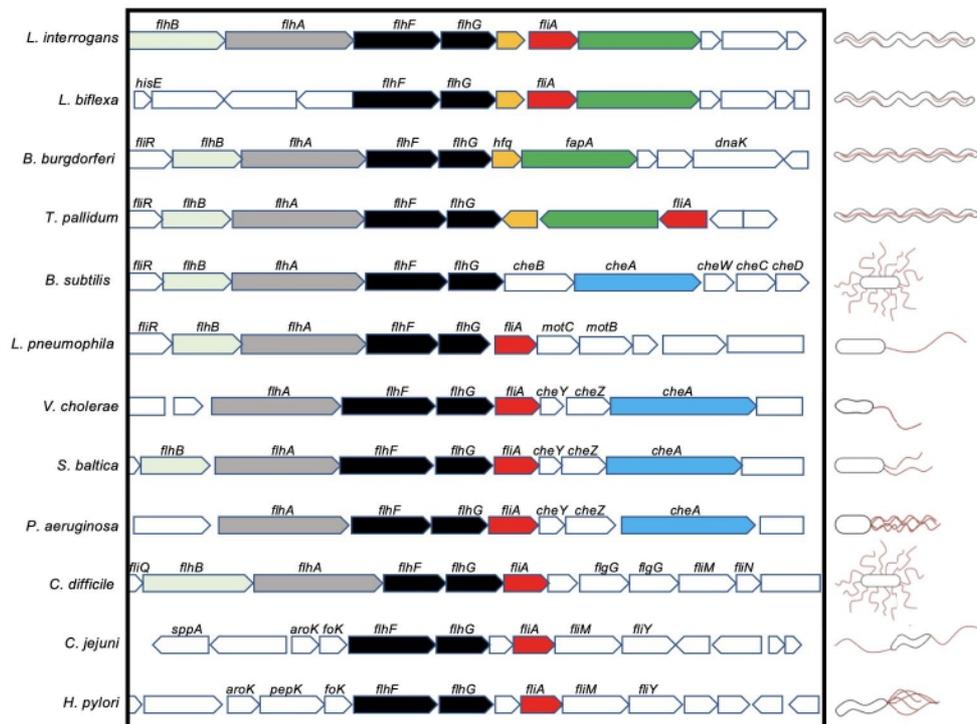


FIGURE 1 Genetic organization of the *flhF-flhG* locus in *Leptospira interrogans* str. Fiocruz L1-130, *Leptospira biflexa* str. Patoc 1, *Borrelia burgdorferi* str. B31, *Treponema pallidum* str. Nichols, *Legionella pneumophila* str. Lens, *Vibrio cholerae* str. N16961, *Shewanella baltica* str. OS185, *Pseudomonas aeruginosa* str. PA7, *Clostridium difficile* str. CD196, *Campylobacter jejuni* str. RM1221, *Helicobacter pylori* str. B38, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168. Similarity between gene-encoding proteins conserved in at least 4 representative species is indicated by the same color. Flagellation patterns of representative bacteria are also indicated

2.2 | Motility and cell morphology of *L. biflexa* *flhG* mutants

In an attempt to isolate new flagellar genes in *Leptospira*, random transposon mutagenesis was performed in *L. biflexa*. Two *flhG*⁻ motility-deficient mutants were identified by screening 8,000 random transposon mutants on soft agar medium. Another transposon insertion into *flhG* was identified in the available library from the pathogenic species *L. interrogans* (Murray et al., 2009; Figure 2a). In contrast, no *flhF*-disrupting transposon mutants could be pinpointed. Furthermore, and despite several attempts, inactivation of *flhF* by homologous recombination proved unsuccessful in either *L. biflexa* or *L. interrogans*, suggesting that *flhF* is an essential gene for *Leptospira* and that its inactivation causes loss of viability.

Growth curves in liquid medium demonstrated similar growth rates for the *flhG*⁻ and WT strains (Figure 2b). When tested in soft agar plates, *L. biflexa flhG*⁻ showed reduced spreading compared to WT, confirming the motility defect. (Figure 2c). However, the *flhG*⁻ mutant

showed more motility in comparison to the *fcpA*⁻ nonmotile mutant which lacks one of the major sheath proteins of the flagellar filament and completely loses translational motility (WunderJr et al., 2016). Dark-field microscopy indicated that most *flhG*⁻ cells were also motile in liquid medium (Video S1); with average velocities of 12.87 $\mu\text{m/s}$ for *flhG*⁻, compared to 12.85 $\mu\text{m/s}$ for the WT strain (Figure 2c).

The *flhG*⁻ cells were flagellated and difference in length was not significantly to that of WT under dark field and immunofluorescence microscopy (Figure 3a,c). The flagella did not overlap at the middle of the cells and the difference in lengths was not significant to that of WT ($n = 48$) and *flhG*⁻ ($n = 68$): $6.6 \pm 1 \mu\text{m}$ versus $6.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$, respectively (Figure 3d). Electron microscopy of flagella preparations also showed that the *flhG*⁻ mutant did not exhibit a reduced diameter of endoflagella (Figure 3b,e); flagellar diameter in WT ($n = 44$) and *flhG*⁻ ($n = 32$) cells were $23.6 \pm 4.4 \text{ nm}$ and $22.2 \pm 2.6 \text{ nm}$, respectively. To visualize the endoflagella in situ at sufficient resolution to locate motors to nanometer-scale accuracy, the polar regions of *L. biflexa* strains were imaged using cryo-electron tomography (cryo-ET), revealing that the

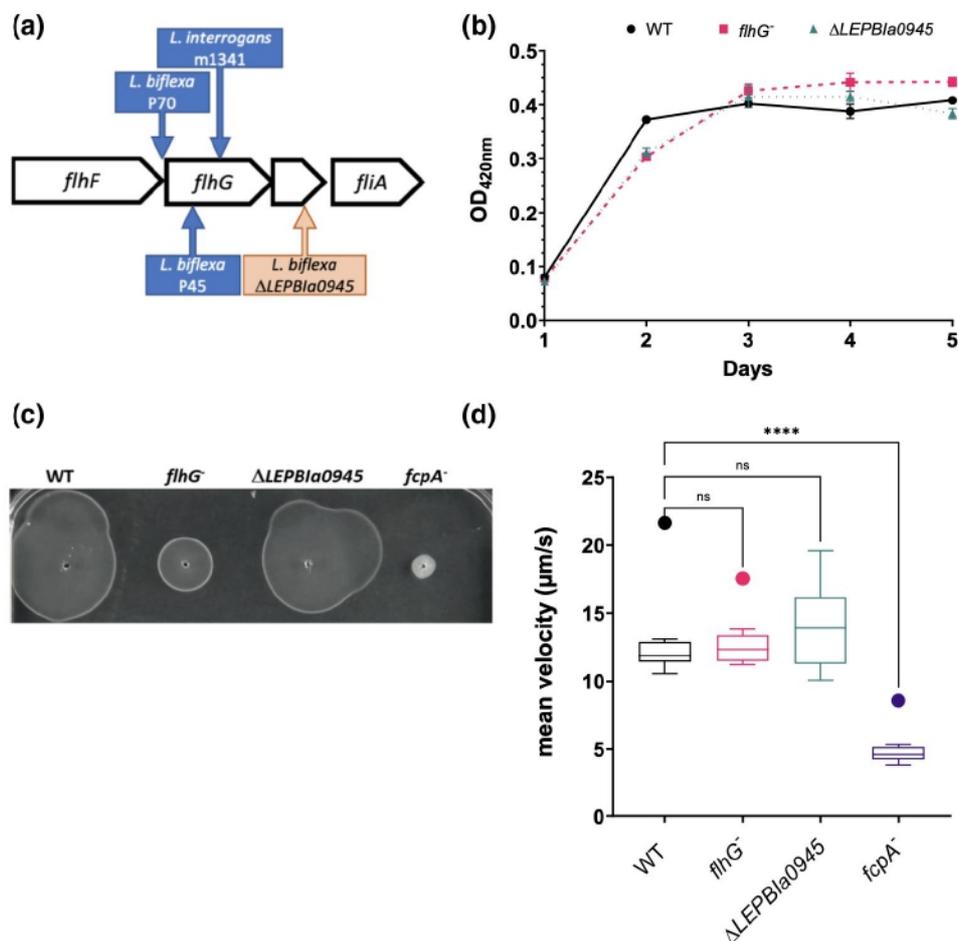


FIGURE 2 *Leptospira* mutant strains used in this study and motility phenotype in *L. biflexa*. (a) Position of the insertion site of the *L. biflexa* and *L. interrogans* transposon insertion mutants in the *flhF*-*flhG* locus. The *L. biflexa* ΔLEPBla0945 deletion mutant is also indicated. (b) Growth curves of *L. biflexa* WT, *flhG*⁻ (P45) and ΔLEPBla0945 strains cultured in liquid EMJH at 30°C without shaking. (c) Motility phenotype of the *L. biflexa* WT, *flhG*⁻ (P45), ΔLEPBla0945, *fcpA*⁻ strains in semisolid EMJH medium. (d) Mean velocity in liquid EMJH of *L. biflexa* WT, *flhG*⁻ (P45), ΔLEPBla0945 and *fcpA*⁻ mutants. Measures of the 10 fastest cells were taken into account for the calculation of the mean velocity. A Tukey box plot is used for the representation of data

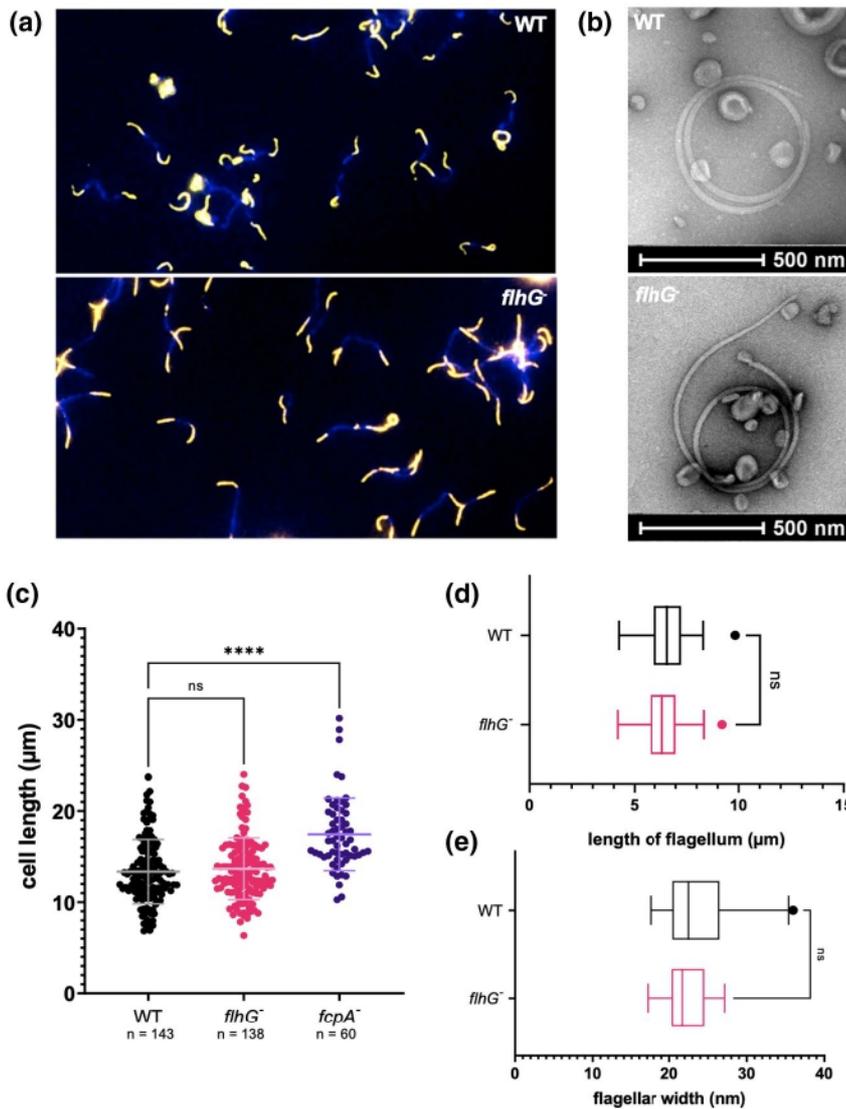


FIGURE 3 Periplasmic flagella integrity in the *L. biflexa flhG*⁻ mutant. (a) Immunofluorescence assay using FlaB antibody on methanol permeabilized cells detected by Cy3 coupled secondary antibodies (yellow) and DAPI counterstaining (blue). Merged images are presented. (b) Representative negatively-stained TEM images of WT and *flhG*⁻ flagella. Mean cell (c) and flagella length (d) as determined by dark-field microscopy and immunofluorescence (IFA). (e) Mean width of flagella as measured on TEM images. **** $p < .0001$

basal body in *flhG*⁻ are significantly closer to the cell tips in comparison to the WT (Figure 4); 218.6 ± 37.5 for WT versus 139.3 ± 38.1 for *flhG*⁻. This feature was restored by complementing the *flhG*⁻ strain with a WT copy of the *flhG* gene (Figure 4); 241.9 ± 44.1 for the complemented strain. In addition, we observed several cells (three out of 14 imaged) bearing filaments that extruded from the outer membrane in the *flhG*⁻ cells, thus becoming exo-flagellated (Figure 4a, right lower panel). None of the filaments extrude from WT nor from *flhG*⁻-complemented strains (30 cell tips imaged).

2.3 | Transcriptome analysis of the *L. biflexa flhG* mutant

To better understand the mechanisms underlying the motility phenotype observed in the *flhG*⁻ mutant, RNA-seq was used to compare the transcriptomes of wild-type *L. biflexa* with that of the *flhG*⁻ mutant under ideal culture conditions at mid-log phase. We found 57 genes that were significantly and differentially expressed

in the *flhG*⁻ mutant with more than two-fold differences (adjusted $p < .05$); 41 genes were up-regulated and 16 were down-regulated in *flhG*⁻ compared to WT (Table S5). To determine if a bias existed toward genes with products involved in similar biological functions, deregulated genes were categorized into Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs; Tatusov, 1997) and the resulting frequencies were compared to the genome-wide predicted frequencies. Genes coding for proteins with roles in motility (COG N) were clearly enriched within the *flhG*⁻ dysregulated set of genes, consistent with the mutant's phenotype. Interestingly, genes coding for proteins involved in posttranslational modification, protein turnover, and chaperones (COG O) were also enriched (Figure 5). Among the down-regulated genes in the *flhG*⁻ mutant, we found *LEPBlA0945*, the gene downstream *flhG* which has been shown to be an Hfq-like protein in *B. burgdorferi* (Lybecker et al., 2010). A *LEPBlA0945* deletion mutant was thus generated and RNA-seq was used to compare the transcriptomes of wild-type *L. biflexa* with that of the *LEPBlA0945* mutant. The lack of *LEPBlA0945* causes down-regulation of genes classified in the COG O (Figure S2). Of note,

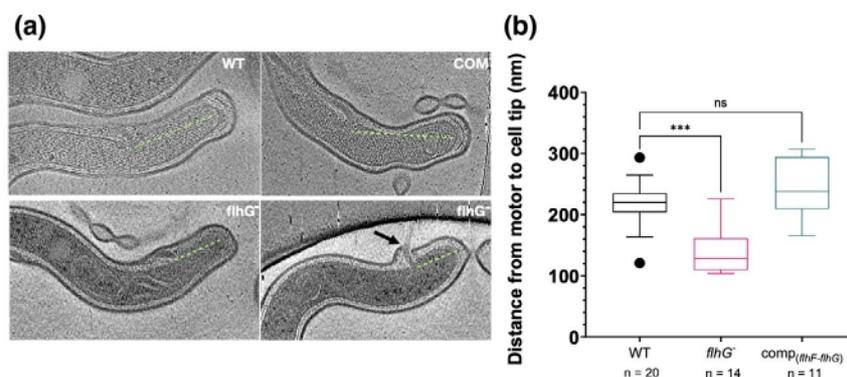


FIGURE 4 Position of the flagellar motor in *L. biflexa flhG⁻* mutant. (a) Cryo-EM tomography observation of wild-type (WT), *flhG⁻* and *flhG⁻* + pMaORI_ *flhF-flhG* (COM) cell tips. Three filaments extrude from the outer membrane in the *flhG⁻* mutant cells (14 cell tips); a black arrow points to the extruding filament in one representative *flhG⁻* cell. None of the filaments extrude from WT and complemented strains (31 cell tips). (b) Measured motor-cell tip distances in nm. ****p* < .001

motility genes were not deregulated in the *LEPBlA0945* deletion mutant (Figure S2) and the mutant was not attenuated in motility in soft agar plates (Figure 2c), indicating that deregulation of motility genes was due solely to *flhG* inactivation and not to a polar effect. Grouping the regulated motility genes according to their molecular function and subcellular localization showed a general trend of up-regulation of genes encoding the P and L rings, the rod, and the hook (Figure 5b,c), suggesting that FlhG acts as a negative regulator of transcription of this class of genes. These results were further confirmed by RT-PCR in a set of representative genes (Figure 5). Transcription of the gene encoding the alternative sigma-28 factor FliA, located in the *flhF-flhG* locus, was not differentially expressed in the *flhG⁻* mutant.

2.4 | Heterologous complementation of the *L. biflexa flhG* mutant

Complementation of the *flhG⁻* mutant with the WT version of *flhG* under the control of the native upstream region of the gene did not restore either *flhG* expression or motility, consistent with the notion that *flhF* and *flhG* comprise an operon (Figure 6). In contrast, complementation was successful, at least partially, when a translational fusion between the promoter region of the *flhF-flhG* operon and *flhG* was transferred into the *flhG⁻* mutant. A WT phenotype was fully restored in the *flhG* mutant by complementation with the entire *flhF-flhG* operon. The *L. interrogans flhF-flhG* operon failed to complement the *L. biflexa flhG⁻* mutant, even though the operon was expressed as determined by RT-PCR. Similarly, the *flhF-flhG* operon from *B. burgdorferi* was also unable to complement the *L. biflexa flhG⁻* mutant (Figure 6).

Campylobacter jejuni, like *Leptospira*, possesses a single flagellum at both poles of the cell. In *C. jejuni*, FlhG has two functions: (a) to control the number of flagella, limiting it to one flagellum at each cell pole; and (b) to prevent cellular division at the poles, so that the bacterium divides properly through symmetrical division. In *C. jejuni ΔflhG*, both the number of flagella increase at

bacterial poles and more non-viable minicells are produced due to erroneous division occurring at polar regions instead of at the midpoint of the cell (Balaban & Hendrixson, 2011). Considering the high sequence identity between *L. biflexa* FlhG and *C. jejuni* FlhG, codon-optimized FlhG from *L. biflexa* was used to test whether it could restore proper flagellation and cell division in a *C. jejuni flhG* mutant. Although expression of the heterologous protein was achieved at a level similar to the native FlhG from the *C. jejuni* chromosome (Figure S3), we did not identify any significant differences between the complemented and the *flhG⁻* mutant strains: the *L. biflexa flhG* did not correct the polar division phenotype of the *C. jejuni ΔflhG* mutant by reducing the number of minicells produced by the mutant upon complementation (Figure S3).

2.5 | Translocation and virulence of the *L. interrogans flhG* mutant

The *flhG⁻* mutant and complemented strains were also characterized in the pathogen *L. interrogans*, to determine if the function of FlhF-FlhG is conserved in the genus *Leptospira* and to evaluate its role in virulence. The *L. interrogans flhG⁻* mutant exhibited identical phenotypes as observed previously for the *L. biflexa* mutant, including motility deficiency in soft agar plates and mislocalization of the flagellar basal bodies (Figure 7a,b and Figure S4). Out of the 17 *L. interrogans flhG⁻* cells imaged, 16 had a single flagellum similar to that of the wild-type cells. However, one *flhG⁻* cell had two flagella at each pole, with the second basal body localized farther away (612 nm) from the cell tip compared to the first basal body (171 nm; Figure 7a,c and f). This phenotype was not observed in 26 *L. interrogans* WT cells; only one basal body was present at each cell end. Intraperitoneal inoculation of hamsters with the *L. interrogans flhG⁻* mutant resulted in a complete loss of virulence as measured by animal survival (Figure 7c). The virulence phenotype could be restored in the mutant by reintroduction of the *flhF-flhG* operon: the complemented strain caused death in 75% of the

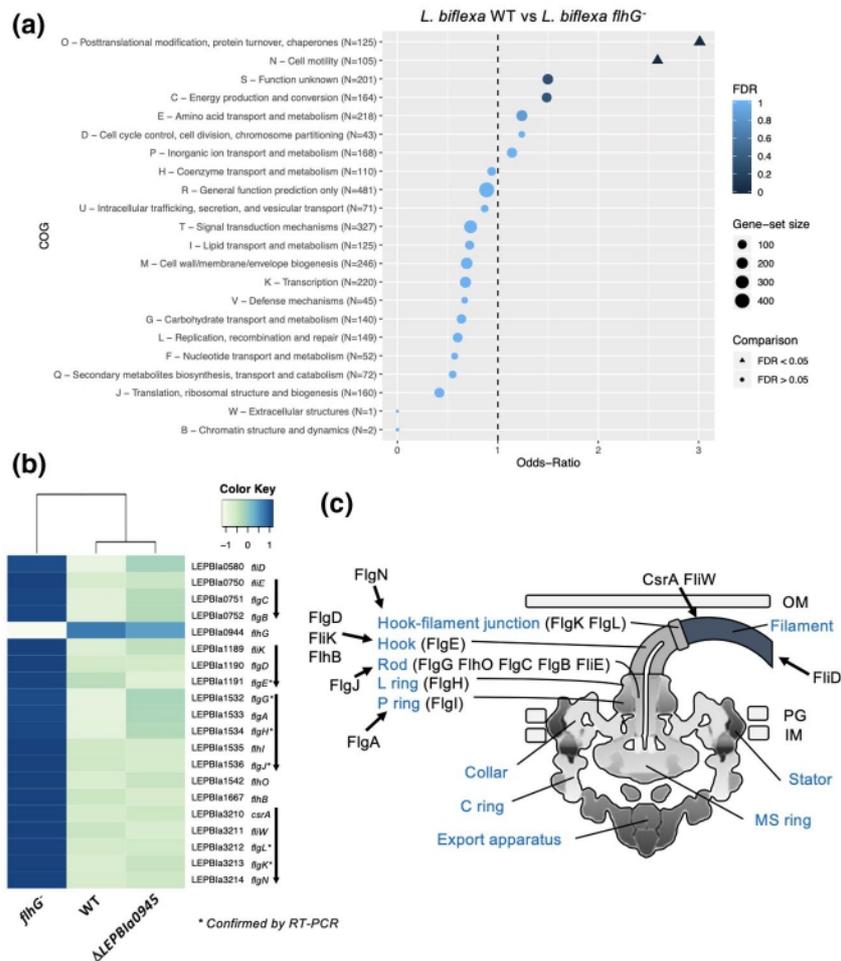


FIGURE 5 Transcriptome analysis of *L. biflexa* strains. (A) Classification of differentially regulated genes according to their predicted functions (Clusters of Orthologous Groups or COG). The selected genes have a dysregulation with an adjusted $p < 0.05$ in the *L. biflexa* WT versus *L. biflexa flhG*⁻. An odds-ratio (OR) > 1 corresponds to an over-representation in differentially expressed genes and an OR < 1 to an under-representation. (B) Heat map of RNA-Seq transcriptome analysis for 20 selected genes involved in flagellar assembly in the *flhG*⁻ and Δ LEPBl₀₉₄₅ mutant strains. Genes organized in operon-like loci are indicated with arrows. Color from pale green to blue indicates low to high gene expression and values range from -1 to +1 as the rows of the matrix have been averaged per condition and centered. (C) Schematic representation of the *Leptospira* endoflagellum. The major components of the endoflagellum are indicated in blue. The proteins of genes that are found deregulated are also indicated: FlgA, P ring (FlgI) chaperone; FlgN, hook-filament junction (FlgK/FlgL) chaperone; FlgD, hook cap; FliK, molecular ruler; FlhB, part of the export apparatus, interacts with FliK resulting in the secretion specificity; FlgJ, rod-capping protein; CsrA-FliW, often linked to genes encoding hook proteins, act as a post-transcriptional regulator of flagellin; FliD, filament cap

inoculated animals (Figure 7c). The ability of *L. interrogans* strains to translocate across MDCK cell monolayers was also investigated (Figure 7d). Of the initial inoculum, only 10% of *flhG*⁻ cells were found in the lower chamber at 24h, while ~30% of the WT and complemented cells were recovered from the lower chamber in the same period of time; the non-motile *flaA2*⁻ mutant (Lambert et al., 2012) was used as a control (Figure 7d).

3 | DISCUSSION

FliH and FliG have been reported as factors that regulate the number and position of polar flagella in *Bacillus subtilis* (Carpenter et al., 1992), *Bacillus cereus* (Salveti et al., 2007), *Helicobacter pylori* (van Amsterdam and van der Ende, A., 2004), *Pseudomonas aeruginosa*

and *Pseudomonas putida* (Murray & Kazmierczak, 2006; Pandza et al., 2000), *Campylobacter jejuni* (Balaban & Hendrixson, 2011), *Shewanella putrefaciens* (Rossmann et al., 2015), *Shewanella oneidensis* (Gao et al., 2015), *Burkholderia cenocepacia* (Kumar & Cardona, 2016), *Xanthomonas oryzae* (Shen et al., 2001), *Borrelia burgdorferi* (Zhang et al., 2020), *Vibrio cholerae* (Green et al., 2009), *Vibrio parahaemolyticus* (Arroyo-Pérez & Ringgaard, 2021), and *Vibrio alginolyticus* (Kusumoto et al., 2006). The disruption of *flhF* and/or *flhG* can lead to a range of different phenotypes, including reduced flagellar gene expression, decreased or absent motility, decreased virulence, and abnormal flagella assembly and number (Kazmierczak & Hendrixson, 2013; Schuhmacher, Thormann, et al., 2015; Table S1). These studies suggest that there may not be a universal mechanism for the FliH-FliG system. Despite many similarities, *Borrelia* and *Leptospira* represent two different models among spirochetes:

Strain	<i>flhF-flhG</i> locus	<i>flhF-flhG</i> mRNA expression (% of WT)		Soft-agar halo spread	
		<i>flhF</i>	<i>flhG</i>	% of WT	p-value
<i>L. biflexa</i> WT		100	100	100	
<i>flhG</i> ⁻		80	5	20 ± 4	****
pMaOri construct					
comp(<i>P_{nao}flhG</i>)		72	5	20 ± 4	****
comp(<i>P_{op}flhG</i>)		106	276	66 ± 3	*
comp(<i>flhF-flhG</i>)		124	120	88 ± 11	ns
comp(<i>flhF-flhG</i>) (<i>L. interrogans</i>)		40 (89*)	2 (89*)	32 ± 2	****
comp(<i>flhF-flhG</i>) (<i>B. burgdorferi</i>)		87 (94*)	6 (94*)	15 ± 1	****

FIGURE 6 Complementation of the *L. biflexa flhG*⁻ mutant. Complementation with *P_{op}flhG* and *flhF-flhG* restores wild-type phenotype as determined by both *flhF-flhG* expression and motility in soft agar plates. The results are indicated as the average and standard deviation of at least three independent experiments. Values are shown in brackets (*) were obtained with primers specific to *L. interrogans* and *B. burgdorferi flhF-flhG*. Level of gene expression is calculated using the *flhF* and *flhG* expression in the *L. biflexa* WT as a reference. **p* < .05; *****p* < .0001

Borrelia are flat-wave shaped bacteria with 9–11 endoflagella attached at each cell end, overlapping in the center of the cell whereas *Leptospira*, on the other hand, are helical-shaped bacteria with only one endoflagellum attached at each cell pole, extending axially toward the center without overlapping. *Leptospira* has a relatively large genome among spirochetes (5Mb in *Leptospira* vs. 1 Mb in *Borrelia*), suggesting that the flagellar regulatory network of *Leptospira* is likely different from other spirochetes. Consistent with these differences, we showed that the *L. biflexa flhG*⁻ mutant phenotype was not complemented with the *B. burgdorferi flhF-flhG*. Similarly, complementation of the *Campylobacter jejuni ΔflhG* mutant with the homologous *flhG* gene of *L. biflexa* did not restore the wild-type flagellation pattern of *C. jejuni*. In both *L. biflexa* and *L. interrogans*, the motility defect resulting from the inactivation of *flhG* was likewise not fully complemented by the expression in *trans* of *flhG* alone. These results suggest that FlhF and FlhG are strictly regulated to appropriate intracellular levels, relative to each other, to ensure the synthesis of a wild-type flagellum, as observed previously in *Shewanella oneidensis* (Gao et al., 2015). However, we also noted different phenotypes among the *flhG*⁻ mutants obtained in different bacteria (Table S1) suggesting that detailed molecular functions of FlhF and FlhG vary among species and may not be interchangeable between species.

Leptospira is capable of moving through fluids and viscous gel-like media (swimming) and also along surfaces by a flagellum-independent mechanism called crawling (Tahara et al., 2018). Rotation of the flagella by the motor is believed to induce

deformations in and counter-rotation of the cell body (Takabe et al., 2017). The combination of these deformations and rotations of the cell produce the thrust that drives the swimming motility. All flagellar mutants obtained until now showed impaired motility in both liquid and semi-solid media (Fontana et al., 2016; Lambert et al., 2012; Picardeau et al., 2001; Wunder et al., 2018; Wunder Jr et al., 2016). Here, although the motility of *flhG*⁻ mutant strains was significantly reduced on semisolid agar, their swimming motility was not impaired in liquid medium. We also found that the *L. interrogans flhG* mutant was unable to translocate in vitro across mammalian cell monolayers or to induce infection in animals. These findings suggest that motility in viscous gel-like media is essential for host infection, allowing cells to disseminate rapidly through mucous membranes, wounded dermis, junctions between the cells in epithelial or endothelial layers, and also the blood-brain barrier. In contrast, motility in liquid and in low-viscosity media does not seem important for host dissemination.

Previous studies have shown that *Leptospira* can sense and respond to changes in environmental viscosity. The motility of *Leptospira* is thus increased in high-viscosity media (Kaiser & Doetsch, 1975; Takabe et al., 2013). The mislocalization of the flagellar basal bodies in the *flhG*⁻ mutant does not prevent translational motility in liquid medium. Although the closer localization of the flagellar bodies to the cell tip may result in more pronounced cell-end curvatures in the *flhG*⁻ mutant in comparison to the WT, the *flhG*⁻ mutant was still able to form the typical spiral- and hook-shaped

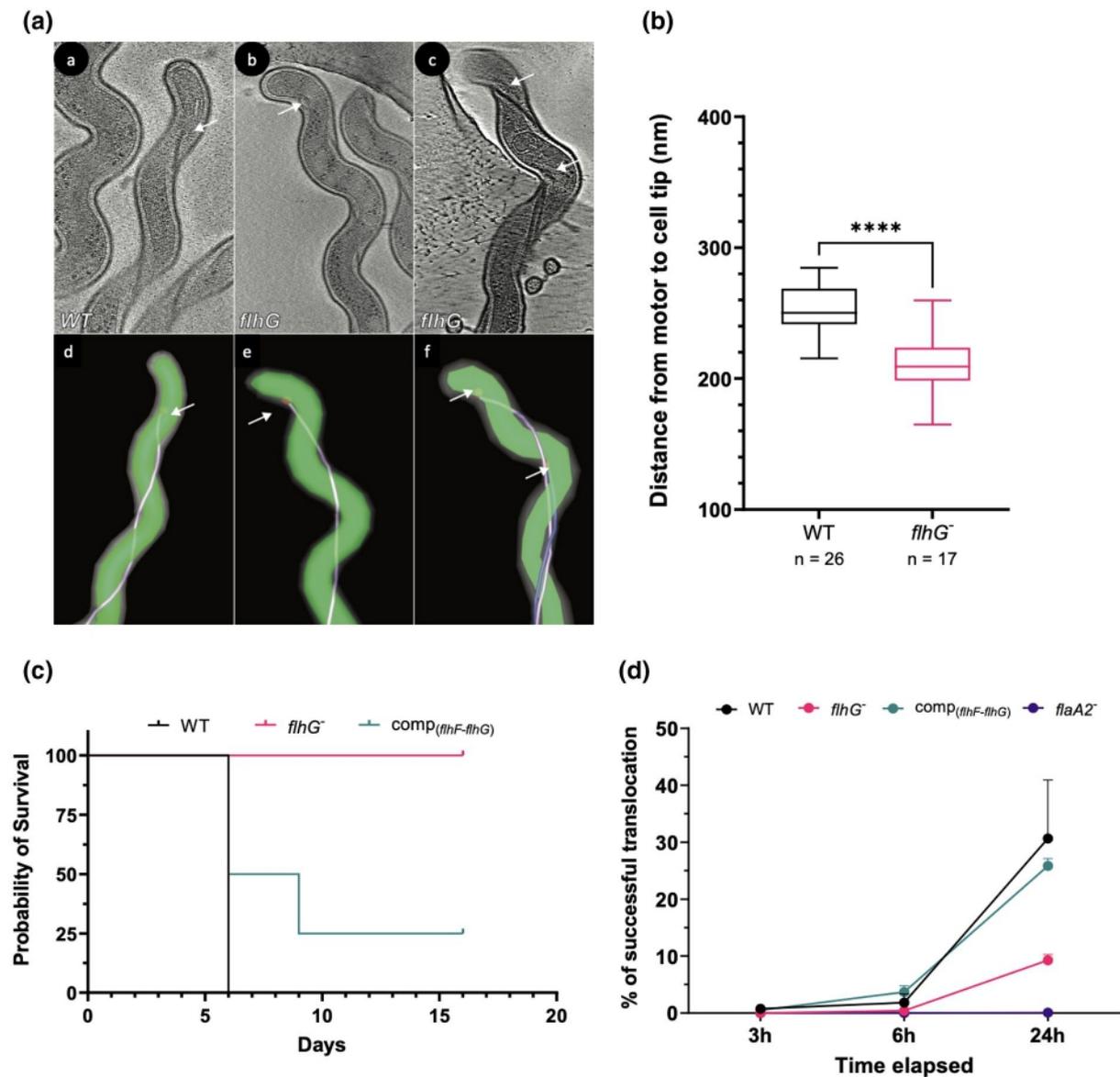


FIGURE 7 Phenotype characterization of the *L. interrogans flhG*⁻ mutant. (A) Cryo-ET analysis of *L. interrogans* cells. a. Representative tomogram depicting the polar regions of a wild-type *L. interrogans* cell. b and c. Representative tomograms depicting the polar regions of *flhG*⁻ cells. Note that one *flhG*⁻ cell has two flagella. d to f. 3D segmentations of *L. interrogans* cells shown in the tomograms of a, b and c, respectively. Inner membranes are colored green, while the outer membranes are transparent. The flagellar basal bodies are depicted as red spheres. Polar flagellar filaments are colored white, while the second flagellar filament in F is colored purple. White arrows point to the flagellar basal bodies in A-F. (B) Measured motor-cell tip distances in nm. For convenience, we do not show the distance of the second basal body localized farther away (612 nm) for one *flhG*⁻ cell with two motors. ****p < .0001. (C) Survival assay of hamsters infected by wild-type, *flhG*⁻ and complemented (*flhG*⁻ + pMaORI_ *flhF-flhG*) strain. WT versus *flhG*⁻ p < .05; WT versus complemented strain p-value = 1 (D) Translocation ability of WT, *flhG*⁻ and complemented (*flhG*⁻ + pMaORI_ *flhF-flhG*) strain to cross an epithelial cell barrier (MDCK1) after 3, 6 and 24 hr. A nonmotile *flaA2*⁻ mutant was also used as a control

ends through rotation of the flagella by the motors causing wave-like motion along the cells. In viscous gel-like media, the motility of the *flhG*⁻ mutant becomes greatly inhibited: the thrust produced by the wave-like deformations of the helical cell body may not be sufficient for penetrating viscous gel-like media or connective tissues.

In bacteria, depletion of FlhF usually resulted in reduced number of flagella or a nonflagellated phenotype. In *B. burgdorferi*, deletion of *flhF* prevents the recruitment of the MS-ring protein FliF to the

site of the assembly of the flagellum at the cell poles, thus altering the position and number of flagellar motors (Zhang et al., 2020). In contrast, we were unable to inactivate *flhF* in *Leptospira*. To our knowledge, this represents the first study showing that FlhF can be essential for the growth under standard laboratory conditions.

In some bacteria, FlhG has been shown to influence GTPase activity of FlhF, which may impact the role of FlhF in flagellar biogenesis to lead to such phenotypes as hyperflagellation in

flhG⁻ mutants (Bange et al., 2011; Gulbranson et al., 2016; Kondo et al., 2018). In *Leptospira*, the removal of FlhG results in the mislocalization of the flagellar basal body from the normal sub-terminal pole position, to one that is significantly closer to the tip of the cell. In some cases, we could also find the striking extrusion of the endoflagellum through the outer membrane. Protrusion of endoflagella has already been observed in other spirochetes (Charon et al., 1992). In more rare cases, two endoflagella were observed at the pole of one *L. interrogans* cell, being the first observation of such multi-flagellated phenotype in *Leptospira*. However, and in contrast to the scenario seen in *flhG*⁻ mutants in other bacteria (Balaban & Hendrixson, 2011; Correa et al., 2005; Dasgupta & Ramphal, 2001; Kusumoto et al., 2006), the loss of FlhG in *Leptospira* causes hyperflagellation in a very small fraction of the population, suggesting that FlhF/FlhG system may require another factor to become active at the cell poles (Table S1).

Flagellar biogenesis is a complex process which is regulated in coordination with cell cycle events as well as with the sequential progression of the flagellar assembly itself. The flagellar genes are usually divided into different classes of genes whose expression depends on alternative sigma-factors. In *B. burgdorferi*, the earliest flagellar structures to be synthesized include the MS-ring, the C-ring, the stators and the export apparatus. Their synthesis and successful assembly are required, in turn, for the transcription of other genes that encode the rod, the outer rings, and the hook structure (Zhao et al., 2013). Our transcriptome data suggest that FlhG acts as a negative regulator of the transcription of this particular class of genes. The final step includes the filament assembly which is promoted by the filament cap. In model organisms, the late flagellar genes (e.g., the flagellin gene) require the alternative σ factor FliA (σ^{28}). Consistently, *fliA* and the genes encoding the flagellar filament are not deregulated in *L. biflexa flhG*⁻.

FlhG-mediated transcriptional regulation of flagellar genes can occur by direct binding to promoter regions or through interaction with other regulatory factors. In *V. cholerae*, FlhG regulates class I flagellar transcription (Correa et al., 2005) and FlhG/FleN has been demonstrated to repress flagellar gene expression by interacting with the regulator FleQ in *P. aeruginosa* (Correa et al., 2005; Dasgupta & Ramphal, 2001). FlhG negatively impacts the master regulator of flagellar transcription in *V. cholerae* (FlrA) and *P. aeruginosa* (FleQ), and the great augmentation in gene expression of basically all flagellar genes (~5–10 x-fold) is likely responsible for the hyperflagellation phenotype in these two species. In *C. jejuni*, there is a modest (~2x-fold) increase in the transcription of only one class of genes in the *flhG*⁻ mutant, but it is unclear whether this increase in expression of only rod and hook genes contributes to hyperflagellation (Balaban & Hendrixson, 2011; Gulbranson et al., 2016).

Leptospira spp. represent the simplest model to study the spirochetal motility machinery, with only one endoflagellum attached at each pole of the cell. Future research will be necessary to accurately detail how *Leptospira* achieve this specific flagellation pattern. *Leptospira* should serve as a new paradigm for polar flagellar biosynthesis and as an instrumental model to understand spirochete motility.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Bacterial strains and culture conditions

Mutants in *flhG* were generated from the parental strains *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1 and *L. interrogans* serovar Manilae strain L495 by transposon mutagenesis as described previously (Murray et al., 2009; Slamti & Picardeau, 2012). A *L. biflexa* LEPBla0945 deletion mutant was also generated by allelic exchange. Briefly, a plasmid containing a spectinomycin resistance cassette replacing the coding sequence upstream of *flhG*, LEPBla0945, and flanked by 0.8 kb sequences flanking the target gene was synthesized by GeneArt (Life Technologies), pretreated with UV, and used for transformation in *L. biflexa* as previously described (Picardeau et al., 2001).

Leptospira was cultured under normal laboratory conditions at 30°C in Ellinghausen, McCullough, Johnson, and Harris (EMJH) medium. Spectinomycin and kanamycin, when required, were added to the cultures at a final concentration of 50 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. For experiments requiring plating, concentrated EMJH was mixed with 1.2% (solid) or 0.6% (semisolid) final volume noble agar. For semisolid plating, a small divot was gouged into the agar surface into which 5 μl of mid-log phase *Leptospira* in EMJH was pipetted. Expansion diameters of the resulting colonies were measured at 7- (*L. biflexa*) and 14- (*L. interrogans*) days post-inoculation.

4.2 | Plasmid constructs for *Leptospira*

A list of all strains used in this study is shown in Table S2. All plasmid constructs were based on the leptospiral replicative vector pMaOri (Pappas et al., 2015; Table S3). Primers used are shown in Table S4. Vectors possessing the *L. interrogans* and *L. biflexa flhG* genes downstream of the promoter of the *flhF-flhG* operon were generated by gene synthesis (GeneArt, Sigma). Cloning into other vectors was performed using restriction endonuclease cloning or the restriction-free cloning method, based on primers designed on the online available tool (<https://www.rf-cloning.org/>). For conjugation in *Leptospira*, plasmids were first introduced into *E. coli* β 2163, which was then co-incubated on 0.1 μm filters with mid-log *L. biflexa* or *L. interrogans* on EMJH plates supplemented with diaminopimelic acid (DAP) as described previously (Picardeau, 2008). To select for conjugated *Leptospira* clones, bacteria on filters were re-suspended in EMJH, and plated onto solid EMJH supplemented with spectinomycin.

4.3 | Translocation experiments

Canine kidney epithelial MDCK-1 cells (Sigma) were grown on Falcon cell culture inserts with a 3.0-micron pore size (Corning) in EMEM supplemented with 10% FBS and L-glutamine (complete EMEM) until total confluency was achieved. Mid-log phase *Leptospira* cells were counted and resuspended at a concentration of 4.10^7 bacteria. ml^{-1} in a 1:1 mixture of EMJH:complete EMEM. Fresh complete EMEM was

added in the lower chambers, and a total of 10^6 spirochetes were added to each cell culture insert and incubated for 3, 6, and 24h at 37°C, 5% CO₂. At each timepoint, 15µl from the lower chamber were collected to count the number of spirochetes that had successfully translocated through the cell layer. Integrity of the cell layer was evaluated at timepoints 0 and 24h by Trypan Blue assay. In short, EMJH:EMEM mixture was washed off cell culture wells twice with PBS 1X, then PBS 1X was added to the lower chamber and Trypan Blue solution 0.4% (Gibco) to the upper chamber. After 10min incubation at 37°C, each well was examined to assess whether Trypan Blue had bled through the cell layer. Percentage of total translocation was calculated by comparing the number of translocated spirochetes against the initial inoculum. At timepoint =24h, generation time of *L. interrogans* (~20h) was considered for calculations.

4.4 | Microscopic analyses of endoflagella

Immunofluorescence of the endoflagella was performed as described previously (Fontana et al., 2016). Briefly, exponential-phase cultures were washed in PBS-5 mM MgCl₂ and air-dried. The cells were then fixed and permeabilized with 1 ml ice-cold 100% methanol for 20 min at -20°C. Non-specific sites were blocked with PBS-BSA 2% and anti-FlaB4 (LIC11531) antibodies diluted at 1:100 in PBS-BSA 2% were added, incubated for 1 hr, and washed with PBS. Secondary antibody CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L, Jackson ImmunoResearch) diluted at 1:100 in PBS-BSA 2% was added and incubated for 1 hr. Cells were washed, air-dried, and stained with ProLong® Gold Antifade reagent containing 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies). The slides were observed with a Nikon Eclipse Ti-S fluorescence microscope (Nikon) coupled to a Digital Sighth DS-5Mc camera (Nikon). 10 images containing ~20 flagella were acquired for each strain with the Nikon NIS Elements F Package 4.0 (Nikon) and post-treated with ImageJ.

Transmission electron microscopy of flagella preparations was performed at the UltraPole Platform at the Institut Pasteur (Paris). Flagella were extracted from 250 ml exponential-phase cultures as described previously (Lambert et al., 2012). Briefly, *Leptospira* strains were centrifuged at 8,000g for 20 min at 4°C. Pellets were washed with PBS and resuspended in a sucrose solution (0.5 M sucrose, 0.15 M Tris pH 8) and stirred on ice. Triton X-100 was added at 1% final concentration and the mixture was incubated for 30 min at room temperature. 0.1 mg of fresh lysozyme was added and incubated for 5 min on ice. Then, EDTA pH 8 was added to a final concentration of 2 mM. After 2 hr incubation at room temperature, MgSO₄ was added to a final concentration of 2 mM and stirred for 5 min at room temperature, then EDTA was added to a final concentration of 2 mM and stirred again for 5 min at room temperature. The mixtures were then centrifuged at 17,000g for 15 min at 4°C. The supernatants were mixed with 1.6 ml of 20% polyethylene glycol 8,000 previously dissolved in 1 M NaCl, and incubated for 30 min on ice. Suspensions were centrifuged again at 27,000g for 45 min at 4°C. Pellets were resuspended in 2.5 ml of water and 100 µl of 1% sodium azide in

PBS, and shaken gently at 4°C overnight. The mixtures were then ultracentrifuged 45 min at 80,000g at 4°C. Flagellar preparations were resuspended in an appropriate volume of water. Commercial 200 mesh carbon-coated copper grids were glow-discharged just before use. The samples were placed in contact with the grids for 10 min. The grids with samples were then fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate sodium buffer for 10 min and washed 3 times for 1 min in water. The grids were dried and negatively stained with 4% uranyl acetate for a few seconds. The samples were observed with a transmission electron microscope (TEM) TECNAI T12 FEI operating at 120 kV. ImageJ was used for manual width measurements of flagella.

For cryo-electron tomography (cryo-ET), frozen-hydrated *Leptospira* specimens were prepared as described previously with minor modifications (Raddi et al., 2012). Briefly, *Leptospira* culture was centrifuged at 5,000g for 5 min and the resulting pellets were resuspended in deionized water to achieve an optical density (OD_{600nm}) of ~0.2. After adding 10 nm gold fiducial markers, 5 µl of the cell suspension mixture was deposited onto a freshly glow-discharged carbon grid (Quantifoil Cu R2/1, 200 mesh). The grids were blotted with a filter paper for 3–5 s and plunge frozen in liquid ethane using a homemade plunger apparatus. The specimens were imaged using either a 200 kV Glacios (Thermo Fisher Scientific) or a 300 kV Titan Krios (Thermo Fisher Scientific) electron microscope equipped with a K2 and a K3 camera (Gatan), respectively. The Titan Krios microscope was operated at 300 kV with a magnification of 19,500× (pixel size of 4.556 Å) while the Glacios was operated at 200 kV with a magnification of 11,000× (pixel size: 3.828 Å). SerialEM (Mastronarde, 2005) was used to collect tilt series around the cell poles of *Leptospira*. For each tilt series, a low total dose of 80 e⁻/Å² was distributed among 35 tilt images covering angles from -51° to +51° at tilt steps of 3°. For each image in the tilt series, dose-fractionated mode was used to generate 10 frames per projection image. After drift-correction by using the Motioncorr2 (Zheng et al., 2017), IMOD (Kremer et al., 1996) was used to align the tilt series and tomo3d (Agulleiro & Fernandez, 2015) was used to generate tomograms. In total, 88 reconstructions from different *Leptospira* strains (*L. biflexa* WT, *flhG*⁻ and complemented strains and *L. interrogans* WT and *flhG*⁻ strains) were used to estimate the distance between the flagellar basal body and cell pole. Briefly, snapshots of the 3D-tomograms were taken to show the round-shaped motor basal body (typically with flagellar filament attached) and the cell tip in the same field of view. IMOD was used to measure the linear distance between the center of the motor to the cell tip (Figure S5). Segmentations of three representative tomograms from WT and *flhG*⁻ cells were manually constructed using IMOD (Figure 7a,d-f).

4.5 | Complementation of *Campylobacter jejuni* $\Delta flhG$ and phenotypic analysis

Vector possessing the flag-tagged codon-optimized *L. biflexa flhG* for *Campylobacter jejuni* on was constructed by gene synthesis

(GeneArt, Sigma). Primers were designed to amplify by PCR the *L. biflexa flhG* gene from codon 2 to the stop codon with in-frame *Bam*HI and *Pst*I sites, respectively. The genes were then inserted into the *Bam*HI and *Pst*I sites of pDAR964 by Gibson assembly to construct pDRH6447 and pDRH6448. Plasmids were sequenced for verification. The plasmids along with pCRG746 were then conjugated into MB770 (81–176 rpsL5m ΔflhG).

C. jejuni strains were grown from freezer stocks on Mueller-Hinton agar containing 10 μg/ml chloramphenicol for 48 hr at 37°C in microaerobic conditions. Strains were then restreaked and grown for another 16 hr. Bacteria were then resuspended in PBS to an OD₆₀₀ 0.8, pelleted for 3 min at full speed, resuspended in half the volume of 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate, and then incubated on ice for 1 hr for fixation. After charging electron microscopy grids, samples were applied to grids and then stained with 2% uranyl acetate and visualized with a FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope.

Data from two separate experiments were combined and averaged to determine the proportion of bacterial populations producing different numbers of polar flagella or cell bodies of different lengths as visualized by transmission electron microscopy. In total, at least 200 individual bacteria were analyzed for each strain. For analysis of flagellar numbers, bacteria were placed into one of three categories: wild-type flagellated bacteria, producing a single flagellum at one or both poles; aflagellated bacteria, exhibiting complete lack of flagella; or hyperflagellated bacteria, producing at least two flagella at one or both poles. For analysis of cell body lengths, bacteria were placed into one of four categories: <0.5 μm, minicells; 0.5–1; 1–2; and >2 μm. After averaging, the standard deviation for each population was calculated.

C. jejuni strains were grown from freezer stocks on Mueller-Hinton agar containing 10 μg/ml chloramphenicol for 48 hr at 37°C in microaerobic conditions. Strains were then restreaked and grown for another 16 hr. Bacteria were then resuspended in Mueller-Hinton broth to an OD₆₀₀ 0.8, washed once in PBS, and then resuspended in 50 μl 1X SDS-PAGE loading buffer containing 5% β-mercaptoethanol. Ten microliters of lysate from each sample were loaded onto 10% SDS-PAGE gels, then transferred to Immobolin-P membranes, and blotted with a 1:1,000 dilution of rabbit anti-FLAG antibody (Sigma) or a 1:2000 dilution of mouse anti-RpoA M1 antiserum (Sommerlad & Hendrixson, 2007). Blots were developed using a 1:10,000 dilution of an appropriate goat HRP-conjugated secondary antibody.

4.6 | Hamster infections

Protocols for animal experiments conformed to the guidelines of the Animal Care and Use Committees of the Institut Pasteur (Comité d'éthique d'expérimentation animale CETEA # 2016-0019), agreed by the French Ministry of Agriculture. Bacteria grown to mid-log phase were enumerated using a Petroff-Hausser counting chamber and diluted into EMJH medium. One group of four 3–4-week-old

Syrian Golden Hamsters (Janvier Labs) for each of the three *L. interrogans* strains was inoculated intraperitoneally with 10⁶ leptospores in 1 ml of EMJH medium. Hamster health was monitored daily and deaths were recorded. When necessary, hamsters were humanely euthanized by carbon dioxide inhalation if the animal was deemed to be suffering excessively.

4.7 | RNA-Seq analysis

Exponential-phase cultures of *L. biflexa* were pelleted by centrifugation at 4,000g for 20 min at ambient temperature, after which the medium was removed and cells were resuspended in 1ml TRIZOL reagent (Thermo) and stored at –20°C until all samples were ready for phase-separation purification. Once all samples were at the same stage, the RNA was extracted according to manufacturer protocol, and excess DNA was removed using the Turbo DNA free kit (Thermo). RNA concentration and quality were assessed using the 2100 Bioanalyzer system with RNA 6000 nano reagents (Agilent).

From 0.5 μg of total RNA, we depleted ribosomal RNAs using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) from Illumina. On these rRNA-depleted RNAs, the sequencing libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA Sample preparation kit following the manufacturer's instructions (Illumina). The directional libraries were controlled on Bioanalyzer DNA1000 Chips (Agilent Technologies) and concentrations were measured with the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher). Sequences of 65 bases were generated on the Illumina HiSeq 2500 sequencer.

Reads were cleaned of adapter sequences and low-quality sequences using cutadapt version 1.11 (Martin, 2011). Only sequences at least 25 nt in length were considered for further analysis. Bowtie version 1.2.2 (Langmead et al., 2009), with default parameters, was used for alignment on the reference genome (*L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1 from MicroScope Platform; <https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>). Genes were counted using featureCounts version 1.4.6-p3 (Liao et al., 2014) from Subreads package (parameters: -t CDS -g locus_tag -s 1). Count data were analyzed using R version 3.5.1 (Team, 2016) and the Bioconductor package DESeq2 version 1.20.0 (Love et al., 2014). The normalization and dispersion estimation were performed with DESeq2 using the default parameters and statistical tests for differential expression were performed applying the independent filtering algorithm. A generalized linear model was set in order to test for the differential expression between WT, *flhG*⁻, and LEPBla0945 mutant strains. For each pairwise comparison, raw *p*-values were adjusted for multiple testing according to the Benjamini and Hochberg (BH) procedure (Benjamini & Hochberg, 1995) and genes with an adjusted *p*-value lower than .05 were considered differentially expressed (Table S5).

Differentially expressed genes were grouped based on COG (Clusters of Orthologous Groups). For each COG, we used the Fisher statistical test to test for over- or under-representation in differentially expressed genes. Raw *p*-values were adjusted for multiple

testing using the Benjamini–Hochberg procedure and COG sets with a false discovery rate (FDR) lower than 5% were considered enriched.

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE171376 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171376>).

4.8 | Quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR)

RNA samples were prepared as for transcriptomic analyses. RNA was then converted into cDNA using the iScript Advance cDNA synthesis kit (BioRad) according to manufacturer's direction using 2500 ng of RNA per sample. For RT-qPCR *L. interrogans lipL32* and *L. biflexa cysK* were used as reference genes. Samples were prepared with SsoFast EvaGreen Supermix (Biorad) and thermal cycling and quantitation was performed using a C1000 thermal cycler with attached CFX96 real-time system (Biorad). Results were obtained and analyzed using the CFX manager 3.1 software.

4.9 | Velocity and cell length measurements

Velocity of leptospores in liquid EMJH medium was measured by acquisition of at least three 15s videos for each condition by darkfield microscopy (microscope Olympus BX53, camera Hamamatsu Orca Flash, software Olympus CellSens Dimension). Late exponential phase cultures were diluted so as to have ~20 bacteria in the field of view. Trajectories of individual *Leptospira* were then followed manually using the tracking option of the software. Velocity of 60 spirochetes per condition was acquired and finally, the 10 fastest cells were selected to compute mean velocity. Same video frames were used to measure cell lengths using tools available in the CellSens Dimension software.

4.10 | Statistical tests

Evaluation of statistical significance of results were performed using the analysis tools available in the Prism software (Graphpad, version 9). In accordance with data, either Student's *t* tests or ANOVA with post-hoc multiple comparisons were used, with parameters set to default. The method used for transcriptome statistical analysis is mentioned in the corresponding paragraph. Error bars on barplots correspond to standard deviation (SD), on boxplots to minimal and maximal values.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Olivier Gorgette (UBI platform, Institut Pasteur, Paris, France) and Ariel Mechaly (Plateforme de Cristallographie, Institut Pasteur, Paris, France) for help in electron microscopy and protein

structure analysis, respectively. We thank Christophe Becavin for RNA-seq analysis, Sébastien Le Hu Nghia for genetic studies and Meng Shao and Qin Gong for their assistance in cryo-ET sample preparation and segmentation. We also thank David Šmajš for the gift of *Borrelia* DNA. This research was supported by ANR LEPTOMOVE (18-CE15-0027-01) and the Pasteur International Unit « Integrative Microbiology of Zoonotic Agents » (IMiZA) to MP, NIH R01AI065539 to DRH, and NIAID R01AI087946 to JL. This work is part of the PhD of Lenka Fule.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

LF, RH, GM, and DH conducted the genetics studies; AB did the protein sequence analysis; JL and SG conducted the cryo-ET and interpretation of the data; CF performed the IFA; OS, RL, HV, and JYC performed RNAseq and analyzed data; JL, DH, BA, and MP designed the study and MP wrote the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE171376 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171376>).

ORCID

Mathieu Picardeau  <https://orcid.org/0000-0002-5338-5579>

REFERENCE

- Agulleiro, J.I. & Fernandez, J.J. (2015) Tomo3D 2.0 - Exploitation of Advanced Vector eXtensions (AVX) for 3D reconstruction. *Journal of Structural Biology*, *189*, 147–152.
- Altegoer, F., Schuhmacher, J., Pausch, P. & Bange, G. (2014) From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: A lesson by the bacterial flagellum. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *30*, 49–64.
- Arroyo-Pérez, E.E. & Ringgaard, S. (2021) Interdependent polar localization of FlhF and FlhG and their importance for flagellum formation of vibrio parahaemolyticus. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 655239.
- Balaban, M. & Hendrixson, D.R. (2011) Polar flagellar biosynthesis and a regulator of flagellar number influence spatial parameters of cell division in *Campylobacter jejuni*. *PLoS Path*, *7*, e1002420. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002420>
- Balaban, M., Joslin, S.N. & Hendrixson, D.R. (2009) FlhF and its GTPase activity are required for distinct processes in flagellar gene regulation and biosynthesis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, *191*, 6602–6611.
- Bange, G., Kümmerer, N., Grudnik, P., Lindner, R., Petzold, G. & Kressler, D. (2011) Structural basis for the molecular evolution of SRP-GTPase activation by protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*, 1376–1380.
- Bange, G., Petzold, G., Wild, K., Parltz, R.O. & Sinning, I. (2007) The crystal structure of the third signal-recognition particle GTPase FlhF reveals a homodimer with bound GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(34), 13621–13625. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702570104>

- Beeby, M., Ribardo, D.A., Brennan, C.A., Ruby, E.G., Jensen, G.J. & Hendrixson, D.R. (2016) Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stator rings using a conserved protein scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(13), E1917–E1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518952113>
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate – A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*, 289–300.
- Carpenter, P.B., Hanlon, D.W. & Ordal, G.W. (1992) flhF, a *Bacillus subtilis* flagellar gene that encodes a putative GTP-binding protein. *Molecular Microbiology*, *6*, 2705–2713.
- Charon, N.W., Cockburn, A., Li, C., Liu, J., Miller, K.A., Miller, M.R. et al (2012) The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, *66*, 349–370.
- Charon, N.W. & Goldstein, S.F. (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual Review of Genetics*, *36*, 47–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.041602.134359>
- Charon, N.W., Goldstein, S.F., Block, S.M., Curci, K., Ruby, J.D., Kreiling, J.A. et al (1992) Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. *Journal of Bacteriology*, *174*, 832–840. <https://doi.org/10.1128/jb.174.3.832-840.1992>
- Correa, N.E., Peng, F. & Klose, K.E. (2005) Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *Journal of Bacteriology*, *187*, 6324–6332.
- Dasgupta, N. & Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *183*, 6636–6644.
- Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A.E. (2002) Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, *30*, 207–210. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>
- Fontana, C., Lambert, A., Benaroudj, N., Gasparini, D., Gorgette, O., Cachet, N. et al (2016) Analysis of a spontaneous non-motile and avirulent mutant shows that FlhM is Required for full endoflagella assembly in *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, *11*, e0152916.
- Gao, T., Shi, M., Ju, L. & Ga, H. (2015) Investigation into FlhFG reveals distinct features of FlhF in regulating flagellum polarity in *Shewanella oneidensis*. *Molecular Microbiology*, *98*, 571–585.
- Gibson, K.H., Trajtenberg, F., Wunder, E.A., Brady, M.R., San Martin, F., Mechaly, A. et al (2020) An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. *Elife*, *9*, e53672.
- Green, J.C., Kahramanoglou, C., Rahman, A., Pender, A., Charbonnel, N. & Fraser, G. (2009) Recruitment of the earliest component of the bacterial flagellum to the old cell division pole by a membrane-associated signal recognition particle family GTP-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, *391*, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.075>
- Gulbranson, C.R., Ribardo, D.A., Balaban, M., Knauer, C., Bange, G. & Hendrixson, D.R. (2016) FlhG employs diverse intrinsic domains and influences FlhF GTPase activity to numerically regulate polar flagellar biogenesis in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, *99*, 291–306.
- Holzappel, M., Bonhomme, D., Cagliero, J., Vernel-Pauillac, F., Fanton d'Andon, M., Bortolussi, S. et al (2020) Escape of TLR5 Recognition by *Leptospira* spp.: A Rationale for Atypical Endoflagella. *Frontiers in Immunology*, *11*, 2007.
- Kaiser, G.E. & Doetsch, R.N. (1975) Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature*, *255*, 656–657.
- Kazmierczak, B.I. & Hendrixson, D.R. (2013) Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Molecular Microbiology*, *88*, 655–663.
- Kondo, S., Imura, Y., Mizuno, A., Homma, M. & Kojima, S. (2018) Biochemical analysis of GTPase FlhF which controls the number and position of flagellar formation in marine *Vibrio*. *Scientific Reports*, *8*, 12115.
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. & McIntosh, J.R. (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology*, *116*, 71–76.
- Kumar, B. & Cardona, S.T. (2016) Synthetic cystic fibrosis sputum medium regulates flagellar biosynthesis through the flhF Gene in *Burkholderia cenocepacia*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*, 65.
- Kusumoto, A., Kamisaka, K., Yakushi, T., Terashima, H., Shinohara, A. & Homma, M. (2006) Regulation of polar flagellar number by the flhF and flhG genes in *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biochemistry*, *139*, 113–121.
- Lambert, A., Picaudeau, M., Haake, D.A., Sermswan, R.W., Srikram, A., Adler, B. et al (2012) FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infection and Immunity*, *80*, 2019–2025. <https://doi.org/10.1128/IAI.00131-12>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, *10*, R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. & Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, *317*, 41–72.
- Li, C., Xu, H., Zhang, K. & Liang, F.T. (2010) Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FlhG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity. *Molecular Microbiology*, *75*, 1563–1576.
- Liao, Y., Smyth, G.K. & Shi, W. (2014) featureCounts: An efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*, 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lybecker, M.C., Abel, C.A., Feig, A.L. & Samuels, D.S. (2010) Identification and function of the RNA chaperone Hfq in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, *78*, 622–635.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet Journal*, *17*, 10–12.
- Mastronarde, D.N. (2005) Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *Journal of Structural Biology*, *152*, 36–51.
- Miller, M.R., Miller, K.A., Bian, J., James, M.E., Zhang, S., Lynch, M.J. et al (2016) Spirochaete flagella hook proteins self-catalyze a lysinoalanine covalent crosslink for motility. *Nature Microbiology*, *1*, 16134.
- Motaleb, M.A., Corum, L., Bono, J.L., Elias, A.F., Rosa, P., Samuels, D.S. et al (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 10899–10904. <https://doi.org/10.1073/pnas.200221797>
- Murray, G.L., Morel, V., Cerqueira, G.M., Croda, J., Srikram, A., Henry, R. et al (2009) Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* spp. *Infection and Immunity*, *77*, 810–816.
- Murray, T.S. & Kazmierczak, B.I. (2006) FlhF Is Required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*, 6995–7004.
- Navarrete, B., Leal-Morales, A., Serrano-Ron, L., Sarrió, M., Jiménez-Fernández, A., Jiménez-Díaz, L. et al (2019) Transcriptional organization, regulation and functional analysis of flhF and fleN

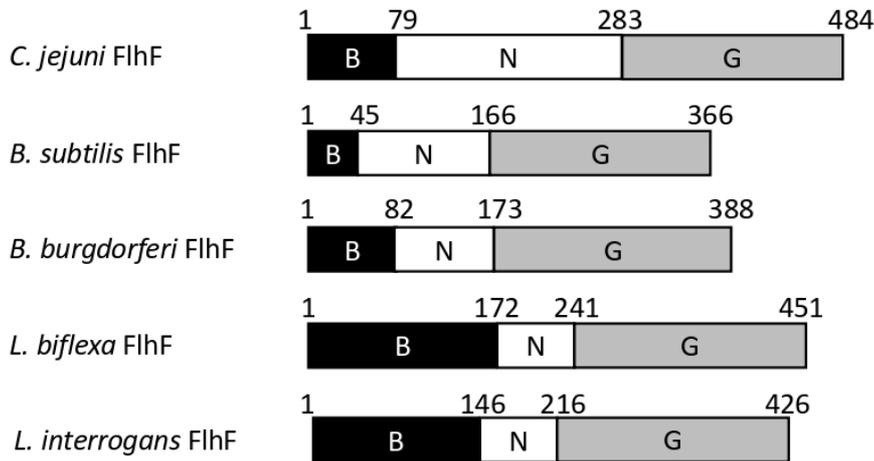
- in *Pseudomonas putida*. *PLoS One*, 14, e0214166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214166>
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M. & Matin, A. (2000) The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Molecular Microbiology*, 36, 414–423.
- Pappas, C.J., Benaroudj, N. & Picardeau, M. (2015) A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. *Applied and Environment Microbiology*, 81, 3176–3781.
- Picardeau, M. (2008) Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Applied and Environment Microbiology*, 74, 319–322.
- Picardeau, M. (2017) Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15, 297–307.
- Picardeau, M., Brenot, A. & Saint Girons, I. (2001) First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology*, 40, 189–199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02374.x>
- Prouty, M.G., Correa, N.E. & Klose, K.E. (2001) The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 39, 1595–1609.
- Raddi, G., Morado, D.R., Yan, J., Haake, D.A., Yang, X.F. & Liu, J. (2012) Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *Journal of Bacteriology*, 194, 1299–1306. <https://doi.org/10.1128/JB.06474-11>
- Rossmann, F., Brenzinger, S., Knauer, C., Dörrich, A.K., Bubendorfer, S., Ruppert, U. et al (2015) The role of FlhF and HubP as polar landmark proteins in *Shewanella putrefaciens* CN-32. *Molecular Microbiology*, 98, 727–742.
- Salveti, S., Ghelardi, E., Celandroni, F., Ceragioli, M., Giannesi, F. & Senesi, S. (2007) FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology (Reading)*, 153, 2541–2552. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/005553-0>
- Schuhmacher, J.S., Rossmann, F., Dempwolff, F., Knauer, C., Altegoer, F., Steinchen, W. et al (2015) MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 3092–3097.
- Schuhmacher, J.S., Thormann, K.M. & Bange, G. (2015) How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 812–822.
- Shen, Y., Chern, M., Silva, F. & Ronald, P. (2001) Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 204–213.
- Slamti, L. & Picardeau, M. (2012) Construction of a library of random mutants in the spirochete *Leptospira biflexa* using a mariner transposon. In: Bigot, Y. (Ed.) *Mobile genetic elements*. Humana Press, pp. 169–176.
- Sommerlad, S.M. & Hendrixson, D.R. (2007) Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 189, 179–186.
- Sultan, S.Z., Sekar, P., Zhao, X., Manne, A., Liu, J., Wooten, R.M. et al (2015) Motor rotation is essential for the formation of the periplasmic flagellar ribbon, cellular morphology, and *Borrelia burgdorferi* persistence within *Ixodes scapularis* tick and murine hosts. *Infection and Immunity*, 83, 1765–1777. <https://doi.org/10.1128/IAI.03097-14>
- Szeto, T.H., Rowland, S.L., Habrukowich, C.L. & King, G.F. (2003) The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 40050–40056.
- Tahara, H., Takabe, K., Sasaki, Y., Kasuga, K., Kawamoto, A., Koizumi, N. et al (2018) The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: swimming and crawling. *Science Advances*, 4, eaar7975.
- Takabe, K., Kawamoto, A., Tahara, H., Kudo, S. & Nakamura, S. (2017) Implications of coordinated cell-body rotations for *Leptospira* motility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491, 1040–1046.
- Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M. & Kudo, S. (2013) Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology and Immunology*, 57, 236–239.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V. & Lipman, D.J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science*, 278, 631–637. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631>
- Team, R.C. (2016) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- van Amsterdam, K., & van der Ende, A. (2004) *Helicobacter pylori* HP1034 (ylxH) is required for motility. *Helicobacter*, 9, 387–395.
- Wunder, E.A.J., Slamti, L., Suwondo, D.N., Gibson, K.H., Shang, Z., Sindelar, C.V. et al (2018) FcpB is a surface filament protein of the endoflagellum required for the motility of the spirochete *Leptospira*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 130.
- Wunder Jr, E.A., Figueira, C.P., Benaroudj, N., Hu, B.Y., Tong, B.A., Trajtenberg, F. et al (2016) A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Molecular Microbiology*, 101, 457–470.
- Zhang, K., He, J., Cantalano, C., Guo, Y., Liu, J. & Li, C. (2020) FlhF regulates the number and configuration of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 113, 1122–1139.
- Zhao, X., Norris, S.J. & Liu, J. (2014) Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry*, 53, 4323–4333. <https://doi.org/10.1021/bi500059y>
- Zhao, X., Zhang, K., Boquoy, T., Hu, B., Motaleb, M.A., Miller, K.A. et al (2013) Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 14390–14395.
- Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.P., Verba, K.A., Cheng, Y. & Agard, D.A. (2017) MotionCor2: Anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature Methods*, 14, 331–332.
- Zhou, H. & Lutkenhaus, J. (2003) Membrane binding by MinD involves insertion of hydrophobic residues within the C-terminal amphipathic helix into the bilayer. *Journal of Bacteriology*, 185, 4326–4335.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Fule, L., Halifa, R., Fontana, C., Sismeyro, O., Legendre, R., Varet, H., et al (2021) Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira*. *Molecular Microbiology*, 116, 1392–1406. <https://doi.org/10.1111/mmi.14831>

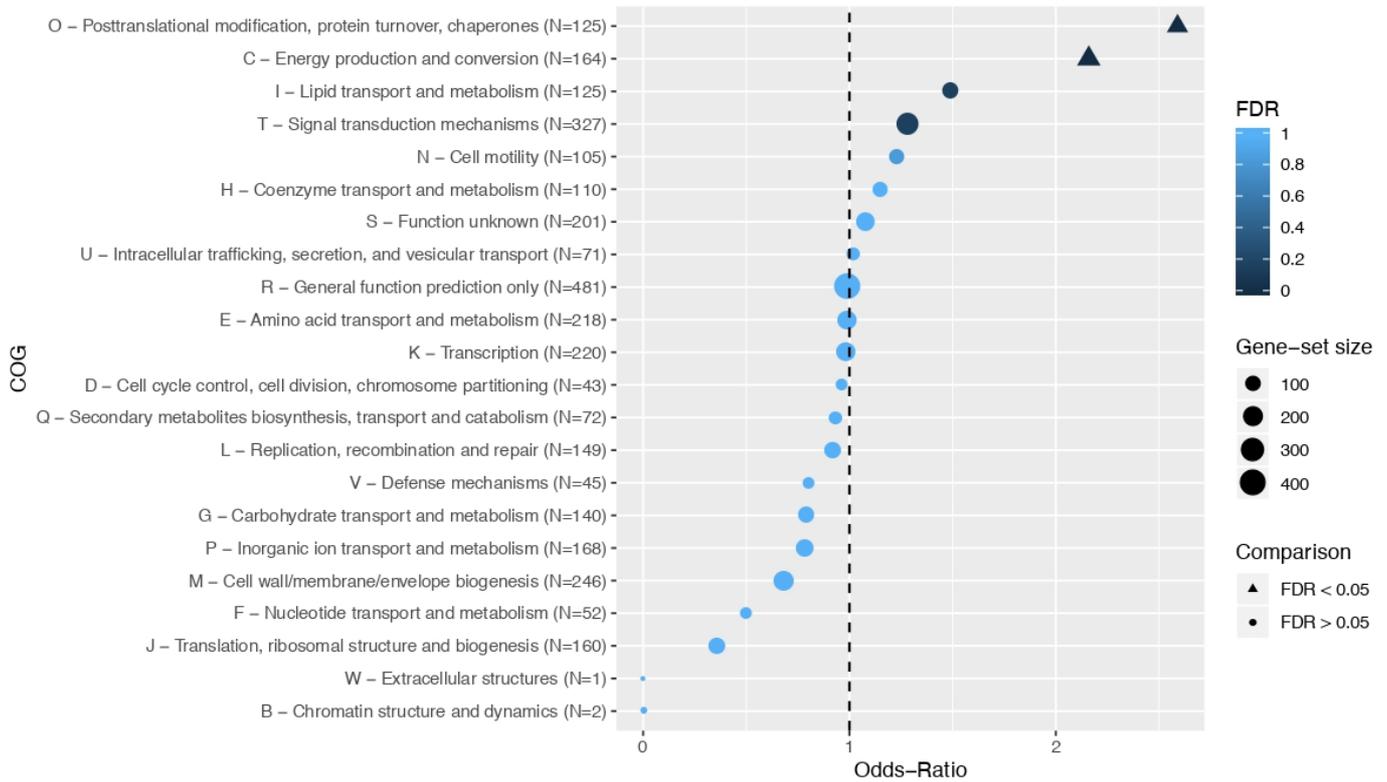
A



B

LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	MEFAKIRGKSYQDCLMEMKMKYGSEATVISQTVVTEGGVMGTGLLAKKMIEIQIGIPEKQ MDFVKIRGKDLQDCIMQMKMKYGPEAHLVDQRVITEGGLFGTGLMAQRMYEIDVGVPEKQ *:*:*****.***:*:*****.*** : .* *:*:*****:*****:*:* **::*:*****
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	ASREKIERKLQDLKDLLKQKSYASPE-----RKKTLQ NSKERIERKLKDLKELIKQKQRTESHPEGLVGVGIPSHSSHVNLNANTYTGKKNIE *:*:*****:***:*:***. :... *****
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	TLKPLSKTLEEKEIAVEEIEEITTEPDRVGLSFEKELLDKNSFLRRETSTVRKDSPLIR SVRPFSEKRR-QQTSAYEIEISFEERPVGSLAEAKESFLES-IPERTISPKEKHPHIQK ::*:** : . : : . ***. : .* :.*: ** : : . : .* * . * . : : :
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	LGEKLVREGMSQSYVEEIIISKVEERLSPLDQGRNHAVLERTIEILKERVSDSDLFRGTG LIDRLLREGFSESYLEEMAVTLEQRLSAVDLTRYANVTDKAVTYLEERIQVDSDLFSGTP * :*:*****:***:*:***. :.*:***.* * * :*: : *:*:***** **
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	KNQRKVIFFVGPTGSGKTTSAKLAAKYFLHRGKSVSLYTTDNYRIAIEQLKRYADTMG RGKRKVVFFVGPTGSGKTTSAKLAAKYSLHMGKVSPLYTTDNYRIAIDQLKFYADAMG :.*:***:*****:*****:***** ** * .*****:*** **:*:***
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	MPFYPVKDIKKFKETLARDGSELILIDTAGYSHRNLEQLERMNSLLSFCGEKDSVENLLV LPFYAAKDLRKWKETILRDGSELILVDTAGYSHRSENLEKLQEFYEVFGEKDHIETILV :***.***:*:***: *****:*****: *:*: : : . ***** :*:*:***
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	LSSTSSYHHTSTVLKAYESLNYRRILLTKLDEADFLGGFLELADTYKSFYYSVGVQVEVP LSSTVAKDNALAVTNAYESVGYKRILLTKLDEAEFLGSVVELADTIHREFAFLSVGQDVP **** : . : : * :***:.*:*****:***.***** :*:*: *****:***
LIMLP_06720 FlhFLEPBIa0943	FDILSAEKNLMAECVVTPEKIAELRGEVFTVAGD FDILNATKKILAECVIFPEKLGKGIAGEVFEKTV- ****.* *:*:*****: ***: : **** :

L. biflexa WT vs *L. biflexa* Δ LEPBIa0945



Supplementary Figure 2: Transcriptome analysis of *L. biflexa* LEPBIa0945 mutant

A. Classification of deregulated genes according to their predicted functions (Clusters of Orthologous Groups or COG). The selected genes have a dysregulation with an adjusted P -value < 0.05 in the *L. biflexa* WT vs *L. biflexa* LEPBIa0945 deletion mutant. An odds-ratio (OR) > 1 corresponds to an over-representation in differentially expressed genes and an OR < 1 to an under-representation.

A

```

LEPBIa0944 1 MDQAAQLRRLTEGTCFLRLVQFDAAARKKIKITAVASGKGGVCKSTVSVNLAISTAKTCLK
CJE0060 1 MNNQAAKLRNLMSONCIRKSGQ-----NPHFLAITSCKGGVCKSTISANLANVLANNCYK

LEPBIa0944 61 VLTFDCDLCLANVNVLLGCIIPKYNYEVVVRGHRSTKRDIVVSTPEGVDTIACAGGYSQFAN
CJE0060 55 VGLFDADICLANLDVILNVRIQRNLLVLRACECSLEDFLLEVKPNLWLLPCESGDEIDKY

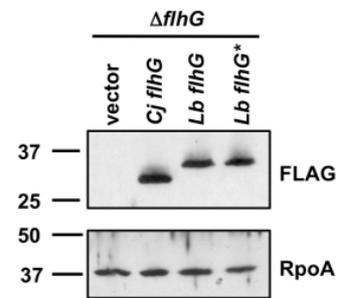
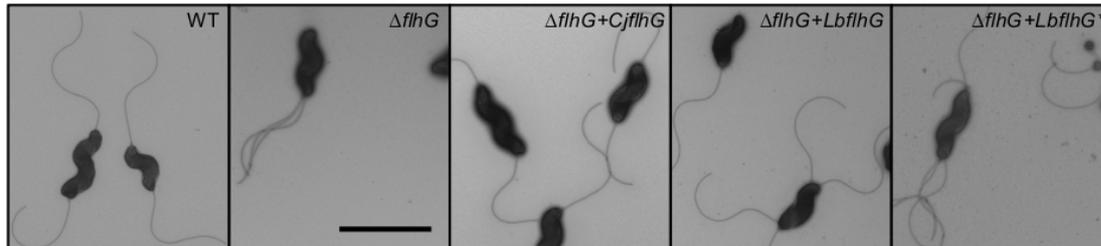
LEPBIa0944 121 LNETQRNNLIKGFAEIDRVVMIIDTCAGHSANVIGLVMPADEVVVVAPEEFTSFTDSHG
CJE0060 115 NDKNIYERFLNQASIDDELDFLIIDTCAGHGGNINLNFLEMADDEVIVVAVPDAATDANA

LEPBIa0944 181 LKRSIVSQSKDKNFKIIVNRURSAIGKQVADRVIDESGQFLE--VQVENLGFIFQDEEV
CJE0060 175 TIKTTS--KTKEMLMLFNIVKKNENLALKVFNENKQVADANIKNPLNLEPDLCHLSASKDV

LEPBIa0944 239 EKSDREQKPFIIIG--APRSKAAACLTRITHTLQTEGGFDDEGLTGFFRNFFSFVDFKE
CJE0060 233 SGLIKRRTLSDEHVAASSEIKRLASKLLYRERKVKLDNVSNRSFSSFFRNIIERF----

LEPBIa0944 297 KEMESRMEEDN
CJE0060 -----

```

B**C****D**

Genotype	WT Flagellated	Aflagellated	Hyperflagellated	minicells
WT/pDAR964	93.30 +/- 0.71	6.25 +/- 0.07	0.45 +/- 0.63	0.45 +/- 0.63
ΔflhG/pDAR964	49.37 +/- 0.31	21.59 +/- 0.63	29.04 +/- 0.33	30.67 +/- 2.62
ΔflhG/pDAR964::CjflhG	84.29 +/- 0.78	5.09 +/- 0.30	10.61 +/- 1.08	8.18 +/- 2.36
ΔflhG/pDAR964::LbflhG	55.36 +/- 2.52	10.18 +/- 1.77	34.47 +/- 4.29	24.14 +/- 7.62
ΔflhG/pDAR964::LbflhG*	57.54 +/- 7.95	19.87 +/- 4.53	22.59 +/- 3.41	28.81 +/- 2.67

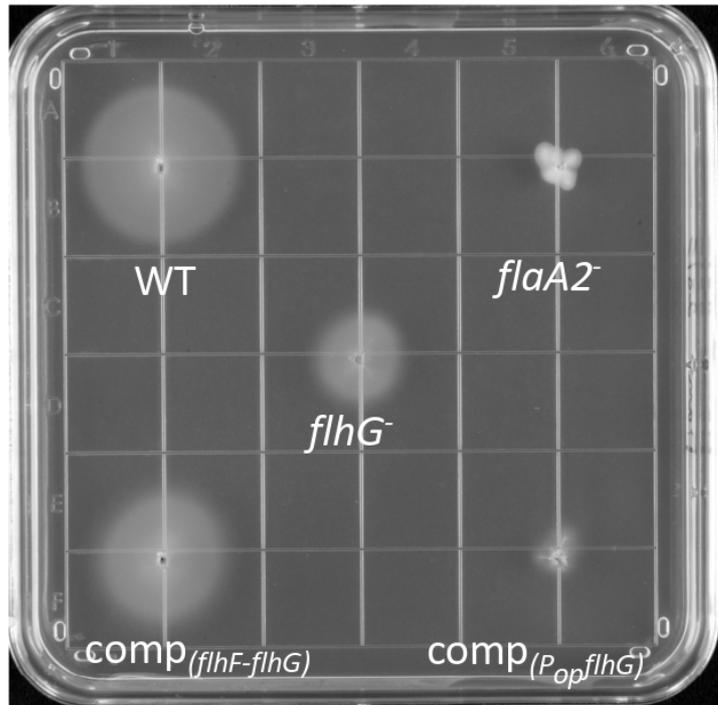
Supplementary Figure 3 : The *L. biflexa flhG* does not complement the *C. jejuni flhG* mutant

A. Sequence alignment of *L. biflexa* and *C. jejuni* FlhG proteins

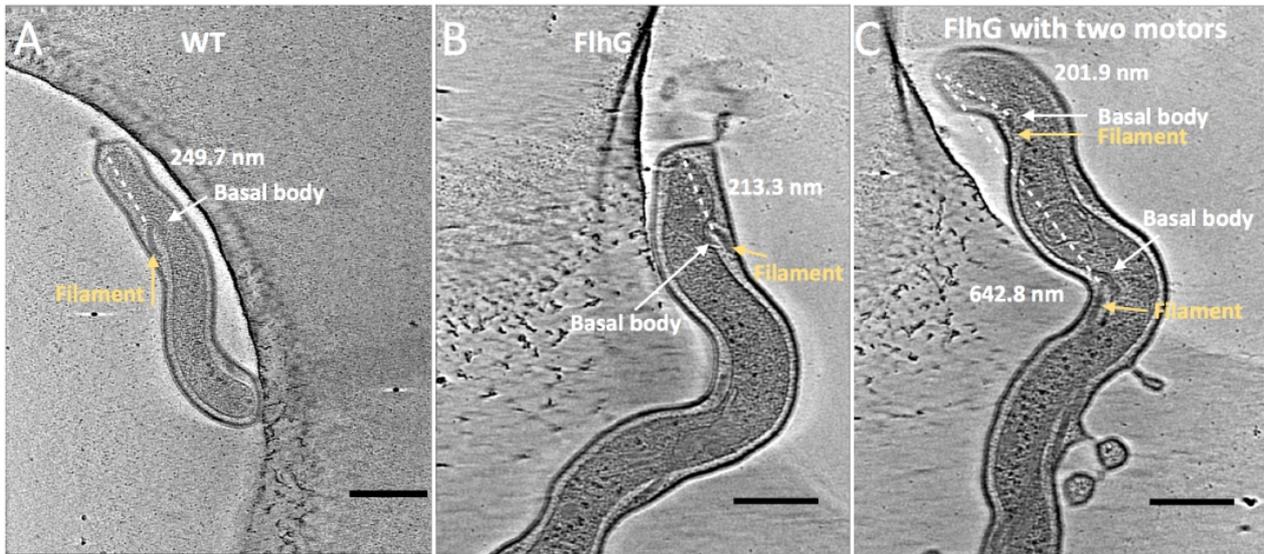
B. Immunoblots showing production of FLAG-FlhG's in *C. jejuni flhG* mutant. The *C. jejuni flhG* mutant was complemented with the *C. jejuni flhG* (*Cj flhG*), the *L. biflexa flhG* (*Lb flhG*), and the *L. biflexa flhG* that is codon-optimized for *C. jejuni* (*Lb flhG**). Immunoblots of anti-Cj RpoA was used as a loading control.

C. Transmission electron micrographs of representative cells of *C. jejuni*

D Table with quantitation of the EM data demonstrating the ability of *C. jejuni* FLAG-FlhG to restore proper flagellation and division to a *C. jejuni flhG* mutant. There are no real differences between the ability of *L. biflexa* FLAG-FlhG to correct the phenotypes of the *C. jejuni flhG* mutant. Data from two separate experiments were combined and averaged to determine the proportion of bacterial populations producing different numbers of polar flagella or cell bodies of different lengths as visualized by transmission electron microscopy



Supplementary Figure 4 : Motility phenotype of *L. interrogans* WT, *flhG*⁻ and complemented (*flhG*⁻ + pMaORI_ *flhF-flhG* and *flhG*⁻ + pMaORI_ *P_{flhF-flhG}flhG*) strains onto soft agar plate. A representative plate from one of three experiments is shown. The non-motile *L. interrogans flhA2*⁻ is also shown.

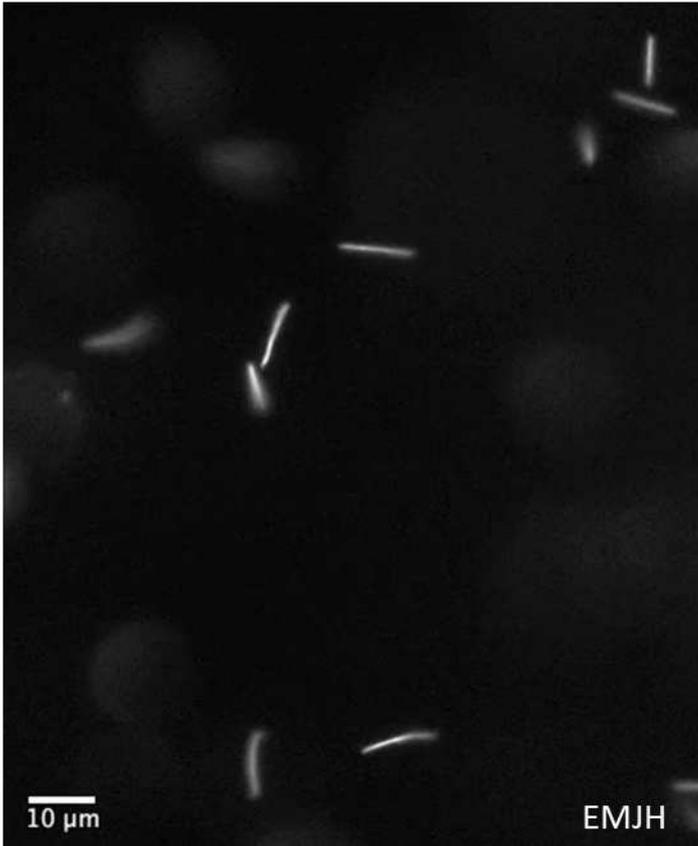


Supplementary Figure 5 Details of the motor to cell tip measurement.

After tomograms were generated, snapshots of the 3D-tomograms were taken to show the round-shaped motor basal body (typically with flagellar filament attached) and the cell tip in the same field of view. IMOD was used to measure the linear distance between the center of the motor to the cell tip. Examples of how distances to cell tips of the WT and *flhG*⁻ strains are shown in the figure above. The motor basal body is indicated with a white arrow, and the filament is indicated with a yellow arrow. Dotted lines indicated the distances between the motors and cell-tips. Scale bars represent 200 nm.

A

L. biflexa WT

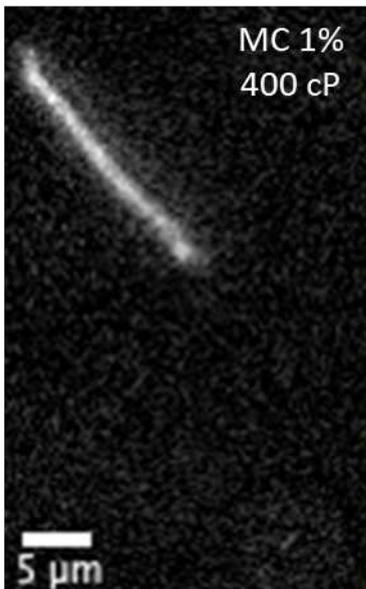


L. biflexa flhG⁻

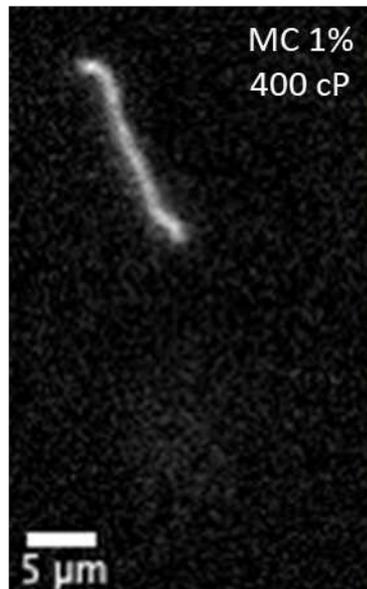


B

L. biflexa WT



L. biflexa flhG⁻



Supplementary video 1 : Representative videos of *L. biflexa* WT and *flhG*⁻ strains observed under dark-field microscopy, magnification x40. (A) Movement of *L. biflexa* WT and *flhG*⁻ mutant in liquid EMJH medium. (B) Digitally zoomed video of individual leptospire in liquid EMJH supplemented with 1% methylcellulose (400 centipoises).

Supplementary Table 1 : The phenotypes of *flhF* and *flhG* mutants in different bacteria

Phylum	Bacteria	Flagella type	Number of flagella in WT	<i>flhF</i> mutant				references
				Flagellar number in <i>flhF</i> -	Position	Motility	Other	
Proteobacteria	<i>C. jejuni</i>	amphitrichous	2	0 or 1	polar or absent	non motile	curved cell shape; less sensitive to bacteriophage infection; unable to colonize host; reduced transcription of flagellar genes	Li et al., 2020; Liang and Conerton, 2018; Ren et al., 2018(a)(b)
	<i>P. aeruginosa</i>	monotrichous	1	1	lateral	reduced	reduced swarming reduced transcription and production of flagellins	Murray and Kazmierczak, 2006
	<i>V. alginolyticus/cholerae</i>	monotrichous	1	0	absent	non motile	reduced transcription of flagellar genes <i>flhF</i> overexpression leads to an increased number of polar flagella	Kusumoto et al., 2006; Correa et al., 2005
	<i>S. putrefaciens/baltica/oneidensis</i>	monotrichous	1	1	lateral	reduced	decreased production of flagellins	Yang and Chen, 2020
	<i>A. hydrophila</i>	monotrichous	0 or 1	0 or 1	polar or absent	non motile	fragmented flagella; reduced transcription of flagellar genes	Wilhelms et al., 2011
Firmicutes	<i>B. subtilis</i>	peritrichous	~20	0	absent	non motile	overexpression of <i>flhF</i> leads to small spherical or filamentous non motile cells virulence attenuation	Carpenter et al., 1992 Mazzantini et al., 2020;
	<i>B. cereus</i>	peritrichous	10 to 12	1 to 3	disorganized	reduced	increased amount of extracellular proteins; decreased level of hemolysins	Mazzantini et al., 2016; Salveti et al., 2007
Spirochetes	<i>B. burgdorferi</i>	polar	9 ± 2	4 ± 2	disorganized	non motile	growth and cell division deficiencies rod-shaped cells unable to form the flagellar flat-ribbon	Zhang et al. 2020

Phylum	Bacteria	Flagella type	Number of flagella in WT	<i>flhG</i> mutant				references
				Flagellar number in <i>flhG</i> -	Position	Motility	Other	
Proteobacteria	<i>C. jejuni</i>	amphitrichous	2	>2	polar	less motile	elongated cells and minicells	Gulbranson et al., 2016; Balaban and Hendrixson, 2011
	<i>P. aeruginosa</i>	monotrichous	1	>1	polar	non motile	random movement in liquid medium	Dasgupta et al., 2000
	<i>V. alginolyticus/cholerae</i>	monotrichous	1	8-10	polar	reduced	FlhF accumulates at poles; hyperflagellated phenotype unstable; <i>flhG</i> overexpression leads to reduced motility and flagella number	Burnham et al., 2020; Kusumoto et al., 2006; Correa et al., 2005
	<i>S. putrefaciens/baltica/oneidensis</i>	monotrichous	1	2-16	polar	non motile	increased production of flagellins	Yang and Chen, 2020; Schuhmacher et al., 2015
	<i>A. hydrophila</i>	monotrichous	0 or 1	0 or 1	polar or absent	non motile	branching rings on agar; fragmented flagella; reduced transcription of flagellar genes	Wilhelms et al., 2011
	<i>H. pylori</i>	lophotrichous	2 or 3	0	absent	non motile	reduced transcription of flagellar genes	van Amsterdam and van der Ende, 2004
Firmicutes	<i>B. subtilis</i>	peritrichous	~20	~20	disorganized	normal	basal body aggregates	Schuhmacher et al., 2015

Supplementary Table 2 : Strains used in this study

strains	genotype	reference
<i>Escherichia coli</i>		
Pi1	DH5a thyA::erm-pir116	(Demarre et al. 2005)
B2163	dapA::erm-pir116 RP4-Tc-Mu-KmR	(Babic et al. 2008)
<i>Leptospira</i>		
Patoc WT	Wild-type <i>L. biflexa</i> serovar Patoc strain Patoc 1	
Patoc WT pMaOri	Patoc WT / pMaOri	This study
P45	flhG::Tn(Km ^R)	This study
P70	flhG::Tn(Km ^R)	This study
ΔLEPBIa0945	LEPBIa0945::Spc ^R	This study
P45 pMaOri	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri	This study
P45 comp(P _{nat} flhG)	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::P _{flhG} flhG	This study
P45 comp(P _{op} flhG)	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::P _{flhF-flhG} flhG	This study
P45 comp(flhF-flhG) _{Lb}	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::flhF-flhG _{Lb}	This study
P45 comp(flhF-flhG) _{Li}	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::flhF-flhG _{Li}	This study
P45 comp(flhF-flhG) _{Bb}	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::flhF-flhG _{Bb}	This study
Manilae WT	Wild-type <i>L. interrogans</i> serovar Manilae strain L495	
Manilae WT pMaOri	Manilae WT / pMaOri	This study
M1341	flhG::Tn(Km ^R)	This study
M1341 pMaOri	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri	This study
M1341 comp(flhF-flhG) _{Li}	flhG::Tn(Km ^R) / pMaOri::flhF-flhG _{Li}	This study
<i>Campylobacter jejuni</i>		
DRH212	Wild-type <i>Campylobacter jejuni</i> strain 81-176 <i>rpsL</i> Sm	(Hendrixson, Akerley et al. 2001)
MB770	81-176 <i>rpsL</i> Sm Δ <i>flhG</i>	(Balaban and Hendrixson 2011)
CRG348	81-176 <i>rpsL</i> Sm Δ <i>flhG</i> /pDAR964	(Gulbranson, Ribardo et al. 2016)
DRH6372	81-176 <i>rpsL</i> Sm Δ <i>flhG</i> /pCRG746 (pDAR964::Cj <i>flhG</i>)	This study
DRH6450	81-176 <i>rpsL</i> Sm Δ <i>flhG</i> /pDRH6447 (pDAR964::Lb <i>flhG</i>)	This study
DRH6452	81-176 <i>rpsL</i> Sm Δ <i>flhG</i> /pDRH6448 (pDAR964::Lb <i>flhG</i> codon	This study

Supplementary Table 3 : Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Reference
pMaORI	<i>E. coli</i> - <i>Leptospira</i> shuttle vector	(Pappas, Benaroudj et al. 2015)
pMaGro	<i>E. coli</i> - <i>Leptospira</i> shuttle vector for gene expression under strong promoter	(Gaultney, Vincent et al. 2020)

comp(P _{nat} flhG)	pMaOri vector with <i>L. biflexa flhG</i> under control of the putative native promoter (300bp upstream of the start codon), inserted between NotI and SacI sites	This study
comp(P _{op} flhG)	pMaOri vector with <i>L. biflexa flhG</i> under control of the promoter of the <i>flhF-flhG</i> operon (300bp upstream of the start codon), inserted between SacI and XbaI sites	This study
comp(flhF-flhG) _{Lb}	pMaOri vector with <i>L. biflexa flhF-flhG</i> under control of the promoter of the <i>flhF-flhG</i> operon (300bp upstream of the start codon), inserted between SpeI and AseI sites	This study
comp(flhF-flhG) _{Li}	pMaOri vector with <i>L. interrogans flhF-flhG</i> under control of the promoter of the <i>flhF-flhG</i> operon (300bp upstream of the start codon), inserted between SpeI and AseI sites	This study
comp(flhF-flhG) _{Bb}	pMaOri vector with <i>B. burgordferi flhF-flhG</i> under control of the promoter of the <i>flhF-flhG</i> operon (300bp upstream of the start codon), inserted between SpeI and AseI sites	This study
pDAR964	<i>E. coli-C. jejuni</i> shuttle vector for expression of N-terminal FLAG-3 tagged proteins in <i>C. jejuni</i>	(Gulbranson, Ribardo et al. 2016)
pCRG746	pDAR964 containing <i>C. jejuni flhG</i> from codon 2 to stop codon 3 inserted into the BamHI site to express FLAG-Cj FlhG	(Gulbranson, Ribardo et al. 2016)
pDRH6447	pDAR964 containing <i>L. biflexa flhG</i> from codon 2 to stop codon inserted into the BamHI and PstI sites to express FLAG-Lb FlhG	This study
pDRH6448	pDAR964 containing a codon-optimized <i>L. biflexa flhG</i> from codon 2 to stop codon inserted into the BamHI and PstI sites to express FLAG-Lb FlhG	This study

1 **Supplementary Table 4** : Primers used in this study

Primer name	Species	Direction	Sequence (5' -> 3')	Comment
CLONING				
<i>Pnat_flhG</i>	<i>L. biflexa</i> serovar Patoc	F	<u>CGAGCTCGCCCTCGCAGTCACAAACG</u>	SacI restriction site underlined
		R	TAAAGCGGCCGCAAATCCGATGAGCACTTAGTTG	NotI restriction site underlined
F		AAA <u>ATTAATTACTTTGATTCTTCCCAACC</u>	AseI restriction site underlined	
R		AAA <u>ACTAGTCGGTTTCCTACTAAAAATCC</u>	SpeI restriction site underlined	
<i>flhF-flhG</i>	<i>L. interrogans</i> serovar Manilae	F	ACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTTTTTTCGTATATGCTTGCAAAGGAA	restriction-free cloning, underlined fragment hybridizes to the vector
R		GGATTGCCTATTTCTAGAGCGGCCAAAGCGACAATTACAAAAACACCA		
<i>flhF-flhG</i>	<i>B. burgdorferi</i> B31	F	AACAGTGCTGACACACTAG	
		R	AACGAAGTTCAAGCAGAAGG	
RT-qPCR				
<i>cysK1</i>	<i>L. biflexa</i> serovar Patoc	F	TCATCGTGGAGCCAACCTTCT	reference gene
		R	TGCCGCTACCATTTCTTGTG	
<i>flhG</i>		F	TACCATGTCGTCAAAGGCCA	
		R	CCACTTCATCAGCAGGCATC	
<i>flhF</i>		F	CCCCTCACATTCTTCCCA	
		R	AACTAAGCTTGATGAAGCAGA	
<i>LEPBlA0945</i>		F	TGGATGCCAAACTTGCGATG	" <i>hfq</i> -like" gene
		R	GGGCATCCTTTGCCATCAT	
<i>flgE</i>		F	CTCCAAAGAACCTGCTCGTG	
		R	AGTGTTACCCAGTTCGTCGT	
<i>flhB</i>		F	GCTCGCCAAAGTCGTGTTAA	
		R	CATCTCTCGTTTGGCTTCCG	
<i>fliD</i>		F	TTTACCGCTCCTTTTGCCAC	
		R	ACTGGAGAGATCCGAAAGCC	
<i>flgJ</i>		F	GGGTAAGGTGAGTTCTTCTTCC	
		R	TGCATACCCACCATCGATGA	
<i>flgH</i>	F	TCCCAAAACCATCCAACCAG		
	R	ACTCCCGTCACTAGAACTGC		

<i>flgG1</i>		F	AACCTTGCCAACGTGAACAC		
		R	AGTTTGTTCCTGTGGCTTG		
<i>fliW</i>		F	GTCTTGCCTTCATTGTGATCCA		
		R	TGAGAATGATGGGCCCTTGT		
<i>flgL</i>		F	CAAGCCACTTCCGACCAAAA		
		R	TGTGGTGCTGTGGATGAGAT		
<i>flgK</i>		F	CGTGCCGTTGTACAGGAAAA		
		R	CCATACCTGCCAGTTCTTGC		
<i>lipL32</i>		<i>L. interrogans</i> serovar Manilae	F	CGTATGATTTCCCAACAGG	reference gene
			R	GCATAATCGCCGACATTCTT	
<i>flhG</i>	F		TCGATGACTCTATCCGCTACT		
	R		TGATCATCGACACTGGTGCT		
<i>flhF</i>	F		GGCTTCAATACAGTGCTCGT		
	R		GCAGATACGATGGGAATGCC		
<i>LIMLP_06730</i>	F		ATATCGTCTCGGGCCAACAT	" <i>hfq</i> -like" gene	
	R		ACTGATTTGTGGGAAGGGTCT		
<i>flhG</i>	<i>B. burgdorferi</i> B31		F	AGCTCCATCGTACCAGAAGC	
			R	CTTGACGCGGACATTGGAAT	
<i>flhF</i>		F	GCTTGCTGAGATGAAGGAGC		
		R	AGGAACAATTTGCCCATCTGT		

2

Chapitre 2 : Implication de la flagelline majoritaire du cœur du filament, FlaB1, dans le phénotype et la structure de l'endoflagelle de *Leptospira* spp.

1. Introduction

L'endoflagelle des spirochètes est une machinerie particulièrement complexe (voir **Figure 39** de l'introduction), composée d'un nombre supérieur d'éléments structuraux et régulateurs que le flagelle des entérobactéries, utilisé historiquement comme référence dans la motilité bactérienne. De nombreux éléments de l'endoflagelle restent inconnus à ce jour – des études en profondeur sont encore nécessaires pour atteindre des connaissances sur la motilité des spirochètes comparables à celles des modèles bactériens comme *E. coli* ou *Salmonella*.

Le filament de l'endoflagelle de tous les spirochètes se compose d'au moins une protéine de cœur (FlaBs) qui est un homologue de la flagelline, entourée d'au moins une protéine de gaine (FlaAs) (385). *Leptospira* possède la structure la plus complexe de tous les spirochètes : le cœur du filament est le produit d'un assemblage de quatre flagellines, FlaB1-4 et sa gaine comporte au minimum cinq éléments structuraux – FlaA1-2, FlaAP, FcpA et FcpB – sachant que les cartes de cryo-tomographie présentent des densités auxquelles nous n'avons pas encore pu associer de protéine (voir **Figure 39** de l'introduction) (360,388). L'une des caractéristiques notoires du filament de *Leptospira* est l'organisation asymétrique de sa gaine protéique – la région concave du filament est composée des protéines d'enroulement du filament FcpA et FcpB, et la région convexe accueille les FlaAs en plus d'autres protéines qui restent à identifier (388).

Une des interrogations principales qui émerge en observant la structure atypique du filament de *Leptospira* repose sur l'origine de cette asymétrie : par quels mécanismes sont recrutés les éléments de la gaine flagellaire afin de se placer spécifiquement sur la face convexe ou concave du filament ?

Un début de réponse à cette question pourrait se trouver dans l'organisation des protofilaments des flagellines FlaBs du cœur du filament – l'hélicité n'est pas parfaite et un joint se forme à cause d'un subtil décalage entre deux de ces protofilaments, car la conformation en hélice droite ne serait pas favorisée d'un point de vue énergétique (**Figure 41-A,B**). L'hypothèse avancée par Brady et ses collaborateurs consiste en la liaison préférentielle des protéines FlaA au niveau de ce joint, bloquant ainsi l'accès à la face concave du filament aux autres protéines de la gaine (**Figure 41-C**) (388). Une fois les FlaAs placés, les protéines FcpA et FcpB se lient sur la face convexe du filament et accentuent sa courbure, qui se traduit par le surenroulement observé sur les flagelles purifiés de *Leptospira* (**Figure 41-D**). En absence d'un des « bloqueurs » de la face concave – FlaA2 – la gaine du filament recouvre symétriquement

le cœur par les protéines FcpA et FcpB, ce qui serait une première validation de l'hypothèse proposée quant à l'origine de l'asymétrie du filament (**Figure 41-E**).

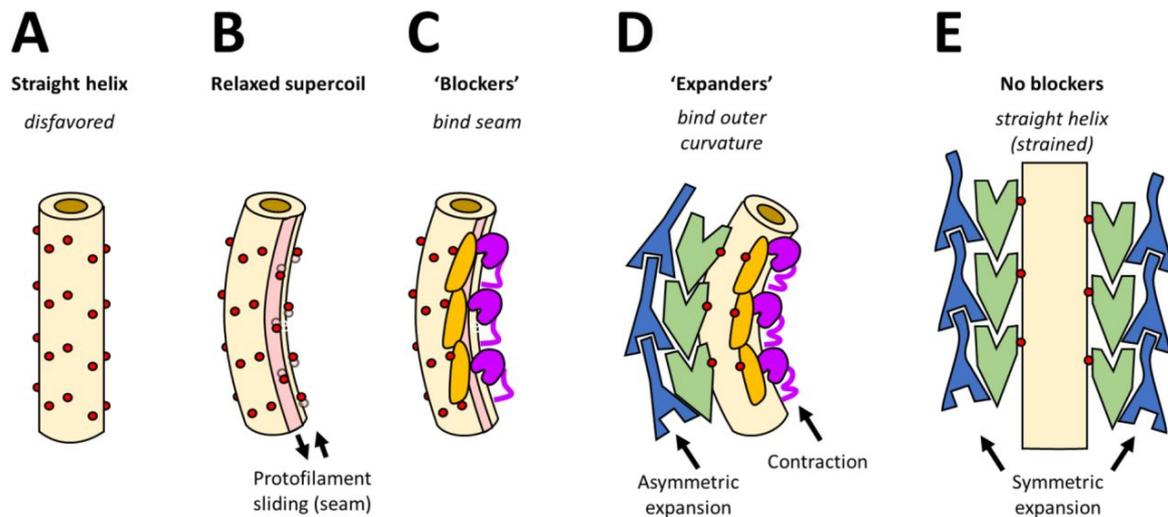


Figure 41 Hypothèse sur l'origine de l'asymétrie du filament de *Leptospira*. Violet = FlaA2 ; jaune = FlaAP ; vert = FcpA ; bleu = FcpB. Figure issue de (388).

Néanmoins, bien que ces observations permettent de nous mettre sur une piste pour décrire l'origine de l'asymétrie du filament flagellaire de *Leptospira*, on doit tout de même se demander quelle est l'implication des quatre isoformes de FlaB qui composent le cœur du filament, qui sont toutes exprimées de manière constitutive mais à des niveaux différents (**Figure 42**) (212,213).

Lors de la synthèse du filament, les différents FlaBs sont-ils organisés d'une manière spécifique ou s'agit-il d'un assemblage aléatoire ? Si l'organisation des FlaBs suit un motif spécifique et conservé, est-elle impliquée dans le recrutement des éléments de la gaine flagellaire par liaisons préférentielles entre chaque isoforme et les divers composants de la gaine ?

L'isoforme FlaB1 est nettement majoritaire avec près de 15 000 copies par cellule chez *L. interrogans*, suivie de FlaB4 et FlaB2 avec entre 3 000 et 5 000 copies par cellule, et l'isoforme le moins exprimé est FlaB3, avec autour de 300 copies par cellule (**Figure 42**).

Flagellar protein quantification Malmström et al., 2009

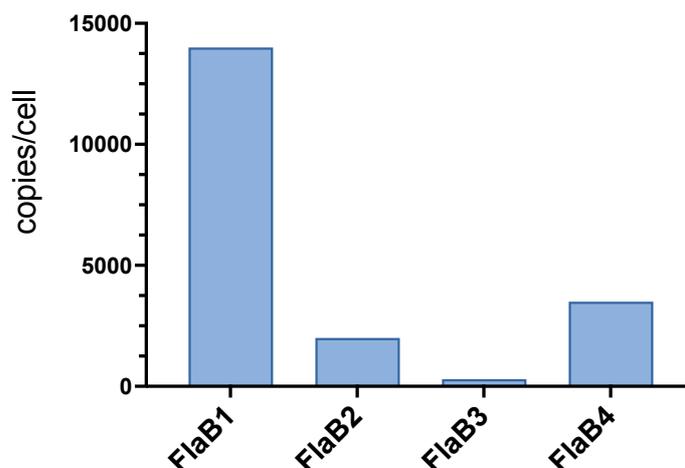


Figure 42 Nombre de copies par cellule des quatre isoformes de FlaB chez *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130, déterminés par spectrométrie de masse quantitative. Données issues de (212).

L'organisation génétique des quatre isoformes de FlaB est relativement conservée entre le pathogène *L. interrogans* et le saprophyte *L. biflexa* (**Figure 43**) – *flaB1* et *flaB2* sont situés en tandem avec un espace intergénique entre les deux d'environ 200 nucléotides chez *L. biflexa* et 450 nucléotides chez *L. interrogans*, suggérant d'une part l'apparition de *flaB2* à la suite d'un événement de duplication de gènes, et d'autre part que la région intergénique contient potentiellement des éléments régulateurs de l'expression de ces flagellines. Les gènes *flaB3* et *flaB4* se trouvent au niveau du même locus génétique chez *L. interrogans*. Chez *L. biflexa*, *flaB3* et *flaB4* se situent à deux endroits différents du génome, démontrant un certain degré de variabilité entre les espèces saprophytes et pathogènes de *Leptospira*.

Protein	Mol. weight	Putative localization in spirochete filaments	Gene names <i>Leptospira biflexa</i> (Uniprot ID)	Gene names <i>Leptospira interrogans</i> (Uniprot ID)	Protein copies per cell in <i>L. interrogans</i> (Malmström et al., 2009)	Sequence homologies
FlaB1	~31 kDa	Core	LEPBlA2133 (BOSSZ5)	LIC11890 (Q8F4M3)	~14,000	<ul style="list-style-type: none"> The four FlaB isoforms are homologous to domains D0+D1 of <i>S. enterica</i> flagellin FljC. FlaB1, FlaB2 and FlaB4 are ~ 65–70% identical to each other in both <i>Leptospira</i> species. <i>L. biflexa</i> FlaB1 is ~ 87% identical to <i>L. interrogans</i> FlaB1.
FlaB2	~31 kDa	Core	LEPBlA2132 (BOSSZ4)	LIC11889 (Q72R59)	~2000	<ul style="list-style-type: none"> <i>L. biflexa</i> FlaB2 is ~ 78% identical to <i>L. interrogans</i> FlaB2.
FlaB3	~31 kDa	Core	LEPBlA1872 (BOSS86)	LIC11532 (Q72S54)	~300	<ul style="list-style-type: none"> FlaB3 is ~ 50–55% identical to the other three isoforms in both <i>Leptospira</i> species. <i>L. biflexa</i> FlaB3 is ~ 62% identical to <i>L. interrogans</i> FlaB3.
FlaB4	~31 kDa	Core	LEPBlA1589 (BOSQZ5)	LIC11531 (Q72S55)	~3500	<ul style="list-style-type: none"> <i>L. biflexa</i> FlaB4 is ~ 92% identical to <i>L. interrogans</i> FlaB4.

Tableau 5 Caractéristiques des quatre flagellines FlaB chez *Leptospira* spp. Figure issue de (360).

Sachant que FlaB1, FlaB2 et FlaB4 partagent environ 70% d'homologie de séquence entre elles, et FlaB3 à hauteur de 50% avec les trois autres (**Tableau 5**), dans quelle mesure

sont-elles redondantes d'un point de vue fonctionnel et structural (360) ? Afin de répondre au moins en partie à cette question, je me suis intéressée dans le cadre de ma thèse à l'étude de l'implication des différents isoformes de FlaB chez le pathogène *L. interrogans* sérovar Manilae et le saprophyte *L. biflexa* sérovar Patoc. Pour cela, j'ai réalisé des analyses phénotypiques, protéomiques et structurales de mutants dans la flagelline principale FlaB1. Le mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* a été récupéré dans la banque de mutants par transposition (*HimarI*) et celui de *L. biflexa* a été généré par échange allélique par recombinaison homologue (**Figure 43**).

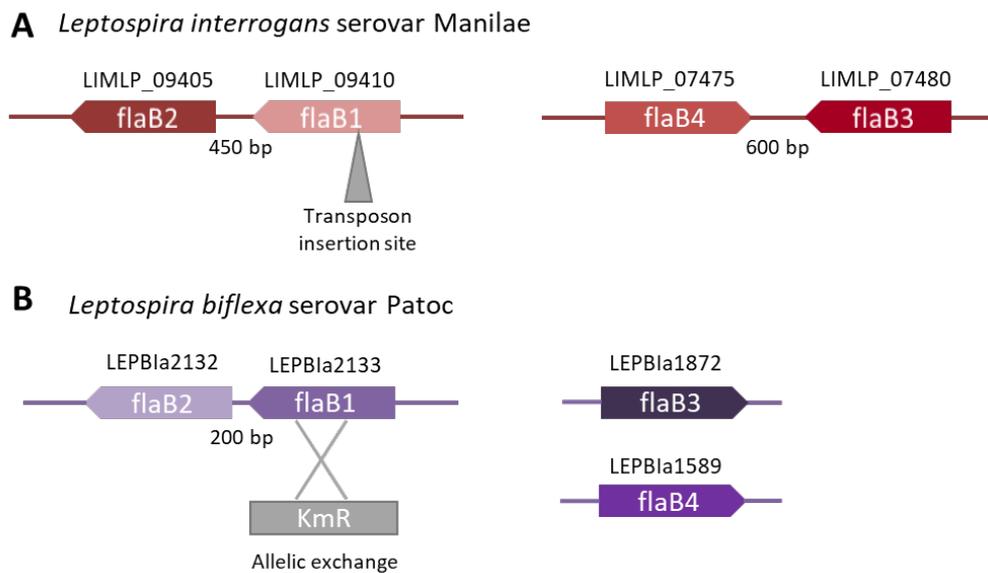


Figure 43 Distribution et organisation des quatre flagellines FlaB chez l'espèce pathogène *L. interrogans* (A) et saprophyte *L. biflexa* (B). En gris sont représentés les événements de mutagenèse à l'origine des mutants *flaB1*⁻ discutés dans ce chapitre.

Dans la suite de ce chapitre, je vais présenter les résultats obtenus au cours de ma thèse pour ensuite discuter des conclusions que nous pouvons en tirer et présenter les connaissances manquantes afin d'avoir une image complète de l'organisation du cœur du filament de l'endoflagelle chez *Leptospira* et son implication dans l'asymétrie du filament. Ces résultats devraient donner lieu à un manuscrit où je serai première auteure.

2. Analyse du phénotype du mutant *flaBI*⁻ de *L. interrogans* sérovar *Manilae*

Les données les plus extensives dans le cadre de ce projet ont été obtenues chez la souche mutante *flaBI*⁻ du pathogène *L. interrogans* sérovar *Manilae*. Cette partie du chapitre résume les observations réalisées quant à son phénotype, et les précisions qu'elles ont apportées au sujet du rôle de FlaB1 dans la formation du filament de l'endoflagelle de *L. interrogans*.

2.1. Résultats expérimentaux

2.1.1. Phénotype de motilité

Afin d'évaluer le profil de motilité d'une souche de *Leptospira*, deux techniques sont utilisées au laboratoire : la mesure des halos de dispersion en milieu semi-solide pour quantifier l'habilité de la souche à progresser en milieux visqueux, et le « tracking » ou mesure de la vitesse de déplacement (vélocité) de leptospires individuelles par microscopie à fond noir, en milieu liquide supplémenté ou non en méthylcellulose afin de faire varier sa viscosité.

Le mutant *flaBI*⁻ présente un défaut de motilité en milieu semi-solide, avec des halos de dispersion correspondant à environ 30% de ceux du sauvage et comparables à ceux du mutant non-motile *flaA2* (**Figure 44-A,B**). Cependant, les mesures de vélocité en milieu EMJH liquide non-visqueux n'ont démontré aucune différence significative entre le mutant et le sauvage (**Figure 44-B,C**). Ces résultats indiquent que le mutant *flaBI*⁻ est toujours capable de produire des endoflagelles, mais qui ne sont pas optimaux pour le déplacement en milieux visqueux.

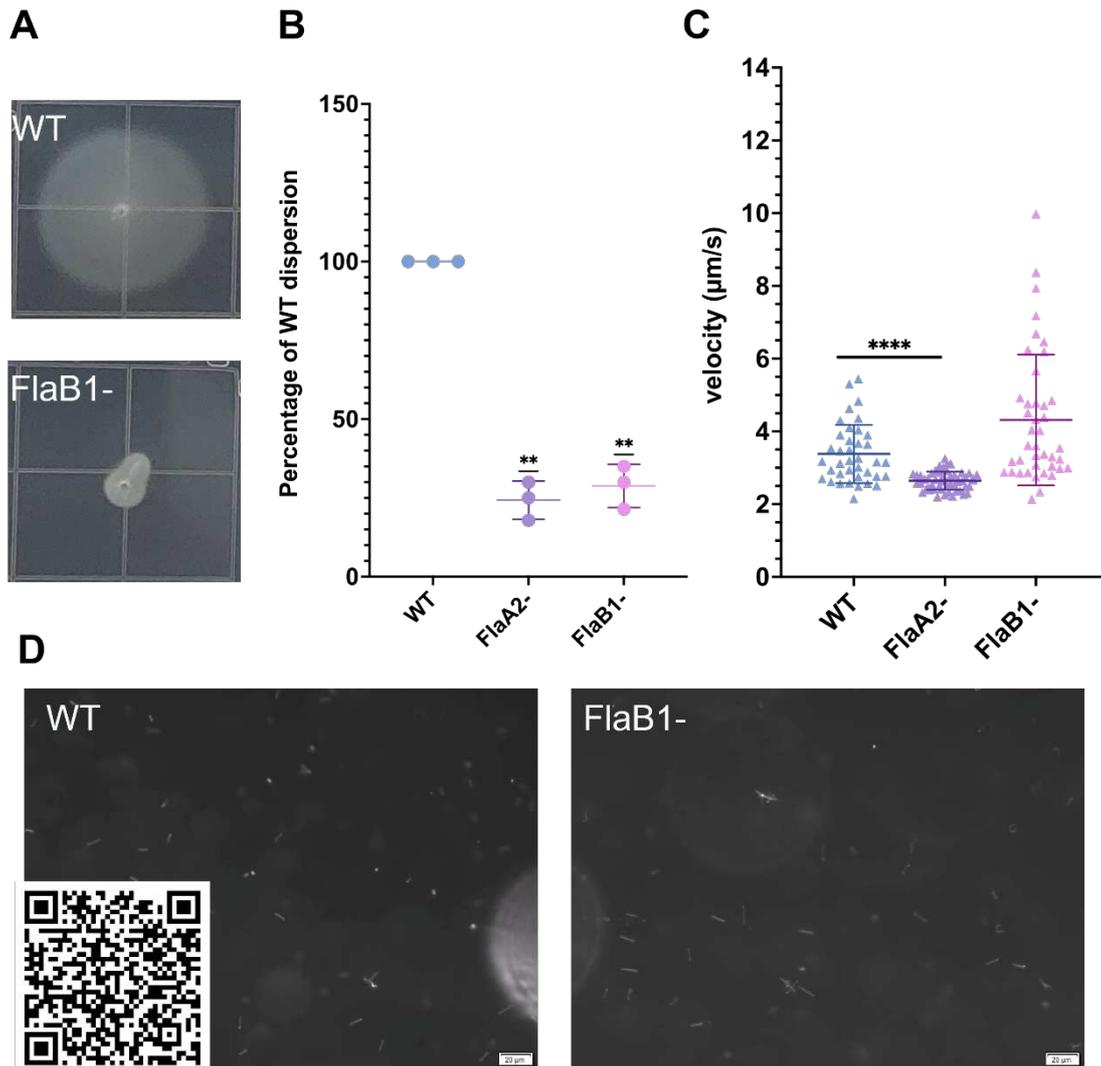


Figure 44 Phénotype de motilité du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* en milieu semi-solide et liquide. (A) Halos de dispersion de la souche sauvage (WT) et du mutant *flaB1*⁻ en EMJH-agar 0,8% après 10 jours d’incubation à 30°C. (B) Quantification de la taille des halos de dispersion normalisés par rapport aux valeurs sauvages. (C) Mesures de la vélocité de la souche sauvage et du mutant *flaB1*⁻ en milieu EMJH liquide sans ajout de méthylcellulose. La vélocité d’environ 60 bactéries a été mesurée pour chaque souche. (D) Vidéos représentatives de la motilité en milieu liquide des deux souches étudiées dans ce chapitre. Scanner le QR code pour accéder aux fichiers vidéo. Le mutant *flaA2*⁻ sert de contrôle non-motile. ** = p-value < 0.01; **** = p-value < 0.0001

2.1.2. Virulence

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* à établir une infection aigüe chez le modèle animal sensible à la leptospirose, le hamster. Pour cela, 10⁶ bactéries ont été inoculées péritonéalement dans deux groupes de quatre hamsters – un groupe a été infecté par la souche sauvage et l’autre par la souche *flaB1*⁻, dans le respect des réglementations en vigueur sur l’expérimentation animale. La survie des hamsters infectés a été suivie quotidiennement pendant 20 jours et les animaux ont été euthanasiés s’ils étaient

visiblement souffrants. Les résultats démontrent une abolition totale de la virulence du mutant *flaBI*⁻ chez le hamster, alors que les animaux infectés par la souche sauvage sont décédés à 7 jours post-infection (**Figure 45-A**). Additionnellement, aucun spirochète n'a pu être récupéré à partir des organes cibles (rein, foie) à la suite de l'euthanasie de l'animal au 20^{ème} jour post-infection par le mutant *flaBI*⁻, suggérant que ce mutant n'était également plus capable de coloniser l'animal.

Afin de vérifier cette dernière observation, nous avons procédé à un essai de translocation : cette expérience vise à évaluer la capacité des leptospires à traverser une monocouche de cellules eucaryotes épithéliales (ici MDCK1, cellules épithéliales de rein canines – le chien étant un hôte sensible à la leptospirose). En pratique, on commence par ensemençer des inserts de culture cellulaire d'une porosité de 3 µm (pour permettre aux leptospires de passer au travers) avec les cellules épithéliales eucaryotes MDCK1 et on incube ces inserts jusqu'à confluence à 37°C, 5% CO₂. La confluence est vérifiée par ajout de bleu de Trypan à 0,4% dans le compartiment supérieur et on surveille s'il y a des fuites dans le compartiment inférieur – si on en observe, cela signifie que la confluence n'a pas encore été atteinte. Après l'obtention de monocouches épithéliales intègres, on rajoute 10⁷ leptospires resuspendues dans un mélange à volume égal de milieu EMJH et eucaryote (DMEM) dans le compartiment supérieur de l'insert, puis on laisse incuber à 37°C, 5% CO₂. A 6 et 24h après inoculation, un échantillon des milieux des compartiments inférieurs est prélevé et observé par microscopie à fond noir dans une chambre Petroff-Hausser afin de compter les leptospires ayant réussi à traverser la monocouche de cellules épithéliales.

Les résultats de cette expérience de translocation en utilisant le mutant *flaBI*⁻ démontrent qu'il traverse les barrières épithéliales de manière moins efficace, à hauteur de 11% du nombre total de leptospires sauvages énumérées à 24h post-inoculation (**Figure 45-B**). Cette perte de performance à traverser rapidement les barrières tissulaires est un désavantage lors de l'infection chez l'hôte, car cela rend les leptospires plus vulnérables face aux défenses immunitaires, et sont par conséquent plus rapidement éliminées de l'organisme.

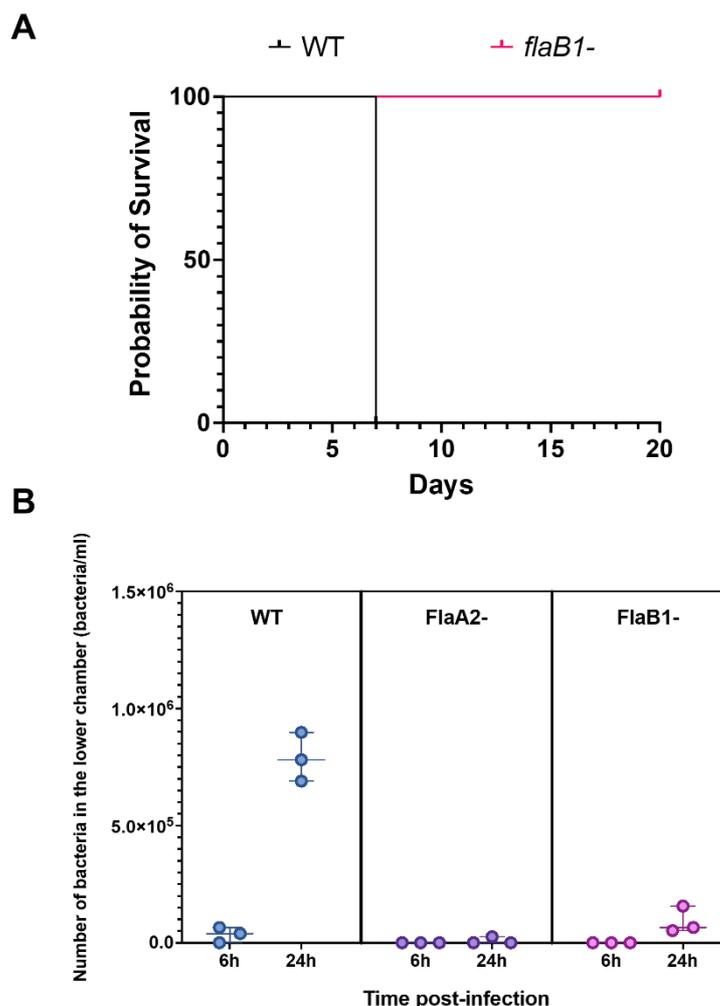


Figure 45 Détermination du phénotype de virulence du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans*. (A) Infection de hamsters par 10⁶ bactéries de la souche sauvage ou mutante. (B) Nombre de bactéries récupérées dans la chambre inférieure après 6 et 24h d'incubation sur une membrane poreuse recouverte d'une couche de cellules épithéliales canines. Le mutant *flaA2*⁻ sert de contrôle non-motile.

2.1.3. Morphologie cellulaire

Les flagelles étant souvent impliqués dans la morphologie des spirochètes, notamment pour déformer les extrémités de la cellule en conformation « crochet » ou « spirale » chez *Leptospira* (voir chapitre « Morphologies des spirochètes » dans l'introduction), nous avons naturellement cherché les différences au niveau de la morphologie cellulaire entre le sauvage et le mutant *flaB1*⁻.

En microscopie à fond noir, aucune différence flagrante n'a été observée – le mutant *flaB1*⁻ est toujours capable de déformer ses extrémités cellulaires en « crochet » ou en « spirale » et alterner entre les deux (voir vidéos de la **Figure 44-D**). L'observation de cellules entières par microscopie électronique à contraste négatif (acétate d'uranyle à 4%) n'a révélé

aucune différence majeure entre le sauvage et le mutant, mais il faut garder à l'esprit que cette technique peut modifier l'aspect des cellules à cause de la perte de la teneur en eau des échantillons (**Figure 46-A**). Nous voulions ensuite déterminer si le mutant *flaB1*⁻ était capable de produire des endoflagelles polaires, et si c'est le cas, mesurer leur longueur ainsi que celle des cellules entières. Pour cela, nous avons fixé et perméabilisé les deux souches sur lame et marqué les endoflagelles avec des anticorps monoclonaux anti-FlaB1 et anti-FlaB4 (voir les raisons derrière le choix de ces deux anticorps plus loin dans le manuscrit) couplés à un anticorps secondaire fluorescent. Les corps cellulaires sont visualisés grâce à un marquage au DAPI qui est un intercalant de l'ADN – ce marquage remplit la totalité de la cellule car l'ADN est diffus dans le cytoplasme des bactéries. Les lames ainsi préparées sont observées au microscope confocal à fluorescence (manipulé à la plateforme d'imagerie de l'Institut Pasteur avec l'assistance de Alexandre Giraud-Gatineau). Plusieurs clichés sont réalisés pour chaque souche et les longueurs des cellules et flagelles mesurés grâce au logiciel d'analyse d'image FIJI (ImageJ).

Les résultats de cette expérience démontrent que d'une part, le mutant *flaB1*⁻ est capable de synthétiser des endoflagelles localisés aux pôles de la cellule, comme le suggérait le maintien de la capacité du mutant à se mouvoir en milieu liquide (**Figure 46-B**). D'autre part, nous remarquons que les longueurs des endoflagelles et de la cellule sont significativement supérieures à celles du sauvage – cependant, si l'on réalise le rapport entre ces deux mesures (flagelles sur cellule), il n'y a plus de différence avec la souche sauvage. Ce ratio permet de déterminer que les longueurs des endoflagelles restent proportionnelles à la taille augmentée des cellules chez le mutant *flaB1*⁻ (**Figure 46-C**).

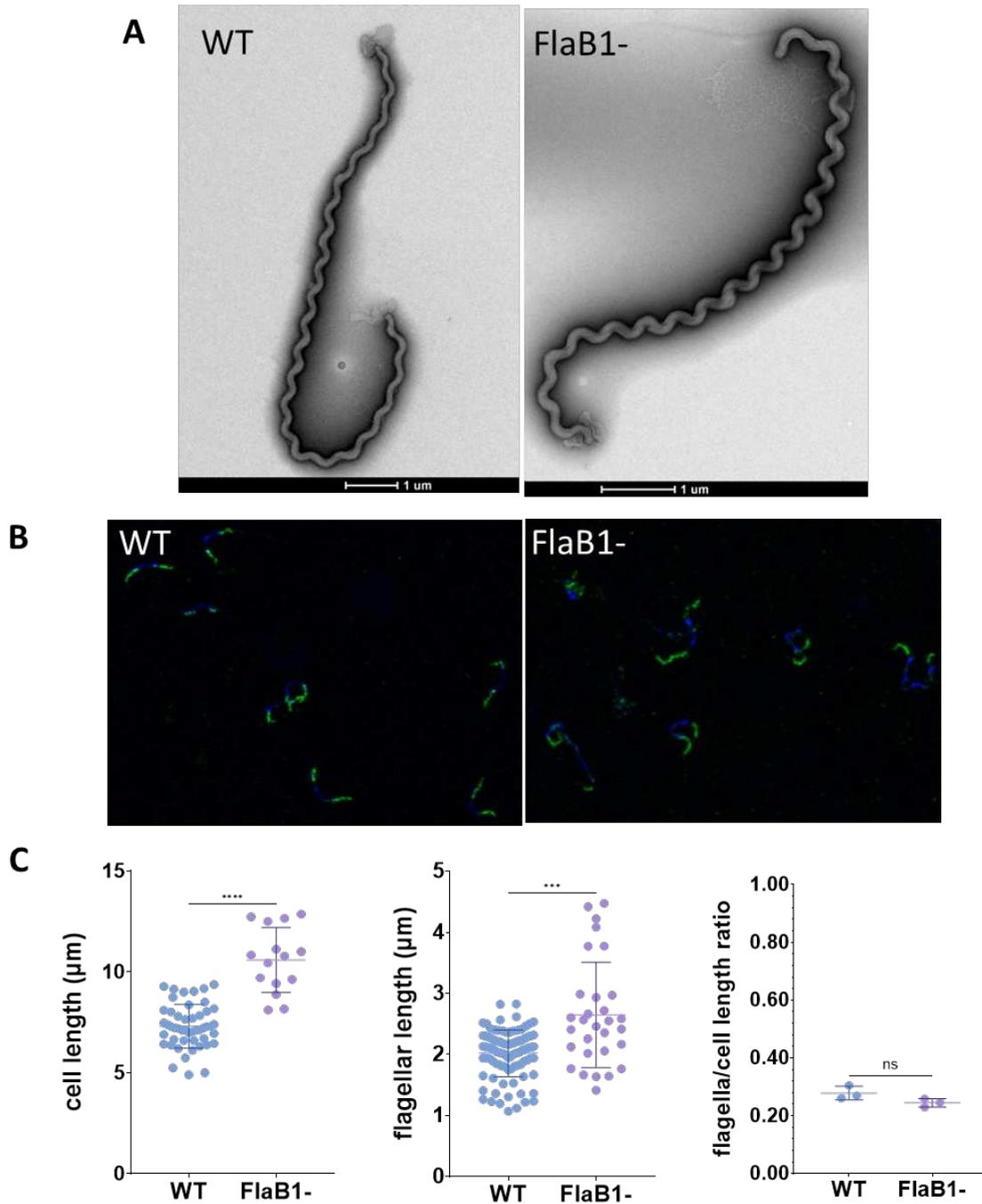


Figure 46 Etude de la morphologie cellulaire de la souche sauvage et le mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans*. (A) Clichés de microscopie électronique à transmission en contraste négatif. (B) Clichés du marquage immunofluorescent des endoflagelles du sauvage et du mutant *flaB1*⁻. Vert = endoflagelles ; bleu = ADN. (C) Mesures de la longueur cellulaire (gauche), de la taille des flagelles (milieu) à partir des clichés d'immunofluorescence, et le rapport entre la longueur de la cellule sur la longueur des flagelles (droite). *** = p-value < 0.001 ; **** = p-value < 0.0001 ; ns = non significatif

2.1.4. Expression des protéines des autres éléments structuraux de l'endoflagelle

Visiblement, les résultats obtenus à ce stade nous suggèrent que la délétion de la protéine majoritaire du filament FlaB1 était partiellement compensée par d'autres protéines du flagelle pour former un endoflagelle semblable à celui du sauvage. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons purifié les endoflagelles en cinq réplicats biologiques comme décrit précédemment dans la littérature (139) et procédé à une quantification des protéines présentes dans les extraits flagellaires par spectrométrie de masse LC-MS/MS, en collaboration avec Magalie Duchateau de la plateforme de protéomique de l'Institut Pasteur.

La **Figure 47** représente les résultats de cette quantification : ils confirment l'abolition de l'expression de FlaB1, mais mettent aussi en évidence une forte diminution de l'expression de FlaB2 et FlaB3, et une augmentation de l'expression de FlaB4. Les 10% d'expression de FlaB1 observés correspondent aux peptides issus de la traduction de la région en N-terminale précédant le site de l'insertion du transposon – il ne s'agit donc pas de protéines fonctionnelles (voir **Figure S 1**). Les protéines de la gaine flagellaire, à savoir FlaA1, FlaA2, FcpA et FcpB ont des niveaux d'expression comparables au sauvage.

Nous avons réalisé des Western-blot afin de déterminer si les différences de quantités des protéines FlaB du mutant par rapport au sauvage observées en protéomique sont également visibles par le biais de cette technique (**Figure 47-B**). Pour cela, 10 ou 20 µg d'extraits cellulaires bruts de protéines du sauvage ou du mutant *flaB1*⁻ ont été migrés sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été d'abord bloquée par des protéines de lait afin de masquer les sites aspécifiques, puis incubée en présence d'anticorps monoclonaux primaires anti-FlaB1, FlaB2, FlaB3 et FlaB4 produits chez le lapin. Ces anticorps ont été obtenus par immunisation de lapins par des peptides spécifiques de chaque isoforme des FlaBs de *L. interrogans*. Additionnellement, l'anticorps polyclonal anti-Loa22 a été utilisé pour vérifier que les niveaux de protéines totales chargés sur le gel sont comparables. Finalement, après plusieurs lavages, la membrane a été incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à la protéine HRP, produit chez la chèvre. La membrane a ensuite été révélée à l'aide de réactifs activant la HRP disponibles commercialement et scannés par un lecteur spécifique détectant la chimioluminescence.

Nous avons ainsi pu confirmer les observations effectuées en protéomique – le mutant *flaB1*⁻ n'exprime plus les flagellines FlaB1, FlaB2 et FlaB3 (la bande observée est aspécifique,

car également présente chez un mutant *flaB3*⁻ de *L. interrogans*) et surexprime FlaB4. Ces résultats suggèrent fortement l'implication d'un mécanisme de compensation par la surexpression de FlaB4 pour remplacer l'absence de la flagelline majoritaire FlaB1. Ce qui est moins intuitif, c'est la diminution de l'expression de FlaB2 et FlaB3 – celle de FlaB2 pourrait s'expliquer par un éventuel effet polaire de l'insertion du transposon dans le gène *flaB1* sur *flaB2* qui se situe juste en aval dans le même cadre de lecture (voir **Figure 43-A**). Une autre hypothèse serait qu'il existe un mécanisme de régulation réalisé directement par les flagellines afin de moduler l'expression des autres isoformes, ce qui pourrait également expliquer la baisse de l'expression de FlaB3, dont le gène est localisé à un endroit différent et éloigné du génome.

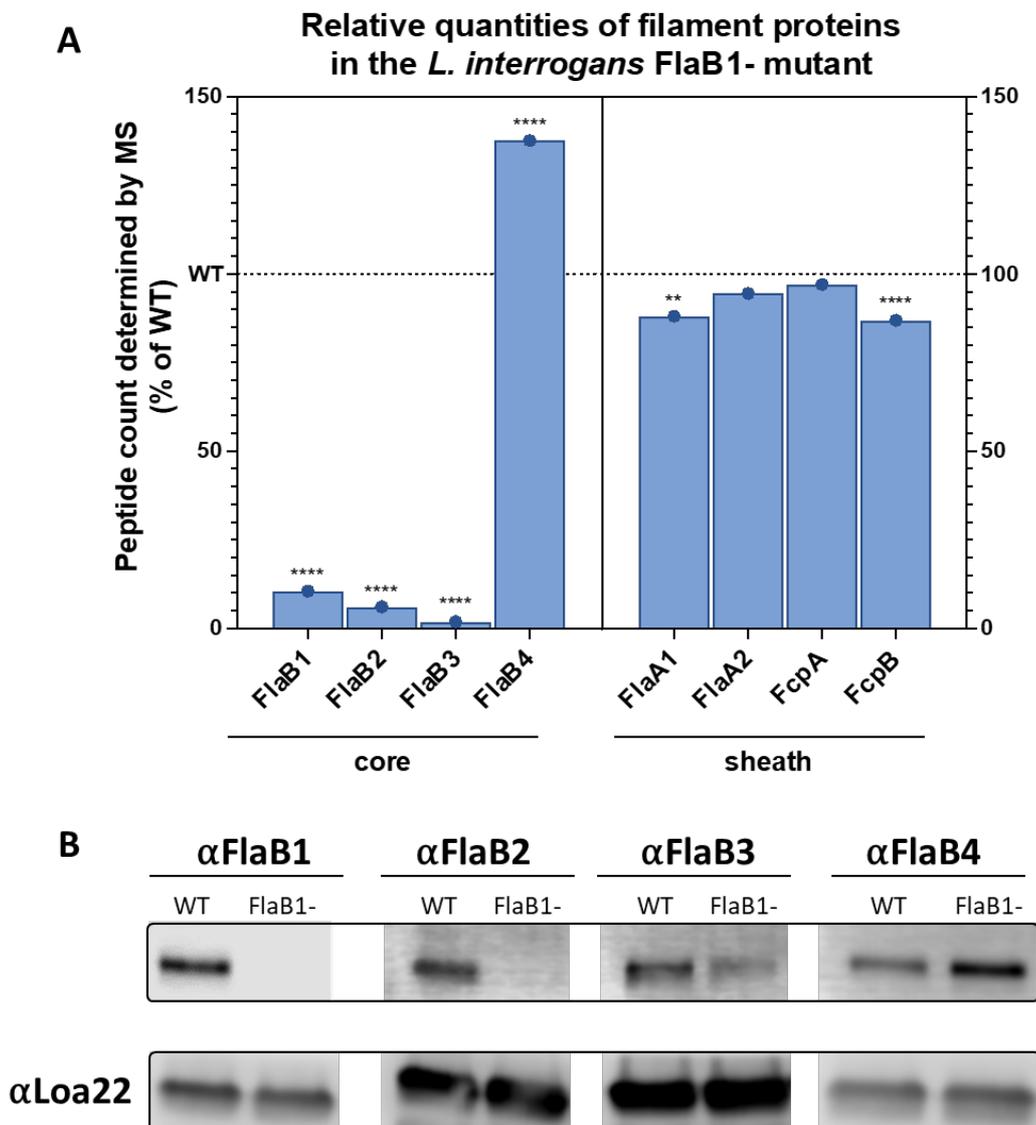


Figure 47 Analyse protéomique de la composition des endoflagelles du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* comparée à la souche sauvage. (A) Données de protéomique des composants de l'endoflagelle du mutant normalisées par rapport au sauvage. (B) Western-blot contre les quatre isoformes de FlaB détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques à chaque isoforme. Loa22, protéine membranaire, fait office de témoin de charge. ** = p-value < 0.01 ; **** = p-value < 0.0001

2.1.5. Structure des endoflagelles

Maintenant que nous savons que le mutant *flaBI*⁻ produit des endoflagelles supposément constitués de l'unique flagelline FlaB4 dans son cœur et toutes les protéines de la gaine flagellaire, nous avons regardé de plus près la structure des endoflagelles purifiés par microscopie électronique. Les endoflagelles des souches sauvages et mutantes ont été purifiés de la même manière que pour les études en protéomique (voir partie précédente), puis fixés sur des grilles de microscopie électronique, colorées à l'acétate d'uranyle à 4% et observées par microscopie électronique à transmission à la plateforme de bioimagerie ultrastructurale (UBI) de l'Institut Pasteur.

Ces clichés nous fournissent plusieurs informations : le mutant *flaBI*⁻ produit des endoflagelles qui semblent plus fragiles et cassants – les fragments de flagelles observés sur l'ensemble de la grille de microscopie sont plus courts que ceux du sauvage (**Figure 48-A,C**). Cela pourrait signifier que les endoflagelles sont naturellement plus courts *in vivo* chez le mutant *flaBI*⁻, mais nous savons que ce n'est pas le cas grâce aux données de longueur flagellaire obtenues par microscopie à immunofluorescence, d'après lesquelles ils sont de longueur comparable au sauvage (voir **Figure 46-B**). L'autre hypothèse serait que les endoflagelles du mutant *flaBI*⁻ sont plus fragiles que ceux du sauvage, cassant plus facilement lors du processus de purification. La mesure du diamètre des flagelles sur leur partie la plus épaisse démontre que les flagelles du mutant *flaBI*⁻ seraient très légèrement plus fins que ceux du sauvage (**Figure 48-B**). Finalement, le dernier phénomène que nous avons observé sur les images de microscopie électronique est que les fragments de flagelles du mutant *flaBI*⁻ ne présentent pas un affinement sur leur extrémité, phénomène qui est observable sur les flagelles sauvages : ceci correspond à la perte locale de la gaine flagellaire lors de la purification (**Figure 48-D**). Ainsi, nous avons décompté le nombre de fragments présentant une région fine à l'extrémité chez le sauvage et le mutant sur trois répliquats biologiques. Sur plus de 500 fragments comptés dans chaque condition, ceux du mutant *flaBI*⁻ ne présentaient quasiment aucune région fine (~3%), tandis que la fraction des fragments du sauvage possédant une région fine s'élève à hauteur de 40% (**Figure 48-D**). En complément de la légère diminution du diamètre des flagelles, ceci pourrait évoquer une perte totale de la gaine flagellaire chez le mutant *flaBI*⁻, mais nous avons vu que d'après les données de protéomique sur les endoflagelles purifiés, l'ensemble des protéines de la gaine est produit à des niveaux similaires au sauvage. De ce fait, un réarrangement de la gaine semble plus plausible pour expliquer la diminution du diamètre du flagelle.

Dans l'ensemble, ces derniers résultats nous montrent que les flagelles du mutant *flaBI*⁻ semblent être plus fragiles que ceux du sauvage, un peu plus fins et équipés d'une gaine moins épaisse, probablement réarrangée par rapport à la structure du sauvage. Nous pourrions nous interroger sur la capacité de liaison de la flagelline FlaB4 (isoforme majoritaire chez le mutant) à la gaine – l'interaction entre FlaB4 et les éléments de la gaine flagellaire est peut-être plus forte, ce qui pourrait augmenter la rigidité du filament, et par extension générer une fragilité : pour faire le parallèle avec la célèbre fable de Jean de La Fontaine, « Le Chêne et le Roseau » (411), les filaments du mutant *flaBI*⁻ seraient comparables au chêne qui brise sous la pression du vent (ici, la manipulation des flagelles lors de leur purification), alors que les filaments sauvages seraient le roseau, plus souples, donc plus résistants face au stress mécanique.

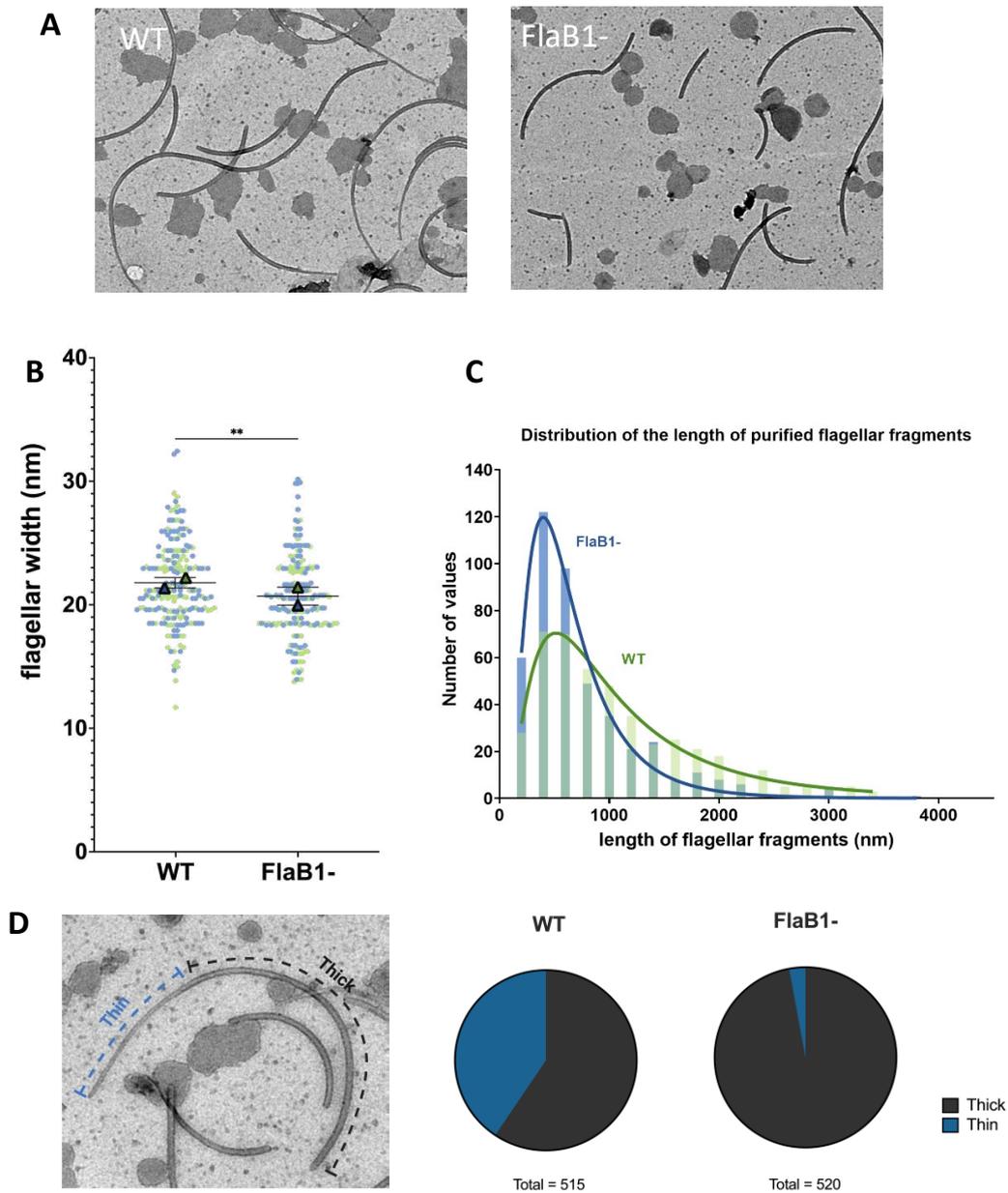


Figure 48 Analyse des endoflagelles purifiés et observés par microscopie électronique à transmission du sauvage et du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans*. (A) Clichés de microscopie électronique des endoflagelles purifiés. (B) Mesures du diamètre des flagelles. (C) Distribution des longueurs des fragments de flagelles observés en microscopie électronique. (D) Schéma explicatif des régions fines (bleu) et épaisses (noir) du flagelle, décomptées sur les clichés de microscopie électronique du sauvage et du mutant. ** = p-value < 0.01

Les données de microscopie électronique à transmission ne sont pas suffisantes pour élucider la structure du filament du mutant *flaB1*⁻ – ainsi, nous avons fait appel à nos collaborateurs Megan Brady et Charles Sindelar (Université de Yale, New Haven, Etats-Unis) qui sont experts en reconstruction des structures du filament flagellaire par cryo-tomographie électronique. Ces expériences ont été réalisées très récemment par rapport à l’écriture de ce manuscrit de thèse, nous ne pouvons nous baser que sur quelques résultats préliminaires

(Figure 49). Effectivement, on constate des différences structurales entre le mutant *flaB1*⁻ et le sauvage – plusieurs zones de la gaine du filament semblent réarrangées. Cependant, ce sont les seules observations que nous pouvons avancer à ce stade – il faut maintenant identifier les protéines composant la gaine par homologie avec les cartes structurales obtenues chez le saprophyte *L. biflexa*, pour lequel il existe un modèle 3D de la structure du filament (360,388), et les données protéomiques à disposition.

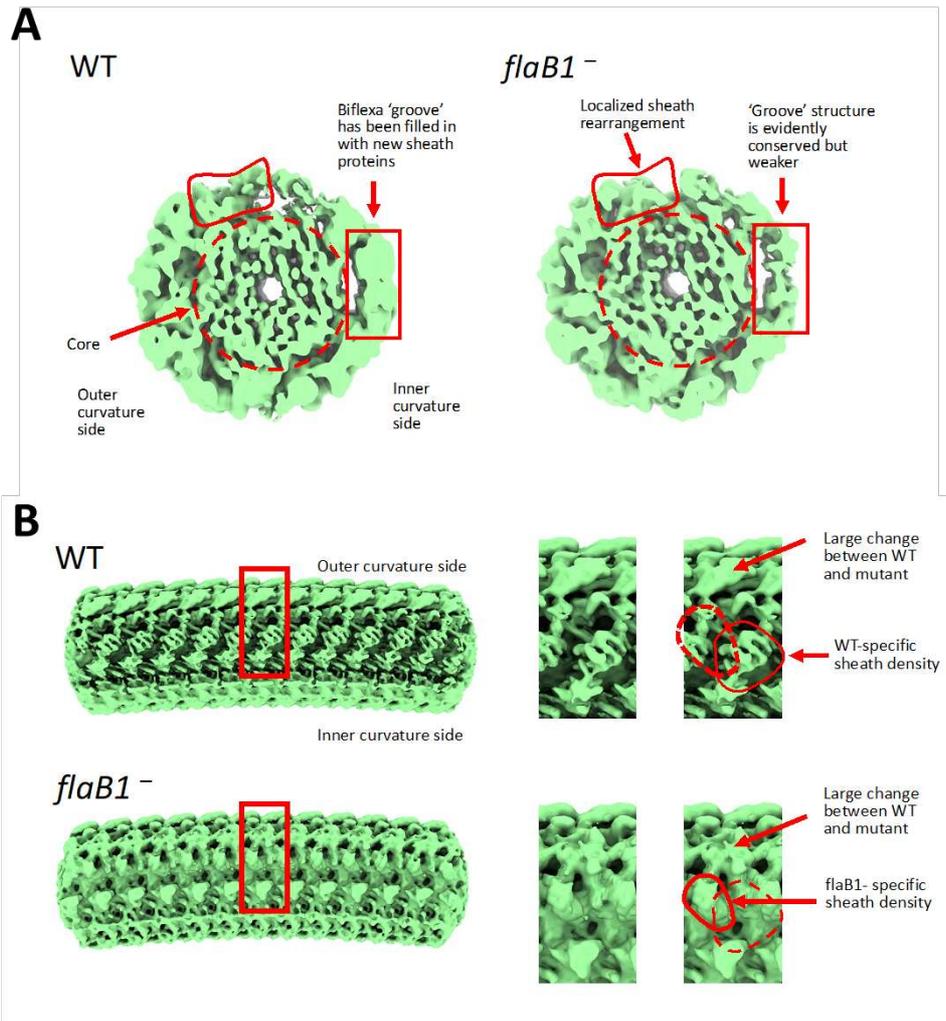


Figure 49 Reconstructions du filament flagellaire par cryo-tomographie électronique du sauvage et du mutant *flaB1*⁻. (A) Coupe transversale. (B) Vue latérale et agrandissement des zones de la structure qui varient entre les deux souches. Les encadrés et flèches rouges indiquent les différences observées.

2.1.6. Complémentation fonctionnelle

Une condition non négligeable pour confirmer que le phénotype d'un mutant est dû uniquement à la disruption du gène ciblé est de réaliser une complémentation en *trans* par la réintroduction de la copie sauvage du gène par le biais d'un vecteur d'expression, afin de restaurer le phénotype sauvage (postulats moléculaires de Koch). Cependant, comme cela a été

abordé dans la partie « Outils de manipulation génétique et post-génomique » de l'introduction, la complémentation fonctionnelle des mutants chez les spirochètes est un processus fastidieux et souvent infructueux, partiellement dû à l'absence de connaissances suffisantes sur les systèmes de régulation génétique des spirochètes.

Nous avons construit plusieurs constructions génétiques pour tenter de compléter le mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* :

- La phase de lecture ouverte (ORF) de *flaB1* précédé de 300 paires de bases en amont du gène, correspondant à la région promotrice putative dans le sens de lecture +1 par rapport au vecteur plasmidique
- La même construction que précédemment mais dans le sens de lecture -1 par rapport au vecteur plasmidique
- Et finalement, les gènes *flaB1-flaB2*, région intergénique incluses, aussi précédés de 300 nucléotides afin d'inclure le promoteur natif.

Malheureusement, alors que la protéine FlaB1 est bien produite comme en atteste un Western blot, aucune de ces constructions n'a permis de restaurer le phénotype sauvage chez le mutant *flaB1*⁻. La motilité en milieu semi-solide est toujours inférieure à celle du sauvage – les halos de dispersion observés étaient très variables entre les réplicats, sans jamais atteindre une dispersion de type sauvage – il pourrait toutefois s'agir d'une complémentation très partielle (**Figure 50-A,B**). De plus, comme déterminé par RT-qPCR, l'expression des autres flagellines (FlaB2-4) n'était pas restaurée au niveau sauvage.

Ces observations indiquent que la régulation de l'expression des flagellines est particulièrement complexe et incompatible avec une réintroduction du gène sauvage en *trans*. Pour tenter de contourner ce problème, on pourrait essayer de réintroduire la copie sauvage du gène *flaB1* dans le chromosome par recombinaison homologe. Cependant, nous savons déjà que la mutagenèse dirigée est très peu efficace chez la souche pathogène, donc cela ne garantit aucun résultat.

Il faudra aussi séquencer le génome entier du mutant *flaB1*⁻ afin de rechercher d'éventuelles mutations dans d'autres gènes qui, à notre insu, participeraient au phénotype du mutant.

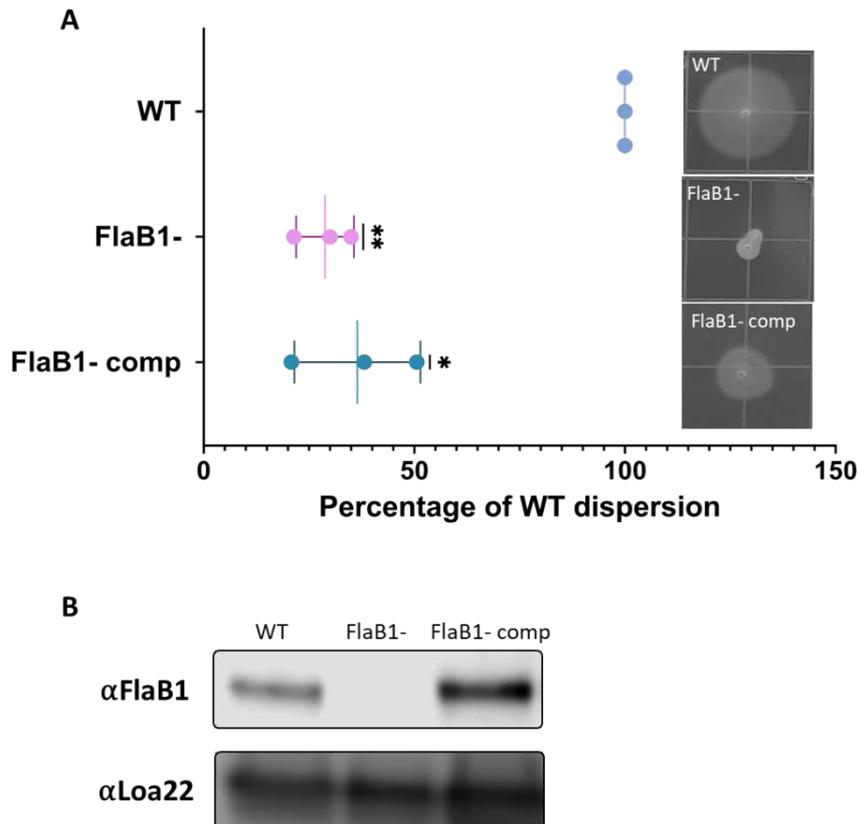


Figure 50 Complémentation fonctionnelle du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans*. (A) Mesure et clichés des halos de dispersion en milieu semi-solide de la souche sauvage, du mutant *flaB1*⁻ et du mutant complémenté par la construction *flaB1(sens +1)*. Le cliché du mutant complémenté correspond à la meilleure dispersion obtenue parmi les réplicats. (B) Western-blot anti-FlaB1 chez le sauvage, le mutant *flaB1*⁻ et le mutant complémenté par la construction *flaB1(sens +1)*. Loa22, protéine membranaire, fait office de témoin de charge. ** = p-value < 0.01 ; * = p-value < 0.05

3. Conclusion générale sur le rôle des FlaBs et perspectives

Pour résumer, le mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* présente un phénotype fort intéressant. La virulence et la capacité de coloniser l'animal est abolie, mais la motilité n'est impactée qu'en milieu semi-solide. Afin de préciser et confirmer le phénotype de motilité, il serait utile de réaliser des mesures de vitesse dans du milieu liquide supplémenté avec plusieurs concentrations de méthylcellulose afin de faire varier la viscosité : cela permettrait peut-être de déterminer un « seuil de viscosité » du milieu dans lequel le mutant *flaB1*⁻ n'est plus capable de se déplacer.

Ensuite, l'analyse de la structure des endoflagelles du mutant *flaB1*⁻ nous suggère que la flagelline FlaB4 est surexprimée dans le but de secourir l'absence de la flagelline majoritaire et former un endoflagelle quasi fonctionnel. Néanmoins, les raisons derrière la répression des flagellines FlaB2 et FlaB3 ne sont pas claires – cela nous indique seulement qu'un mécanisme

de régulation inconnu entre en jeu pour sélectionner une flagelline plutôt qu'une autre pour former le cœur du filament.

Bien que des endoflagelles en apparence entières se forment chez le mutant *flaB1*⁻, ils présentent quelques faiblesses au niveau de leur structure, notamment un diamètre plus fin et une fragilité accrue observée lors de la purification des endoflagelles. Les premières données de cryo-tomographie démontrent qu'il y a un réarrangement de la gaine flagellaire chez le mutant *flaB1*⁻, qui engendre sans doute la diminution du diamètre du filament et, peut-être, la fragilité à cause de liaisons protéiques modifiées entre le cœur et la gaine du filament.

Nous avons pu obtenir au laboratoire un mutant de délétion par recombinaison homologue dans le gène *flaB1* de la souche saprophyte *L. biflexa* sérovar Patoc (**Figure 43-B**). De manière surprenante et contrairement au mutant équivalent chez *L. interrogans*, celui de *L. biflexa* maintient ses capacités à progresser dans un milieu semi-solide (**Figure S 2-A,B**). Les données de protéomiques indiquent également des différences majeures entre le pathogène et le saprophyte : on observe aussi une absence totale de FlaB1 et une surexpression de FlaB4, mais sinon les flagellines FlaB2 et FlaB3 sont toujours exprimées et les protéines de gaine flagellaire montre une variation de niveaux d'expression significatifs, contrairement à ce qui est observé chez *L. interrogans* (**Figure S 2-C**). Il semblerait qu'il existe également des différences au niveau de la régulation de l'expression des flagellines entre les saprophytes et pathogènes. Peu de choses peuvent être déduites à ce stade des données disponibles pour expliquer le rôle de FlaB1 chez la souche saprophyte *L. biflexa*, étant donné ses caractéristiques diamétralement opposées à celles du mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans*. La résolution de la structure du filament serait sans doute le meilleur moyen d'évaluer l'implication de FlaB1 dans l'organisation de la structure de l'endoflagelle.

Nous disposons au laboratoire de deux mutants supplémentaires dans les flagellines FlaB : le mutant *flaB4*⁻ chez *L. biflexa* sérovar Patoc, qui était le tout premier mutant obtenu par échange allélique chez les leptospires (194) ; et le mutant de transposition *flaB3*⁻ chez le pathogène *L. interrogans* sérovar Manilae. Le mutant *flaB4*⁻ de *L. biflexa* est totalement non-motile, ne forme plus les extrémités en « crochet » ou « spirale » et les flagelles sont absents d'après les données de microscopie électronique sur cellule entière (194). Le mutant *flaB3*⁻ de *L. interrogans* ne présente pas de phénotype flagrant : sa motilité, morphologie et virulence sont les mêmes que la souche sauvage. Ceci est moins surprenant car FlaB3 est la flagelline la moins exprimée chez les pathogènes. Il ne faut toutefois pas s'arrêter sur une absence de

phénotype – ces mutants ont le potentiel de nous fournir de précieuses informations sur l’assemblage de l’endoflagelle.

Contrairement aux présomptions initiales et à leurs similarités au niveau de leur composition en acides aminés, les flagellines des leptospires pathogènes et saprophytes ne sont pas aussi comparables qu’il ne le paraît. Samuel García Huete, étudiant en thèse au sein du laboratoire à l’époque de la rédaction de ce manuscrit, a réalisé un arbre phylogénétique des différents gènes *flaB* au sein des 68 espèces du genre *Leptospira* identifiées à ce jour (**Figure 51**).

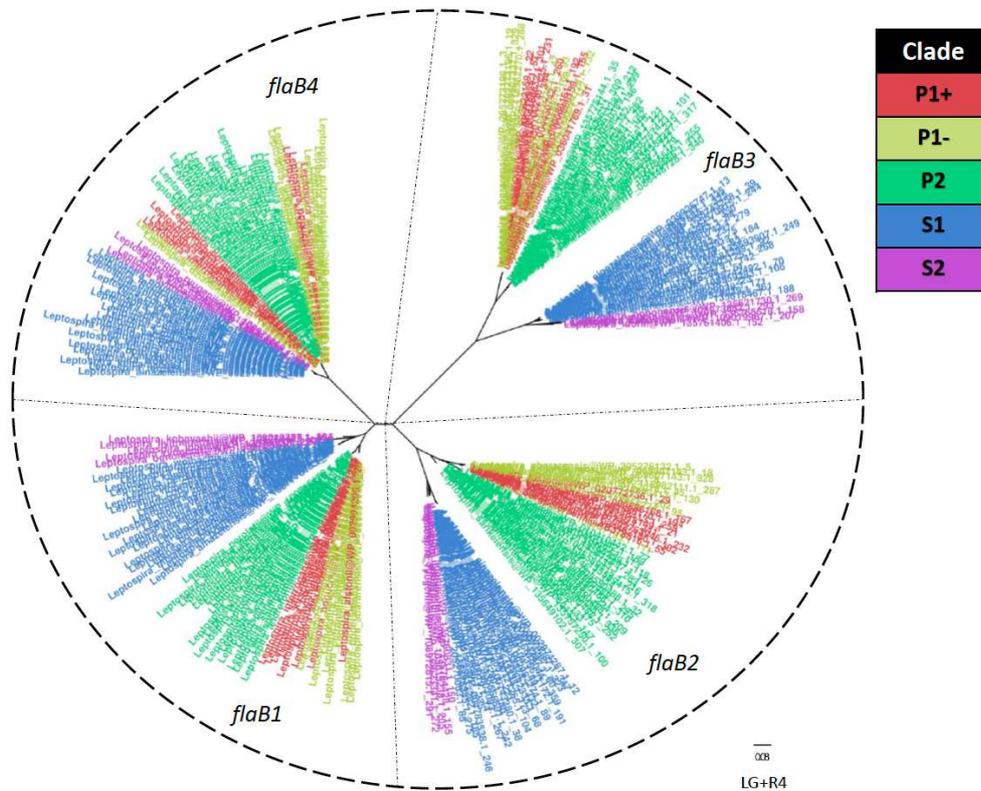


Figure 51 Classification phylogénétique des quatre isoformes de la flagelline FlaB au sein des espèces de *Leptospira*. Les espèces sont coloriées selon leur clade comme indiqué dans la légende à droite de la figure. Les orthologues de tous les FlaB ont été recherchés dans la base de données des 68 espèces du genre *Leptospira* et les séquences ont été alignées avec MAFFT pour une inférence arborescente plus poussée avec IQ-TREE.

Cet arbre phylogénétique démontre une claire séparation entre les FlaBs des espèces pathogènes (clades P1⁺, P1⁻ et P2) et ceux des espèces saprophytes (clades S1 et S2). Cela signifie qu’il y a eu une divergence entre les saprophytes et les pathogènes à un moment de l’évolution et que leurs flagellines ont ensuite évolué séparément.

L'autre information que nous pouvons tirer de cette classification phylogénétique est que les isoformes *flaB1* et *flaB4* semblent partager un ancêtre commun. La flagelline la plus proche de ces deux dernières est *flaB2*, et *flaB3* semble être la plus éloignée phylogénétiquement, ce qui est cohérent avec son homologie de l'ordre des 50% avec les autres isoformes. La similitude entre FlaB1 et FlaB4 est intéressante car les mutants *flaB1*⁻ de *L. interrogans* et *flaB4* de *L. biflexa* ont un phénotype similaire. Il n'est donc pas exclu que la protéine majoritaire de *L. biflexa* soit FlaB4 au lieu de FlaB1, et que ce « choix » s'est réalisé à un moment donné de l'évolution et est probablement accompagné de mécanismes de régulation adaptés.

Enfin, il faudrait étendre ces études phylogénétiques sur l'ensemble des protéines du filament des leptospires – si l'on compare les modèles du filament de *L. biflexa* (**Figure 39-B** de l'introduction), espèce sur laquelle se sont basées toutes les études structurales pour sa relative facilité de manipulation, et la structure du filament sauvage de *L. interrogans* (**Figure 49**), on remarque que *L. interrogans* ne possède pas de cavité sur la partie concave du filament – il est à la place comblé par des protéines qui restent à être identifiées.

Ceci remet aussi en cause l'hypothèse que chaque isoforme des flagellines FlaB est responsable du recrutement d'un composant spécifique de la gaine du filament – il semblerait que le secret derrière l'asymétrie du filament des leptospires repose sur un autre phénomène encore inconnu.

Concernant la régulation de l'expression des flagellines, l'unique étude sur le sujet chez *Leptospira* concerne l'implication de CsrA, le régulateur post-transcriptionnel de stockage du carbone qui a un spectre de substrats très large. Chez *Borrelia*, il est impliqué dans la régulation de l'expression de la flagelline FlaB (392) et récemment, mon collègue Theerapat Phoka, moi-même et d'autres collaborateurs avons identifié un rôle similaire chez *Leptospira* mais limité à seulement quelques isoformes, en particulier FlaB1, FlaB2 et FlaB4 chez le pathogène *L. interrogans* (391). Le texte intégral de la publication est disponible en **Annexe 2**.

L'expression de *csrA* était augmentée d'un facteur 3 chez le mutant *flaB1*⁻ de *L. interrogans* – CsrA étant un activateur de la transcription des flagellines citées ci-dessus, la dérégulation générale de l'expression des quatre isoformes de FlaB chez le mutant *flaB1*⁻ peut être expliquée, en partie, par la surexpression de CsrA. En effet, on observe chez le mutant *flaB1*⁻ une augmentation de la production de FlaB4. En théorie nous devrions aussi observer une augmentation de la production de FlaB2, mais celle-ci peut être masquée par le possible effet polaire de l'insertion du transposon dans le gène *flaB1* adjacent. En revanche, CsrA n'a

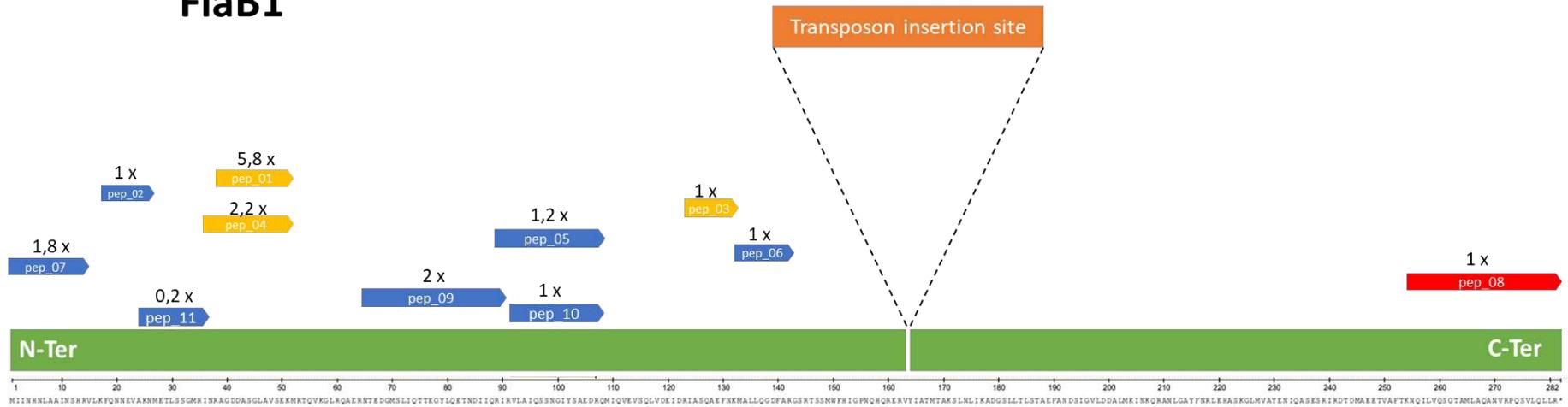
pas d'effet sur FlaB3, donc la diminution de son expression chez le mutant *flaB1*⁻ doit être causée par un autre mécanisme de régulation.

L'ambition initiale de l'étude des FlaBs dans leur implication dans la structure de l'endoflagelle était d'obtenir les souches mutantes de chaque isoforme chez le saprophyte et le pathogène, et aussi d'avoir des mutants sans aucun FlaB pour pouvoir les réintroduire individuellement en *trans* et étudier la structure du flagelle lorsqu'un seul des isoformes est présent. Néanmoins, la mutagenèse chez les leptospires est capricieuse et peu efficace, donc nous sommes encore loin d'avoir les souches mentionnées ci-dessus.

4. Données supplémentaires

L. interrogans serovar Manilae

FlaB1⁻



Peptide #	Protein ID	Peptide sequence	Total peptides in mutant	Total peptides in WT
Pep_01	fig 214675.5.peg.1776 LIMLP_07475;fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	AGDDASGLAVSEK	29	31
Pep_02	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	FQNNEVAK	5	15
Pep_03	fig 214675.5.peg.1776 LIMLP_07475;fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410;fig 214675.5.peg.2192 LIMLP_09405	IASQAENFK	5	5
Pep_04	fig 214675.5.peg.1776 LIMLP_07475;fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	INRAGDDASGLAVSEK	11	14
Pep_05	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	IRVLAIQSSNGIYSAEDR	6	14
Pep_06	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	MALLQGDFAK	5	20
Pep_07	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	MIINHNLAAINSHR	9	69
Pep_08	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	NQILVQSGTAMLAQANVRPQSVLQLLR	5	33
Pep_09	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	NTEDGMSLIQTTEGYLQETNDIIQR	10	36
Pep_10	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	VLAIQSSNGIYSAEDR	5	22
Pep_11	fig 214675.5.peg.2194 LIMLP_09410	NMETLSSGMK	1	15

Figure S 1 Carte des peptides de la protéine FlaB1 identifiés par spectrométrie de masse LC-MS/MS chez le mutant *flaB1⁻* de *L. interrogans*.

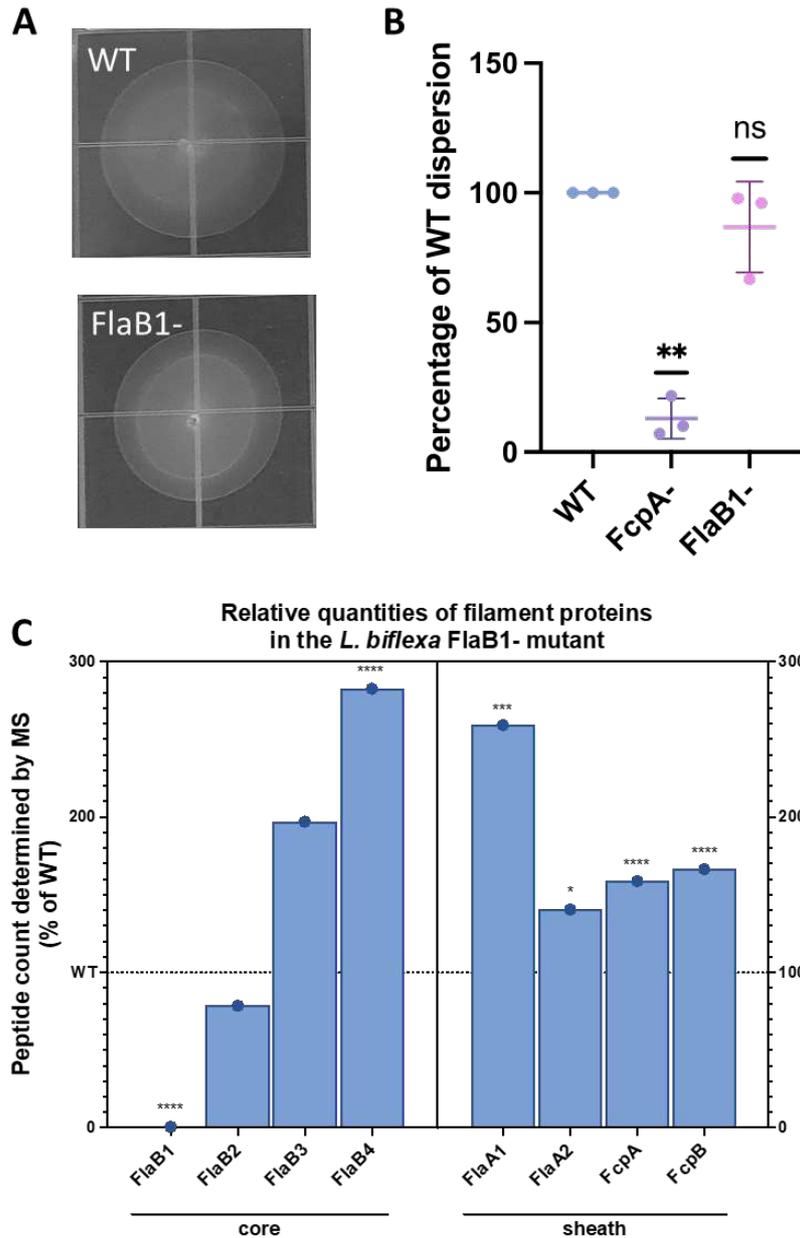


Figure S 2 Résumé du phénotype du mutant *flaB1*⁻ de *L. biflexa*. (A) Halos de dispersion en milieu semi-solide de la souche sauvage et du mutant *flaB1*⁻. (B) Quantification du diamètre des halos de dispersion du sauvage, mutant *flaB1*⁻ et mutant *fcpA*⁻ (utilisé comme contrôle non-motile). Les valeurs sont normalisées par rapport au sauvage. (C) Quantification relative par spectrométrie de masse LC-MS/MS des composants de filament de l'endoflagelle chez le mutant *flaB1*⁻ normalisés par rapport aux valeurs sauvages. **** = p-value < 0.0001 ; *** = p-value < 0.001 ; * = p-value < 0.05

Discussion et perspectives

Les spirochètes sont des bactéries particulièrement intrigantes, de part de leur morphologie en vague ou spirale, mais surtout de leur motilité régie par le mouvement finement régulé des endofagelles, insérés à chaque extrémité et se prolongeant dans le périplasme.

Les représentants du phylum des Spirochaetes comprennent des pathogènes majeurs de l'humain et de l'animal – notamment *Treponema pallidum*, agent de la syphilis, *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme et *Leptospira interrogans*, agent de la leptospirose. Ces trois maladies infectieuses sont actuellement en émergence ou réémergence : la maladie de Lyme est de plus en plus prévalente dans tout l'hémisphère Nord, la syphilis réapparaît dans les pays développés et la leptospirose gagne du terrain dans les zones tempérées, en partie à cause du réchauffement climatique (33,36,58,412).

Bien que les spirochètes ne soient pas encore inclus dans la liste des bactéries multirésistantes aux antibiotiques – liste en expansion continue depuis le début du siècle – et que la plupart des spirochètes sont facilement traitables par administration de pénicilline, quelques souches résistantes aux macrolides de *T. pallidum* causant la syphilis ou le pian (affection cutanée créant des ulcères) ont été identifiées – ceci devient problématique pour les patients présentant une allergie à la pénicilline (413,414). Cependant, avant de pouvoir administrer un traitement, il faut que ces spirochètes soient rapidement et correctement diagnostiqués, ce qui est problématique car la leptospirose en particulier se manifeste par des symptômes peu spécifiques de type syndrome grippal et est fréquemment diagnostiquée à tort comme le paludisme ou d'autres maladies tropicales plus prévalentes (60).

Il ne serait pas judicieux d'ignorer ces premiers signaux d'alarme. C'est l'une des raisons pour laquelle il est crucial de comprendre la physiologie des spirochètes afin de développer de nouvelles alternatives au traitement antibiotique et, idéalement, des outils de prophylaxie efficaces comme les vaccins : à ce jour, il existe quelques vaccins pour la leptospirose animale ou humaine, mais qui ne protègent que contre les sérogroupes les plus virulents, et l'immunisation doit être fréquemment renouvelée pour garder son efficacité (415).

Nous souhaitons apporter de nouvelles connaissances dans le domaine à l'aide des travaux réalisés dans le cadre de ma thèse, dont le thème est axé sur la motilité des spirochètes. Une meilleure compréhension du système endoflagellaire est d'importance cruciale pour améliorer les connaissances actuelles sur un système de motilité atypique qui va à l'encontre des paradigmes sur la motilité bactérienne et leurs organes locomoteurs, qui ont jusqu'à récemment été quasi exclusivement étudiés dans les modèles comme *E. coli* ou *Salmonella*. Ces connaissances peuvent également, par extension, être utilisées dans le développement d'outils

thérapeutiques – l'utilisation de mutants non-motiles dans la formulation de vaccins est déjà en cours d'évaluation (416).

En effet, la motilité des spirochètes est un élément essentiel à leur virulence et pouvoir pathogène, comme de nombreuses études ont déjà pu le démontrer (135–139,141,387). Cependant, les connaissances sur les mécanismes de motilité restent encore superficielles, nécessitant des efforts de recherche supplémentaires pour obtenir une image globale, tout en surmontant les défis de la difficulté de manipulation génétique des spirochètes.

Mon projet de thèse s'est focalisé sur trois aspects de la motilité des spirochètes : (i) le bilan des connaissances sur les éléments composant les endoflagelles et les différences présentes au sein du phylum des Spirochaetes (revue « Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum », San Martin, Fule et al. 2022, Trends in Microbiology en **Annexe 1**) ; (ii) l'étude du déterminant de flagellation polaire FlhG chez *Leptospira* (publication « Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira* », Fule et al. 2021, Molecular Microbiology discuté dans le premier chapitre du manuscrit) et (iii) l'implication des différents isoformes des flagellines FlaB dans le phénotype de motilité et la structure de l'endoflagelle de *Leptospira* (manuscrit en cours de préparation, Fule et al.)

Dans cette dernière partie du manuscrit, nous allons résumer et discuter les avancées atteintes lors de la réalisation de ma thèse, et mentionner les lacunes qui demeurent à combler dans le domaine à l'avenir.

1. Diversité de la composition des endoflagelles chez les spirochètes

En 2022, la base de données NCBI référence plus de 3 500 génomes complets de spirochètes à travers toutes les espèces (27,417). Une précédente revue sur les gènes flagellaires basée sur l'analyse des génomes bactériens disponibles en 2005 ne comportait que 4 séquences de génomes complets de spirochètes : *B. burgdorferi* souche B31, *T. pallidum* subsp. pallidum souche Nichols, *L. interrogans* sérovar Lai souche 56601 et *T. denticola* souche ATCC 35405 (384). En moins de 20 ans, les progrès technologiques au niveau des analyses des génomes ont explosé, ainsi que les techniques de manipulation génétique, d'imagerie structurale, et de modélisation – la combinaison de ces développements ont permis d'identifier de nouveaux composants de l'endoflagelle des spirochètes, de résoudre leur structure et mieux comprendre leur fonction.

D'un point de vue global, les endoflagelles des spirochètes partagent de nombreuses similitudes, sûrement en lien avec leurs morphologies similaires. Cependant, en y regardant de plus près, des différences majeures les séparent – *Treponema*, *Borrelia* et *Brachyspira* possèdent des endoflagelles multiples alors que *Leptospira* n'est pourvu que d'un endoflagelle par pôle. Il en est de même de la taille de leur génome – le génome de *Leptospira* est quatre fois plus grand que ceux de *Treponema* et *Borrelia*. Ces disparités se reflètent sur la composition de leurs endoflagelles – celui de *Leptospira* jouit de la structure la plus complexe parmi les spirochètes. Certaines protéines de l'endoflagelle semblent être spécifiques à chaque genre et sont vraisemblablement associées aux caractéristiques particulières de leur morphologie et type de motilité. Il faut aussi noter que les spirochètes sont capables de coloniser et prospérer dans des environnements très variés : les différences observées peuvent être apparues en conséquence de leur établissement dans une nouvelle niche environnementale.

L'analyse génomique approfondie des composants de l'endoflagelles des spirochètes réalisées dans cette revue dont je suis co-première auteure ont toutefois fait émerger des questions supplémentaires en plus des réponses apportées aux interrogations précédentes (272). Plusieurs protéines, dont les flagellines FlaB et FlaA, ainsi que les protéines de stator MotA et MotB, entre autres, sont présents en plusieurs copies dans le génome de certains spirochètes – il reste à déterminer la pertinence biologique de la présence de tous ces paralogues. Sont-ils réellement impliqués dans le fonctionnement de l'endoflagelle ? Si oui, exercent-ils tous la même fonction ? Ou s'agit-il de vestiges de l'évolution dont la fonction est devenue obsolète ?

Enfin, nous ne connaissons pas les mécanismes d'interaction de l'endoflagelle avec les autres éléments du périplasme, comme le peptidoglycane et la membrane externe, et comment celles-ci permettent de déformer la cellule entière et générer le mouvement d'ondulation ou de tire-bouchon permettant aux spirochètes d'avancer. Dans le même esprit, quelles sont les caractéristiques permettant aux spirochètes de traverser si efficacement les barrières tissulaires de l'hôte ?

En conclusion, encore de nombreux points restent à élucider pour comprendre les mécanismes inhérents à la motilité unique des spirochètes, ainsi que l'identification formelle des composants impliqués dans la structure et la régulation de la synthèse des endoflagelles.

2. Rôle du déterminant de la flagellation polaire FlhG chez *Leptospira* spp.

Les protéines FlhF et FlhG ont démontré un rôle dans la régulation spatio-numérique de la flagellation de plusieurs bactéries à flagelles externes, et plus récemment chez le spirochète *B. burgdorferi* (249,253,255,361,363,418–420). Bien que l'organisation génétique du locus *flhF-flhG* soit conservée à travers les espèces, les rôles de FlhF et FlhG n'engendrent pas toujours les mêmes phénotypes lorsque leur fonction est abolie – défaut de motilité, nombre de flagelles augmenté ou diminué, localisation des moteurs flagellaires anormale, dérégulation de gènes flagellaires. Ces observations indiquent que leur mécanisme d'action est spécifique à chaque organisme, ne nous permettant pas d'établir un consensus global sur leurs fonctions, applicables à toutes les bactéries exprimant ces gènes.

Afin d'évaluer la fonction de FlhG chez *Leptospira* spp. dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes basés principalement sur la comparaison des phénotypes des mutants FlhF de *B. burgdorferi* avec les mutants *flhG* disponibles dans notre banque de mutants par transposition chez *L. interrogans* et *L. biflexa*. *Leptospira* et *Borrelia* étant tous les deux des spirochètes, nous nous attendions à observer des phénotypes comparables ou complémentaires, comme les mutations ne sont pas situées au niveau du même gène.

Le mutant *flhF*⁻ de *B. burgdorferi* était non-motile et avait des flagelles moins nombreux et désorganisés – les mutants *flhG*⁻ de *L. interrogans* et *L. biflexa* avaient quant à eux une motilité réduite en milieu semi-solide mais de type sauvage en milieu liquide, et ne montraient pas de défaut au niveau du nombre de flagelles. L'hypothèse suggérant l'impossibilité d'interchanger les gènes *flhF-flhG* entre les espèces a été confirmée par des essais de complémentation du mutant *flhG*⁻ de *Leptospira* par le locus *flhF-flhG* de *B. burgdorferi*, ainsi que la complémentation du mutant *flhG*⁻ de *Campylobacter jejuni* par l'homologue de *Leptospira*.

Ayant ces connaissances à l'esprit, nous avons investigué plus en profondeur le phénotype des mutants *flhG*⁻ de *L. interrogans* et *L. biflexa* : il faut noter que la tâche ne se révélait pas évidente car hormis le phénotype de motilité en milieu semi-solide et l'abolition de la virulence chez la souche pathogène, les éléments pouvant expliquer ces observations étaient difficiles à identifier.

Grâce à l'observation de la morphologie de cellules entières par cryo-tomographie, nous avons pu constater que les corps basaux endoflagellaires étaient décalés vers l'extrémité des pôles cellulaires. Ceci nous indique que FlhG serait effectivement impliquée dans la localisation

correcte des endoflagelles, mais de manière moins impressionnante que chez d'autres bactéries, où la localisation est souvent très différente du profil de flagellation sauvage. Le décalage du moteur flagellaire vers les extrémités des pôles engendre possiblement une déformation anormale du cylindre cellulaire, entraînant un défaut de motilité dans les environnements à viscosité élevée, se traduisant par une incapacité à établir une infection chez l'hôte par perturbation de leur habilité à traverser les barrières tissulaires. Cependant, la nature subtile de la délocalisation des corps basaux chez les mutants *flhG*⁻ de *Leptospira* nous mène à des interrogations sur le mécanisme de FlhG dans le positionnement du moteur – quels éléments cellulaires sont-ils responsables de l'adressage si précis au niveau du pôle ? L'interaction de l'endoflagelle avec les structures du périplasme entre-t-elle en jeu ? Comme l'a été décrit chez *Borrelia*, FlhF, qui est naturellement localisé aux pôles, participe au recrutement du composant du MS-ring FliF – cet aspect reste à être étudié chez *Leptospira* par des expériences de colocalisation de protéines *in vivo*, par exemple.

Enfin, la comparaison des transcriptomes de la souche sauvage et du mutant *flhG*⁻ de *L. biflexa* a révélé une légère surexpression des gènes impliqués dans la synthèse et la structure de la tige et du crochet de l'endoflagelle. Le contrôle précis de la synthèse du crochet endoflagellaire est crucial pour maintenir une motilité optimale. Sa longueur est finement surveillée par la règle moléculaire FliK – si le crochet est plus court, sa rigidité devient trop élevée et s'il est trop long, le transfert de la force motrice du moteur au filament du flagelle entraîne une rotation anormale du filament, impactant la capacité de se mouvoir correctement. Dans le cas du mutant *flhG*⁻ de *Leptospira*, la surexpression des gènes du crochet, dont l'élément structural FlgE, résulte possiblement en la synthèse d'un crochet de taille anormale. Le filament étant compris au sein du périplasme, une différence au niveau de la courbure et/ou longueur du crochet peut potentiellement impacter les interactions du filament avec le peptidoglycane et les membranes, ce qui entraînerait une déformation non-optimale du corps cellulaire lors de la rotation du flagelle. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi le phénotype de motilité ne se manifeste pas en milieu liquide, car les leptospires font face à une moindre résistance dans ce milieu comparé aux milieux à viscosité élevée. Afin d'illustrer ces propos, nous pourrions imaginer que le mutant *flhG*⁻ ressemblerait à une visseuse électrique mal placée sur l'axe de la vis – la vis sous la pression de la visseuse tourne dans un angle de rotation trop large pour pouvoir percer le support. Il est également possible que la structure altérée soit à l'origine du décalage du moteur vers l'extrémité du pôle par pression mécanique du filament dans l'espace

périplasmique. Ces suppositions demeurent à être vérifiées par l'analyse précise de la structure des crochets endoflagellaires.

3. Les flagellines FlaB du cœur du filament et leur fonction dans la structure de l'endoflagelle et la motilité de *Leptospira* spp.

Les endoflagelles des spirochètes se distinguent aussi par leur structure complexe, souvent mettant en jeu plusieurs isoformes d'une même protéine. Les filaments des spirochètes sont des structures tubulaires composées d'un cœur entouré d'une gaine protéique. Le degré de complexité varie parmi les représentants des spirochètes : *Borrelia* possède une protéine de cœur (FlaB) et une protéine de gaine (FlaA) identifiées à ce jour, *Treponema* a trois isoformes de la protéine de cœur et deux protéines de gaine, et *Leptospira* a le filament le plus complexe avec quatre protéines de cœur (FlaB1-4) et au minimum 5 protéines de gaine (FlaA1, FlaA2, FlaAP, FcpA et FcpB) (voir **Tableau 4** de l'introduction).

Des modélisations récentes de la structure du filament de *L. biflexa* ont mis en évidence une asymétrie prononcée de la gaine du flagelle : les protéines FlaA semblent être recrutées uniquement du côté concave du filament, alors que les Fcps se situent sur la face convexe (360,388) (voir **Figure 39-B** de l'introduction). Cette asymétrie a pour conséquence le surenroulement des filaments que l'on peut observer après la purification des endoflagelles, et FcpA est un élément indispensable à ce phénomène (135). Le surenroulement de l'endoflagelle de *Leptospira* permet la déformation des extrémités cellulaires en conformations « crochet » ou « spirale », essentielles à la génération d'un mouvement translationnel chez ce spirochète.

Il est clair que l'asymétrie du filament joue un rôle crucial dans la motilité des leptospires : quelle est l'origine de cette asymétrie ? Comment est-elle apparue au cours de l'évolution ? Quels sont les déterminants permettant le recrutement des protéines de gaine à leurs localisations spécifiques au niveau du filament ? Quelles sont les interactions du filament avec le peptidoglycane et la membrane externe ? Les filaments des autres spirochètes sont-ils eux aussi asymétriques ?

Il y a quelques années, notre équipe et nos collaborateurs de l'université de Yale et de l'Institut Pasteur de Montevideo avons avancé l'hypothèse que la composition du cœur du filament, et en particulier l'agencement des différents isoformes de FlaB en son sein serait un facteur important dans la mise en place de la gaine asymétrique. Autrement formulé, chaque isoforme de FlaB lierait préférentiellement un ou plusieurs composants de la gaine, impliquant que leur répartition au sein du filament n'est pas aléatoire, mais régulée spatialement.

Afin de creuser cette hypothèse, j'ai étudié des mutants de flagellines chez la souche saprophyte et la souche pathogène de *Leptospira* dans le cadre d'un de mes projets de thèse. Les quatre isoformes de la flagelline FlaB ne sont pas exprimés de manière homogène chez *L. interrogans* – FlaB1 représente la fraction majoritaire, puis sont exprimés à des concentrations moins importantes FlaB2, FlaB3 et FlaB4 (212,213). Nous avons à notre disposition dans une banque de mutants le mutant *flaB1*⁻ de *L.interrogans* sérovar Manilae et j'ai réussi à obtenir le mutant équivalent chez *L. biflexa* sérovar Patoc par échange allélique. La majeure partie de mes travaux reposent sur l'étude de ces deux mutants et la comparaison de leurs phénotypes.

Dans un premier temps, je me suis focalisée sur le mutant de la souche pathogène : l'analyse de son phénotype a révélé que le mutant n'était plus capable de se déplacer efficacement en milieu visqueux et n'était plus virulent chez l'animal. Cependant, similairement au mutant *flhG*⁻ de *Leptospira*, sa vitesse de progression en milieu liquide n'était pas impactée. Ceci suggère que les endoflagelles sont toujours synthétisés, malgré l'absence de la flagelline majoritaire. Et effectivement, le marquage des endoflagelles avec des anticorps monoclonaux spécifiques aux isoformes individuels des FlaBs ont démontré que le mutant *flaB1*⁻ possédait un flagelle à chaque pôle de taille comparable au sauvage. Néanmoins, la motilité était altérée : qu'est-ce qui rendait les endoflagelles du mutant *flaB1*⁻ moins performants ?

Pour répondre à cette question, nous avons regardé l'aspect des endoflagelles après purification – nous avons constaté qu'ils semblaient plus fragiles et cassants comparés à ceux du sauvage, avec une légère diminution de la taille de leur diamètre. Ensuite, nous nous sommes basés sur des analyses protéomiques semi-quantitatives de ces mêmes extraits d'endoflagelles afin de comparer leur composition protéique par rapport à la souche sauvage. Les résultats ont mis en évidence une dérégulation généralisée des quatre isoformes – FlaB1, FlaB2 et FlaB3 avaient une expression fortement diminuée ou abolie, et FlaB4 était surexprimé. Les taux d'expression des composants de la gaine étaient inchangés. Ces résultats mettent en évidence un mécanisme de régulation de l'expression des flagellines dépendant de leurs quantités cellulaires qui n'est pas encore clair à ce jour, même si on suspecte une participation de CsrA dans le phénomène, comme cela a été décrit chez *Borrelia* et *Leptospira* (391,392).

Enfin, des données préliminaires de modélisation de la structure du filament montrent des différences au niveau de certaines zones de densités entre le mutant *flaB1*⁻ et le sauvage. Le raffinement de cette carte et l'identification des protéines de la structure sont actuellement encore en cours, mais nous pouvons déjà en déduire que le filament du mutant *flaB1*⁻ est toujours

asymétrique – cette observation remet en cause l’hypothèse avancée précédemment que les isoformes de la flagelline FlaB sont responsables du recrutement asymétrique des protéines de la gaine, car le filament *flaB1*⁻ est composé uniquement de FlaB4 d’après les données de protéomique.

Quant à la fragilité des filaments *flaB1*⁻, on peut supposer que la modification de la composition du filament altère les interactions entre les protéines de la gaine et du cœur, les rendant peut-être plus fortes, donc créant un filament plus rigide qui se brise plus facilement. La rigidité du filament doit également avoir un impact sur son interaction avec les éléments du périplasme, encore une fois similairement à ce qui est suggéré chez les mutants *flhG*⁻ discuté dans la partie précédente. Seules des études de biochimie structurale pourraient répondre à cette hypothèse.

Ensuite, j’ai évalué le phénotype du mutant *flaB1*⁻ chez la souche saprophyte *L. biflexa* et, de manière étonnante, le mutant avait un phénotype indissociable du sauvage – aucun défaut de motilité ni de morphologie. Bien que l’orthologue FlaB1 de *L. biflexa* est identique à 87% à celui de *L. interrogans*, il ne semble pas remplir la même fonction. L’analyse phylogénétique des quatre isoformes de FlaB au sein du genre *Leptospira* a révélé une claire séparation entre les flagellines des souches pathogènes et de celles des souches saprophytes – ceci nous démontre que les notions de flagelline majoritaire diffèrent entre les pathogènes et saprophytes, et il semble donc que FlaB1 n’est pas la flagelline principale du filament. L’étude du mutant *flaB4*⁻ de *L. biflexa* datant de 2001 révélait une abolition de la motilité, suggérant donc que ce serait plutôt cet isoforme qui constituerait la majorité du filament chez *L. biflexa* (194). L’obtention d’un mutant *flaB4*⁻ chez *L. interrogans* nous permettrait de vérifier cette hypothèse. Enfin, le mutant *flaB3*⁻ de *L. interrogans* qui a été étudié brièvement au cours de ma thèse ne présentait pas de phénotype particulier, ce qui est en concordance avec les données de protéomique obtenues par Malmström et collaborateurs en 2009, la qualifiant de flagelline minoritaire (212).

4. Perspectives

Au cours de ma thèse, j’ai ainsi pu étudier divers aspects relatifs à la motilité des spirochètes, principalement en se basant sur le modèle des espèces du genre *Leptospira* – ce modèle est utilisé dans notre laboratoire car elles sont relativement peu exigeantes quant aux

conditions de culture en laboratoire (à l'inverse des autres modèles de spirochètes), et qu'elles ne possèdent qu'un seul flagelle par pôle contrairement aux 3 à 10 chez *Treponema* ou *Borrelia*.

La comparaison des génomes de nombreux représentants des spirochètes à la recherche des composants des endoflagelles a permis de mettre en avant une diversité dont l'étendue nous était inconnue jusqu'à présent. Ces résultats sont un point d'appui non négligeable pour comparer les rôles des composants endoflagellaires entre les différents représentants des spirochètes, et également pour mieux comprendre leur évolution au sein du phylum. Néanmoins, une portion importante des gènes spirochètaux n'ont pas de fonction définie, et nous passons certainement à côté d'autres éléments de l'endoflagelle encore inconnus. Il est donc vital à ce stade de se focaliser sur une annotation rigoureuse des génomes – ceci serait aussi bénéfique dans d'autres domaines que la motilité. Au vu des avancées dans le domaine de la recherche, il est fort probable que de nombreuses autres protéines du filament flagellaire seront identifiés chez les spirochètes dans un proche avenir.

Une lacune majeure dans les connaissances sur les spirochètes concerne les systèmes de régulation : peu d'éléments régulateurs et leurs séquences consensus de liaison ont été décrits, et nous faisons souvent face à la nature atypique de cette famille de bactéries, ce qui ralentit les efforts pour découvrir de nouveaux facteurs, car ils sont généralement très différents de ceux des modèles classiques comme *E. coli*. Un moyen d'accélérer les progrès dans le domaine serait la mise à disposition de bases données transcriptomiques et protéomiques consultables par tous – des points de vue et d'approche différents réalisés par plusieurs chercheurs sur un même jeu de données peut révéler des informations qui n'étaient pas apparents aux yeux de l'auteur originel.

Dans le même thème, le domaine des ARN régulateurs est peu exploré chez les spirochètes, alors qu'ils prouvent être d'une importance non négligeable chez les autres espèces bactériennes étudiées. Par exemple, *Yersinia pestis* possède dans son génome le gène de la flagelline *FliC* qui est transcrit, mais la bactérie ne produit pas de flagelles – de récentes études dans le cadre de la thèse d'une consœur à l'Institut Pasteur suggèrent que l'ARN messager de *fliC* aurait un rôle régulateur indépendant de la motilité chez *Y. pestis* (421).

Enfin, dans le but d'élucider la manière dont les endoflagelles sont assemblés, en particulier le filament asymétrique complexe de *Leptospira*, nous pourrions nous aider des progrès en imagerie à haute résolution et observer l'assemblage des flagelles *in vivo* par des marquages des différents éléments (422). Ces expériences seraient d'autant plus fructueuses si l'on parvient à obtenir des mutants dans les quatre gènes *flaB*. Nous possédons désormais des

anticorps monoclonaux spécifiques à chacun des isoformes de FlaB – rien que le marquage des endoflagelles par immunofluorescence serait susceptible de nous apporter quelques indices quant à la distribution des FlaB au sein du cœur du filament.

Notamment, étudier les mécanismes de dissémination des leptospires au cours de l'infection en utilisant des souches bioluminescentes par exemple, et mieux comprendre quelles sont les protéines du flagelles impliquées dans des étapes clés de l'infection nous apporterait des connaissances importantes concernant la pathogénèse des leptospires et comment elles établissent l'infection chez l'hôte. Pour ce faire, nous pouvons tirer profit des essais de translocation des leptospires à travers des modèles de barrières de l'hôte comme les épithéliums (reins, peau), les vaisseaux sanguins ou les barrières placentaires ou hématoencéphaliques. Grâce au développement des modèles alternatifs aux animaux comme l'organe sur puce nous pourrions jouir d'un système proche de la physiologie de l'hôte tout en ayant la possibilité de contrôler les conditions de l'expérience de manière plus fine que chez l'animal, sans compter les avantages que cela représente d'un point de vue bioéthique et bien-être animal.

Pour clore ce manuscrit, j'aimerais insister sur le fait que nous sommes encore loin d'avoir exploré la totalité des particularités de la motilité des spirochètes et ils nous réservent encore plein de découvertes intéressantes à l'avenir. Le progrès dans l'étude des spirochètes dans leur ensemble a toujours été lent par rapport aux modèles bactériens classiques, mais les techniques d'analyse se développent de plus en plus rapidement, ce qui est encourageant et prometteur pour l'avenir. Nous sommes aux portes d'une évolution des paradigmes de la motilité bactérienne grâce à ces modèles atypiques.

Références bibliographiques

1. Ritalahti KM, Justicia-Leon SD, Cusick KD, Ramos-Hernandez N, Rubin M, Dornbush J, et al. *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *Int J Syst Evol Microbiol.* janv 2012;62(Pt 1):210-6.
2. Caro-Quintero A, Ritalahti KM, Cusick KD, Löffler FE, Konstantinidis KT. The chimeric genome of *Sphaerochaeta*: nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology. *mBio.* 2012;3(3):e00025-12.
3. Holt SC. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev.* mars 1978;42(1):114-60.
4. Nakamura S. Spirochete Flagella and Motility. *Biomolecules* [Internet]. 4 avr 2020 [cité 3 mai 2021];10(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7225975/>
5. Tall BD, Nauman RK. Scanning Electron Microscopy of *Cristispira* Species in Chesapeake Bay Oysters. *Appl Environ Microbiol.* août 1981;42(2):336-43.
6. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Syphilis. *Nat Rev Dis Primer.* 12 oct 2017;3(1):1-21.
7. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JWR, et al. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primer.* 15 déc 2016;2(1):1-19.
8. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol.* mai 2017;15(5):297-307.
9. Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, et al. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 sept 2000;97(20):10899-904.
10. Ruby JD, Li H, Kuramitsu H, Norris SJ, Goldstein SF, Buttle KF, et al. Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology. *J Bacteriol.* mars 1997;179(5):1628-35.
11. Eipert SR, Black SH. Characterization of the cytoplasmic fibrils of *Treponema refringens* (Nichols). *Arch Microbiol.* 1 mars 1979;120(3):205-13.
12. Kudryashev M, Cyrklaff M, Baumeister W, Simon MM, Wallich R, Frischknecht F. Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol.* 2009;71(6):1415-34.
13. Izard J, Samsonoff WA, Limberger RJ. Cytoplasmic Filament-Deficient Mutant of *Treponema denticola* Has Pleiotropic Defects. *J Bacteriol.* févr 2001;183(3):1078-84.
14. Mazouni K, Pehau-Arnaudet G, England P, Bourhy P, Saint Girons I, Picardeau M. The scc spirochetal coiled-coil protein forms helix-like filaments and binds to nucleic acids generating nucleoprotein structures. *J Bacteriol.* janv 2006;188(2):469-76.
15. Jackson KM, Schwartz C, Wachter J, Rosa PA, Stewart PE. A widely conserved bacterial cytoskeletal component influences unique helical shape and motility of the spirochete *Leptospira biflexa*. *Mol Microbiol.* 2018;108(1):77-89.

16. Hay NA, Tipper DJ, Gygi D, Hughes C. A novel membrane protein influencing cell shape and multicellular swarming of *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol.* avr 1999;181(7):2008-16.
17. Koch MK, McHugh CA, Hoiczky E. BacM, an N-terminally processed bactofilin of *Myxococcus xanthus*, is crucial for proper cell shape. *Mol Microbiol.* mai 2011;80(4):1031-51.
18. Sycuro LK, Wyckoff TJ, Biboy J, Born P, Pincus Z, Vollmer W, et al. Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility, and colonization potential. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002603.
19. Slamti L, de Pedro MA, Guichet E, Picardeau M. Deciphering Morphological Determinants of the Helix-Shaped *Leptospira*. *J Bacteriol.* 15 nov 2011;193(22):6266-75.
20. Kelesidis T. The Cross-Talk between Spirochetal Lipoproteins and Immunity. *Front Immunol.* 30 juin 2014;5:310.
21. Schröder NWJ, Eckert J, Stübs G, Schumann RR. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. *Immunobiology.* 14 mai 2008;213(3):329-40.
22. Raddi G, Morado DR, Yan J, Haake DA, Yang XF, Liu J. Three-Dimensional Structures of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species Revealed by Cryo-Electron Tomography. *J Bacteriol.* mars 2012;194(6):1299-306.
23. Liu J, Howell JK, Bradley SD, Zheng Y, Zhou ZH, Norris SJ. Cellular Architecture of *Treponema pallidum*: Novel Flagellum, Periplasmic Cone, and Cell Envelope as Revealed by Cryo-Electron Tomography. *J Mol Biol.* 5 nov 2010;403(4):546-61.
24. Briegel A, Ortega DR, Tocheva EI, Wuichet K, Li Z, Chen S, et al. Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proc Natl Acad Sci.* 6 oct 2009;106(40):17181-6.
25. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol.* oct 1991;173(19):6101-9.
26. Gupta R, Mahmood S, Adeolu M. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 [cité 4 août 2022];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00217>
27. Nieves C, Garcia Huete S, Veyrier FJ, Picardeau M. Taxonomy and phylogenomics of *Leptospira*. 2022;
28. Franzmann PD, Dobson SJ. Cell wall-less, free-living spirochetes in Antarctica. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;97(3):289-91.
29. Patel BKC, Morgan HW, Daniel RM. Thermophilic anaerobic spirochetes in New Zealand hot springs. *FEMS Microbiol Lett.* 1 janv 1985;26(1):101-6.
30. Souza EM de. Há 100 anos, a descoberta do *Treponema pallidum*. *An Bras Dermatol.* oct 2005;80(5):547-8.

31. Melo FL de, Mello JCM de, Fraga AM, Nunes K, Eggers S. Syphilis at the Crossroad of Phylogenetics and Paleopathology. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 janv 2010;4(1):e575.
32. Infections sexuellement transmissibles (IST) [Internet]. [cité 3 août 2022]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
33. Du M, Yan W, Jing W, Qin C, Liu Q, Liu M, et al. Increasing incidence rates of sexually transmitted infections from 2010 to 2019: an analysis of temporal trends by geographical regions and age groups from the 2019 Global Burden of Disease Study. *BMC Infect Dis*. 26 juin 2022;22(1):574.
34. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, et al. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*. 1977;20(1):7-17.
35. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*. 18 juin 1982;216(4552):1317-9.
36. Marques AR, Strle F, Wormser GP. Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg Infect Dis*. août 2021;27(8):2017-24.
37. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit / von A. Weil. [Internet]. Wellcome Collection. [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://wellcomecollection.org/works/j9y5q3sw/items>
38. Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother*. 1 janv 2001;7(1):10-5.
39. Noguchi H. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND NOMENCLATURE OF LEPTOSPIRA (SPIROCHAETA) ICTEROHAEMORRHAGIAE (INADA AND IDO). *J Exp Med*. 1 mai 1918;27(5):575-92.
40. Alvarez-Ordóñez A, Martínez-Lobo FJ, Arguello H, Carvajal A, Rubio P. Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease. *Int J Environ Res Public Health*. mai 2013;10(5):1927-47.
41. Lopez J, Hovius JW, Bergström S. Pathogenesis of Relapsing Fever. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;42:519-50.
42. Yousefi L, Leylabadlo HE, Poulak T, Eslami H, Taghizadeh S, Ganbarov K, et al. Oral spirochetes: Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Microb Pathog*. 1 juill 2020;144:104193.
43. Piekut T, Hurła M, Banaszek N, Szejn P, Dorszewska J, Kozubski W, et al. Infectious agents and Alzheimer's disease. *J Integr Neurosci*. 28 mars 2022;21(2):73.
44. Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Treponema, Iron and Neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res*. 2018;15(8):716-22.
45. Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haémorrhagique. In: *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 1918. p. 672-5.

46. Hartskeerl RA, Smythe LD. The Role of Leptospirosis Reference Laboratories. In: Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cité 20 sept 2022]. p. 273-88. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_11
47. Picardeau M. *Leptospira*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cité 14 sept 2022]. p. 1-18. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm01244.pub2>
48. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* avr 2001;14(2):296-326.
49. Ramli SR, Bunk B, Spröer C, Geffers R, Jarek M, Bhujju S, et al. Complete Genome Sequencing of *Leptospira interrogans* Isolates from Malaysia Reveals Massive Genome Rearrangement but High Conservation of Virulence-Associated Genes. *Pathogens.* sept 2021;10(9):1198.
50. Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B. Functional Analysis of Genes in the *rflB* Locus of *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo Subtype Hardjobovis. *Infect Immun.* juill 2000;68(7):3793-8.
51. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol.* mai 2004;186(9):2818-28.
52. Levett PN. Systematics of Leptospiraceae. In: Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cité 20 sept 2022]. p. 11-20. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
53. Putz EJ, Nally JE. Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem? *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cité 20 sept 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02005>
54. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJY 1987. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 37(4):407-15.
55. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* avr 1999;49 Pt 2:839-58.
56. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis.* mai 2019;13(5):e0007270.
57. Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med.* 28 sept 2016;7:49-62.

58. Sykes JE, Haake DA, Gamage CD, Mills WZ, Nally JE. A global one health perspective on leptospirosis in humans and animals. *J Am Vet Med Assoc.* 25 juill 2022;1(aop):1-8.
59. Daher EDF, da Silva Junior GB. Leptospirosis: different presentation and mortality in tropical and non-tropical areas. *Intensive Care Med.* 1 avr 2020;46(4):825-6.
60. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 17 sept 2015 [cité 26 févr 2019];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574773/>
61. Rapports d'activité du CNR de la Leptospirose [Internet]. Institut Pasteur. 2018 [cité 13 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/leptospirose/rapports-d-activite>
62. Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, et al. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Rev Panam Salud Pública.* 15 juill 2020;44:1.
63. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2 oct 2015;9(10):e0004122.
64. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, et al. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 23 avr 2008;2(4):e228.
65. Khalil H, Santana R, Oliveira D de, Palma F, Lustosa R, Eyre MT, et al. Poverty, sanitation, and *Leptospira* transmission pathways in residents from four Brazilian slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 31 mars 2021;15(3):e0009256.
66. Costa F, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santos N, Reis RB, Santos AC, et al. Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. *PLoS Negl Trop Dis.* 4 déc 2014;8(12):e3338.
67. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* oct 2010;104(10):631-8.
68. World Health Organization. Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group [Internet]. World Health Organization; 2011 [cité 23 août 2022]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44588>
69. Guillois Y, Bourhy P, Ayrat F, Pivette M, Decors A, Aranda Grau JH, et al. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. *Eurosurveillance* [Internet]. 29 nov 2018 [cité 10 mai 2019];23(48). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6280422/>
70. Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, et al. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 mai 2002;34(9):e40-3.

71. Consigny PH, Bourhy P, Picardeau M. Le diagnostic de la leptospirose. *Rev Biol Médicale* [Internet]. sept 2022 [cité 13 sept 2022];(368). Disponible sur: <https://www.revuebiologiemedicale.fr/au-sommaire.html>
72. Babudieri B. Proposed standardization of the agglutination—adsorption test for leptospira. *Bull World Health Organ.* 1971;44(6):795-810.
73. Osorio L, Garcia JA, Parra LG, Garcia V, Torres L, Degroote S, et al. A scoping review on the field validation and implementation of rapid diagnostic tests for vector-borne and other infectious diseases of poverty in urban areas. *Infect Dis Poverty.* 3 sept 2018;7:87.
74. Antibiotic resistance [Internet]. [cité 8 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
75. Correia L, Loureiro AP, Lilenbaum W. Reduced susceptibility in leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. *Epidemiol Infect.* 4 sept 2018;147:e5.
76. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med.* mai 1984;100(5):696-8.
77. Phimda K, Hoontrakul S, Suttinont C, Chareonwat S, Losuwanaluk K, Chueasuwanchai S, et al. Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2007;51(9):3259-63.
78. Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [cité 6 mai 2021]. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 387). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8>
79. Guerrier G, Lefèvre P, Chouvin C, D’Ortenzio E. Jarisch–Herxheimer Reaction Among Patients with Leptospirosis: Incidence and Risk Factors. *Am J Trop Med Hyg.* 5 avr 2017;96(4):791-4.
80. Cagliero J, Villanueva SYAM, Matsui M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:204.
81. Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cité 8 sept 2022]. p. 99-137. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6
82. Spiri AM, Rodriguez-Campos S, Matos JM, Glaus TM, Riond B, Reusch CE, et al. Clinical, serological and echocardiographic examination of healthy field dogs before and after vaccination with a commercial tetravalent leptospirosis vaccine. *BMC Vet Res.* 25 mai 2017;13(1):138.
83. Grassmann AA, Souza JD, McBride AJA. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cité 8 sept 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00256>

84. Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci*. 14 janv 2017;18(1):158.
85. Chaurasia R, Salovey A, Guo X, Desir G, Vinetz JM. Vaccination With *Leptospira interrogans* PF07598 Gene Family-Encoded Virulence Modifying Proteins Protects Mice From Severe Leptospirosis and Reduces Bacterial Load in the Liver and Kidney. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:926994.
86. Teixeira AF, Fernandes LGV, Cavenague MF, Takahashi MB, Santos JC, Passalia FJ, et al. Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. *Vaccine*. 9 juill 2019;37(30):3961-73.
87. Ledien J, Sorn S, Hem S, Huy R, Buchy P, Tarantola A, et al. Assessing the performance of remotely-sensed flooding indicators and their potential contribution to early warning for leptospirosis in Cambodia. *PLoS ONE*. 13 juill 2017;12(7):e0181044.
88. CHABAUD A, MEYER S, PLOY MC. VIRULENCE BACTÉRIENNE. In *Encyclopædia Universalis*; [cité 15 sept 2022]. Disponible sur: <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/virulence-bacterienne/>
89. Lai WY, Wong Z, Chang CH, Samian MR, Watanabe N, Teh AH, et al. Identifying *Leptospira interrogans* putative virulence factors with a yeast protein expression screen. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 oct 2022;106(19):6567-81.
90. Gomes-Solecki M, Santecchia I, Werts C. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cité 20 sept 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00058>
91. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. sept 2010;5(9):1413-25.
92. Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 août 2009;183(4):2669-77.
93. Davis JM, Haake DA, Ramakrishnan L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 23 juin 2009;3(6):e463.
94. Prakoso D, Zhu X, Rajeev S. *Galleria mellonella* infection model to evaluate pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* strains. *Vet Microbiol*. janv 2022;264:109295.
95. Haake DA, Zückert WR. The Leptospiral Outer Membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:187-221.
96. Eshghi A, Henderson J, Trent MS, Picardeau M. *Leptospira interrogans* lpxD Homologue Is Required for Thermal Acclimatization and Virulence. *Infect Immun*. nov 2015;83(11):4314-21.
97. Shaffer SA, Harvey MD, Goodlett DR, Ernst RK. Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of *Francisella tularensis* subspecies *novicida* lipid a

- characterized by tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1 juin 2007;18(6):1080-92.
98. Li Y, Powell DA, Shaffer SA, Rasko DA, Pelletier MR, Leszyk JD, et al. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 29 mai 2012;109(22):8716-21.
99. Murray GL, Srikrum A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol.* nov 2010;78(3):701-9.
100. Marcisin RA, Bartpho T, Bulach DM, Srikrum A, Sermswan RW, Adler B, et al. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J Med Microbiol.* 62(10):1601-8.
101. Phoka T, Techawiwattanaboon T, Sangjun N, Komane P, Murray GL, Wongratanacheewin Sermswan R, et al. Identification of in vivo expressed proteins in live attenuated lipopolysaccharide mutant that mediates heterologous protection against *Leptospira* spp. *Vet Microbiol.* 1 nov 2021;262:109220.
102. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* juill 2007;3(7):e97.
103. Zhang Y, Bao L, Zhu H, Huang B, Zhang H. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin.* janv 2010;42(1):70-9.
104. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett.* 26 sept 2003;226(2):215-9.
105. Oliveira R, de Moraes ZM, Gonçalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PloS One.* 2011;6(7):e21962.
106. Cosate MR, Siqueira GH, de Souza GO, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Mammalian cell entry (Mce) protein of *Leptospira interrogans* binds extracellular matrix components, plasminogen and $\beta 2$ integrin. *Microbiol Immunol.* sept 2016;60(9):586-98.
107. Zhang L, Zhang C, Ojcius DM, Sun D, Zhao J, Lin X, et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol Microbiol.* mars 2012;83(5):1006-23.
108. Kassegne K, Hu W, Ojcius DM, Sun D, Ge Y, Zhao J, et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* species. *J Infect Dis.* 1 avr 2014;209(7):1105-15.
109. Haake DA, Matsunaga J. Leptospiral Immunoglobulin-Like Domain Proteins: Roles in Virulence and Immunity. *Front Immunol.* 8 janv 2021;11:579907.
110. Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Santos CS, Reis MG, Ko AI, et al. Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species: Disruption of the LigB Gene Does Not

- Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infect Immun.* déc 2008;76(12):5826-33.
111. Kumar P, Chang YF, Akif M. Characterization of novel nuclease and protease activities among Leptospiral immunoglobulin-like proteins. *Arch Biochem Biophys.* 30 sept 2022;727:109349.
 112. Kumar A, Varma VP, Sridhar K, Abdullah M, Vyas P, Ashiq Thalappil M, et al. Deciphering the Role of Leptospira Surface Protein LigA in Modulating the Host Innate Immune Response. *Front Immunol.* 2021;12:807775.
 113. Fernandes LGV, Putz EJ, Stasko J, Lippolis JD, Nascimento ALTO, Nally JE. Evaluation of LipL32 and LigA/LigB Knockdown Mutants in Leptospira interrogans Serovar Copenhageni: Impacts to Proteome and Virulence. *Front Microbiol.* 2021;12:799012.
 114. Pappas CJ, Picardeau M. Control of Gene Expression in Leptospira spp. by Transcription Activator-Like Effectors Demonstrates a Potential Role for LigA and LigB in Leptospira interrogans Virulence. *Appl Environ Microbiol.* nov 2015;81(22):7888-92.
 115. Figueira CP, Croda J, Choy HA, Haake DA, Reis MG, Ko AI, et al. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte Leptospira biflexa confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. *BMC Microbiol.* 9 juin 2011;11:129.
 116. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LCD, Vasconcellos SA, Figueira CP, Picardeau M, et al. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte Leptospira biflexa expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett.* mai 2016;173:61-8.
 117. Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikram A, Henry R, et al. Genome-Wide Transposon Mutagenesis in Pathogenic Leptospira Species. *Infect Immun.* févr 2009;77(2):810-6.
 118. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, et al. Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PloS One.* 14 nov 2007;2(11):e1188.
 119. Satheeshkumar PK, Anu PV, Junaida MI, Madanan MG, Jebasingh T, Nair AJ, et al. Expression of Leptospira membrane proteins Signal Peptidase (SP) and Leptospira Endostatin like A (Len A) in BL-21(DE3) is toxic to the host cells. *J Genet Eng Biotechnol.* déc 2018;16(2):393-8.
 120. Murray GL, Srikram A, Hoke DE, Wunder EA, Henry R, Lo M, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans. *Infect Immun.* mars 2009;77(3):952-8.
 121. King AM, Bartpho T, Sermswan RW, Bulach DM, Eshghi A, Picardeau M, et al. Leptospiral Outer Membrane Protein LipL41 Is Not Essential for Acute Leptospirosis but Requires a Small Chaperone Protein, Lep, for Stable Expression. *Infect Immun.* août 2013;81(8):2768-76.

122. Ratet G, Santecchia I, Fanton d'Andon M, Vernel-Pauillac F, Wheeler R, Lenormand P, et al. LipL21 lipoprotein binding to peptidoglycan enables *Leptospira interrogans* to escape NOD1 and NOD2 recognition. *PLoS Pathog.* déc 2017;13(12):e1006725.
123. Zhang K, Murray GL, Seemann T, Srikrum A, Bartpho T, Sermswan RW, et al. Leptospiral LruA Is Required for Virulence and Modulates an Interaction with Mammalian Apolipoprotein AI. *Infect Immun.* oct 2013;81(10):3872-9.
124. Verma A, Artiushin S, Matsunaga J, Haake DA, Timoney JF. LruA and LruB, Novel Lipoproteins of Pathogenic *Leptospira interrogans* Associated with Equine Recurrent Uveitis. *Infect Immun.* nov 2005;73(11):7259-66.
125. Daroz BB, Fernandes LGV, Cavenague MF, Kochi LT, Passalia FJ, Takahashi MB, et al. A Review on Host-*Leptospira* Interactions: What We Know and Future Expectations. *Front Cell Infect Microbiol.* 25 nov 2021;11:777709.
126. Barbosa AS, Isaac L. Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system. *FEBS Lett.* 2020;594(16):2633-44.
127. Zhao JF, Chen HH, Ojcius DM, Zhao X, Sun D, Ge YM, et al. Identification of *Leptospira interrogans* Phospholipase C as a Novel Virulence Factor Responsible for Intracellular Free Calcium Ion Elevation during Macrophage Death. *PLOS ONE.* 4 oct 2013;8(10):e75652.
128. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* avr 2001;2(4):346-52.
129. Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem.* 11 juin 2004;279(24):25420-9.
130. Cagliero J, Vernel-Pauillac F, Murray G, Adler B, Matsui M, Werts C. Pathogenic *Leptospira* Limit Dendritic Cell Activation Through Avoidance of TLR4 and TRIF Signaling. *Front Immunol.* 2022;13:911778.
131. Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CRH, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2005;175(9):6022-31.
132. Nossal GJ, Ada GL, Austin CM. Antigen in immunity. X. Induction of immunologic tolerance to *Salmonella adelaide* flagellin. *J Immunol Baltim Md 1950.* oct 1965;95(4):665-72.
133. Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard JC. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol.* 1 mai 2018;26(5):423-35.
134. Holzapfel M, Bonhomme D, Cagliero J, Vernel-Pauillac F, Fanton d'Andon M, Bortolussi S, et al. Escape of TLR5 Recognition by *Leptospira* spp.: A Rationale for Atypical Endoflagella. *Front Immunol.* 2020;11:2007.

135. Wunder EA, Figueira CP, Benaroudj N, Hu B, Tong BA, Trajtenberg F, et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Mol Microbiol.* août 2016;101(3):457-70.
136. Lambert A, Picardeau M, Haake DA, Sermswan RW, Srikram A, Adler B, et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun.* juin 2012;80(6):2019-25.
137. Fontana C, Lambert A, Benaroudj N, Gasparini D, Gorgette O, Cachet N, et al. Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows That FliM Is Required for Full Endoflagella Assembly in *Leptospira interrogans*. *PloS One.* 2016;11(4):e0152916.
138. Liao S, Sun A, Ojcius DM, Wu S, Zhao J, Yan J. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol.* 9 déc 2009;9:253.
139. Fule L, Halifa R, Fontana C, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, et al. Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira*. *Mol Microbiol.* nov 2021;116(5):1392-406.
140. Zavala-Alvarado C, G Huete S, Vincent AT, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, et al. The oxidative stress response of pathogenic *Leptospira* is controlled by two peroxide stress regulators which putatively cooperate in controlling virulence. *PLoS Pathog.* déc 2021;17(12):e1009087.
141. Zavala-Alvarado C, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, Bussotti G, Bayram J, et al. The transcriptional response of pathogenic *Leptospira* to peroxide reveals new defenses against infection-related oxidative stress. *PLoS Pathog.* oct 2020;16(10):e1008904.
142. Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, et al. *Leptospira interrogans* Catalase Is Required for Resistance to H₂O₂ and for Virulence. *Infect Immun.* nov 2012;80(11):3892-9.
143. King AM, Pretre G, Bartpho T, Sermswan RW, Toma C, Suzuki T, et al. High-Temperature Protein G Is an Essential Virulence Factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* mars 2014;82(3):1123-31.
144. Lourdault K, Cerqueira GM, Wunder EA, Picardeau M. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect Immun.* sept 2011;79(9):3711-7.
145. Kędzierska-Mieszkowska S, Arent Z. AAA+ Molecular Chaperone ClpB in *Leptospira interrogans*: Its Role and Significance in Leptospiral Virulence and Pathogenesis of Leptospirosis. *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(18):6645.
146. Murray GL, Srikram A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan RW, Adler B. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect.* févr 2009;11(2):311-4.

147. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 18 févr 2016;10(2):e0004403.
148. Gaultney RA, Vincent AT, Lorigou C, Coppée JY, Sismeiro O, Varet H, et al. 4-Methylcytosine DNA modification is critical for global epigenetic regulation and virulence in the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res*. 2 déc 2020;48(21):12102-15.
149. Eshghi A, Becam J, Lambert A, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, et al. A Putative Regulatory Genetic Locus Modulates Virulence in the Pathogen *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. juin 2014;82(6):2542-52.
150. Adhikarla H, Wunder EA, Mechaly AE, Mehta S, Wang Z, Santos L, et al. Lvr, a Signaling System That Controls Global Gene Regulation and Virulence in Pathogenic *Leptospira*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 [cité 11 oct 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00045>
151. Lourdault K, Matsunaga J, Haake DA. High-Throughput Parallel Sequencing to Measure Fitness of *Leptospira interrogans* Transposon Insertion Mutants during Acute Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 8 nov 2016;10(11):e0005117.
152. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition. *Infect Immun*. juin 2007;75(6):2864-74.
153. Thibeaux R, Soupé-Gilbert ME, Kainiu M, Girault D, Bierque E, Fernandes J, et al. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *Npj Biofilms Microbiomes*. 12 juin 2020;6(1):1-11.
154. Wolgemuth CW. Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. *Semin Cell Dev Biol*. oct 2015;46:104-12.
155. Galán JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:415-38.
156. Wagner S, Grin I, Malmshemer S, Singh N, Torres-Vargas CE, Westerhausen S. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1 oct 2018;365(19):fny201.
157. Halte M, Erhardt M. Protein Export via the Type III Secretion System of the Bacterial Flagellum. *Biomolecules*. févr 2021;11(2):186.
158. Abby SS, Cury J, Guglielmini J, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep*. 16 mars 2016;6:23080.
159. Narayanavari SA, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). *Microbiology*. mai 2012;158(Pt 5):1137-46.

160. Chaurasia R, Sritharan M. Cytotoxicity of the 42 kDa SMase C sphingomyelinase secreted by *Leptospira interrogans* serovar Pomona on Vero cells. *Microbiol Read Engl*. nov 2020;166(11):1065-73.
161. Che R, Ding S, Zhang Q, Yang W, Yan J, Lin X. Haemolysin Sph2 of *Leptospira interrogans* induces cell apoptosis via intracellular reactive oxygen species elevation and mitochondrial membrane injury. *Cell Microbiol*. janv 2019;21(1):e12959.
162. Narayanavari SA, Lourdault K, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003952.
163. Courrol DDS, da Silva CCF, Prado LG, Chura-Chambi RM, Morganti L, de Souza GO, et al. Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:966370.
164. Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *mBio*. 5 juill 2018;9(3):e01153-18.
165. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHÆTOSIS ICTEROHÆMORRHAGICA). *J Exp Med*. 1 mars 1916;23(3):377-402.
166. Ellinghausen HC, McCullough WG. NUTRITION OF LEPTOSPIRA POMONA AND GROWTH OF 13 OTHER SEROTYPES: FRACTIONATION OF OLEIC ALBUMIN COMPLEX AND A MEDIUM OF BOVINE ALBUMIN AND POLYSORBATE 80. *Am J Vet Res*. janv 1965;26:45-51.
167. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* I. Growth at Low Temperatures. *J Bacteriol*. juill 1967;94(1):27-31.
168. Goarant C, Girault D, Thibeaux R, Soupé-Gilbert ME. Isolation and Culture of *Leptospira* from Clinical and Environmental Samples. In: Koizumi N, Picardeau M, éditeurs. *Leptospira spp: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cité 5 oct 2022]. p. 1-9. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_1
169. Ellinghausen HC. Growth, cultural characteristics, and antibacterial sensitivity of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Cornell Vet*. juill 1983;73(3):225-39.
170. Baseman JB, Cox CD. Intermediate Energy Metabolism of *Leptospira*. *J Bacteriol*. mars 1969;97(3):992-1000.
171. Cameron CE. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cité 5 oct 2022]. p. 21-41. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3
172. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. « *Leptospira* » and leptospirosis [Internet]. *MediSci*; 1999 [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://research.monash.edu/en/publications/leptospira-and-leptospirosis>

173. Louvel H, Picardeau M. Genetic Manipulation of *Leptospira biflexa*. *Curr Protoc Microbiol.* 2007;5(1):12E.4.1-12E.4.12.
174. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Gloriani NG, Yoshida SI. In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2010;54(12):5403-5.
175. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Saito M, Gloriani NG, Yoshida S ichi. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol Immunol.* 2011;55(7):494-501.
176. Loureiro AP, Martins G, Pinto P, Narduche L, Teixeira RC, Lilenbaum W. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples. *Lett Appl Microbiol.* déc 2015;61(6):603-6.
177. Hornsby RL, Alt DP, Nally JE. Isolation and propagation of leptospires at 37 °C directly from the mammalian host. *Sci Rep.* 15 juin 2020;10(1):9620.
178. Fernandes LGV, Guaman LP, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Picardeau M, Nascimento ALTO. Gene silencing based on RNA-guided catalytically inactive Cas9 (dCas9): a new tool for genetic engineering in *Leptospira*. *Sci Rep [Internet].* 12 févr 2019 [cité 22 mars 2021];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372684/>
179. Taxonomy Browser [Internet]. NCBI. [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=171>
180. Picardeau M. Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. In: Adler B, éditeur. *Leptospira and Leptospirosis [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cité 4 oct 2022]. p. 43-63. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4
181. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 17 juill 1998;281(5375):375-88.
182. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 11 déc 1997;390(6660):580-6.
183. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang YF, Zhang Y, Jiang X, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep.* 2 févr 2016;6(1):20020.
184. Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J Bacteriol.* sept 1993;175(17):5445-51.
185. Harrison PW, Lower RPJ, Kim NKD, Young JPW. Introducing the bacterial « chromid »: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* avr 2010;18(4):141-8.

186. Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, et al. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis*. 25 oct 2012;6(10):e1853.
187. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLOS ONE*. 13 févr 2008;3(2):e1607.
188. Cohen SN, Chang ACY. Recircularization and Autonomous Replication of a Sheared R-Factor DNA Segment in *Escherichia coli* Transformants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1973;70(5):1293-7.
189. Girons IS, Margarita D, Amouriaux P, Baranton G. First isolation of bacteriophages for a spirochaete: Potential genetic tools for *Leptospira*. *Res Microbiol*. 1 nov 1990;141(9):1131-8.
190. Girons IS, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, Hendrix RW, et al. The LE1 Bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* Shuttle Vector. *J Bacteriol*. 15 oct 2000;182(20):5700-5.
191. Pappas CJ, Benaroudj N, Picardeau M. A Replicative Plasmid Vector Allows Efficient Complementation of Pathogenic *Leptospira* Strains. *Appl Environ Microbiol*. mai 2015;81(9):3176-81.
192. Picardeau M. Toolbox of Molecular Techniques for Studying *Leptospira* Spp. In: Adler B, éditeur. *Spirochete Biology: The Post Genomic Era* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 5 oct 2022]. p. 141-62. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/82_2017_45
193. Picardeau M. Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Appl Environ Microbiol*. janv 2008;74(1):319-22.
194. Picardeau M, Brenot A, Girons IS. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol*. 2001;40(1):189-99.
195. Lampe DJ, Churchill ME, Robertson HM. A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J*. 1 oct 1996;15(19):5470-9.
196. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*. 11 déc 2009;326(5959):1509-12.
197. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 28 nov 2014;346(6213):1258096.
198. Fernandes LGV, Hornsby RL, Nascimento ALTO, Nally JE. Application of CRISPR Interference (CRISPRi) for Gene Silencing in Pathogenic Species of *Leptospira*. *J Vis Exp JoVE*. 14 août 2021;(174).

199. Fernandes LGV, Hornsby RL, Nascimento ALTO, Nally JE. Genetic manipulation of pathogenic *Leptospira*: CRISPR interference (CRISPRi)-mediated gene silencing and rapid mutant recovery at 37 °C. *Sci Rep*. 19 janv 2021;11(1):1768.
200. Fernandes LGV, Nascimento ALTO. A Novel Breakthrough in *Leptospira* spp. Mutagenesis: Knockout by Combination of CRISPR/Cas9 and Non-homologous End-Joining Systems. *Front Microbiol*. 2022;13:915382.
201. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. sept 2013;31(9):822-6.
202. Aviat F, Slamti L, Cerqueira GM, Lourdault K, Picardeau M. Expanding the Genetic Toolbox for *Leptospira* Species by Generation of Fluorescent Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. déc 2010;76(24):8135-42.
203. Matsunaga J, Coutinho ML. Positive regulation of *Leptospira interrogans* kdp expression by KdpE as Demonstrated with a novel β -galactosidase reporter in *Leptospira biflexa*. *Appl Environ Microbiol*. août 2012;78(16):5699-707.
204. Cerqueira GM, Souza NM, Araújo ER, Barros AT, Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. Development of Transcriptional Fusions to Assess *Leptospira interrogans* Promoter Activity. *PLOS ONE*. 18 mars 2011;6(3):e17409.
205. Hillman C, Stewart PE, Strnad M, Stone H, Starr T, Carmody A, et al. Visualization of Spirochetes by Labeling Membrane Proteins With Fluorescent Biarsenical Dyes. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2019 [cité 10 oct 2019];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00287/full>
206. Ratet G, Veyrier FJ, Fanton d'Andon M, Kammerscheit X, Nicola MA, Picardeau M, et al. Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira interrogans* in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. *PLoS Negl Trop Dis*. 4 déc 2014;8(12):e3359.
207. Ozuru R, Saito M, Kanemaru T, Miyahara S, Villanueva SYAM, Murray GL, et al. Adipose tissue is the first colonization site of *Leptospira interrogans* in subcutaneously infected hamsters. *PLOS ONE*. 28 févr 2017;12(2):e0172973.
208. Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun*. oct 2006;74(10):5848-59.
209. Qin JH, Sheng YY, Zhang ZM, Shi YZ, He P, Hu BY, et al. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601. *BMC Microbiol*. 9 juin 2006;6(1):51.
210. Patarakul K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol*. 29 janv 2010;10(1):31.
211. Lo M, Murray GL, Khoo CA, Haake DA, Zuerner RL, Adler B. Transcriptional Response of *Leptospira interrogans* to Iron Limitation and Characterization of a PerR Homolog. *Infect Immun*. nov 2010;78(11):4850-9.

212. Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 6 août 2009;460(7256):762-5.
213. Beck M, Malmström JA, Lange V, Schmidt A, Deutsch EW, Aebersold R. Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nat Methods*. nov 2009;6(11):817-23.
214. S S, K S, J R, Jj C, C S, Je N. Comparative proteomic analysis of lung tissue from guinea pigs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS) reveals a decrease in abundance of host proteins involved in cytoskeletal and cellular organization. *J Proteomics* [Internet]. 6 mars 2015 [cité 9 oct 2022];122. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25818725/>
215. Nally JE, Mullen W, Callanan JJ, Mischak H, Albalat A. Detection of urinary biomarkers in reservoir hosts of leptospirosis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl*. juin 2015;9(5-6):543-51.
216. Rosa PA, Jewett MW. Genetic Manipulation of *Borrelia*. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;42:307-32.
217. Miyata M, Robinson RC, Uyeda TQP, Fukumori Y, Fukushima S ichi, Haruta S, et al. Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes Cells*. 2020;25(1):6-21.
218. Soutourina OA, Semenova EA, Parfenova VV, Danchin A, Bertin P. Control of Bacterial Motility by Environmental Factors in Polarly Flagellated and Peritrichous Bacteria Isolated from Lake Baikal. *Appl Environ Microbiol*. sept 2001;67(9):3852-9.
219. Soutourina OA, Bertin PN. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1 oct 2003;27(4):505-23.
220. Jarrell KF, McBride MJ. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol*. juin 2008;6(6):466-76.
221. Lambert C, Evans KJ, Till R, Hogley L, Capeness M, Rendulic S, et al. Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Microbiol*. avr 2006;60(2):274-86.
222. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*. sept 2010;8(9):634-44.
223. Harshey RM. Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*. 1994;13(3):389-94.
224. Alberti L, Harshey RM. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol*. août 1990;172(8):4322-8.
225. Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2003;49(3):581-90.

226. Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J Bacteriol.* nov 2000;182(21):5990-6.
227. Armbruster CE, Hodges SA, Mobley HLT. Initiation of Swarming Motility by *Proteus mirabilis* Occurs in Response to Specific Cues Present in Urine and Requires Excess L-Glutamine. *J Bacteriol.* 15 mars 2013;195(6):1305-19.
228. McCarter LL. Dual Flagellar Systems Enable Motility under Different Circumstances. *Microb Physiol.* 2004;7(1-2):18-29.
229. Burkart M, Toguchi A, Harshey RM. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 3 mars 1998;95(5):2568-73.
230. Bastos-Arrieta J, Revilla-Guarinos A, Uspal WE, Simmchen J. Bacterial Biohybrid Microswimmers. *Front Robot AI [Internet].* 2018 [cité 12 oct 2022];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frobt.2018.00097>
231. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66(1):493-520.
232. Mattick JS. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56(1):289-314.
233. Merz AJ, So M, Sheetz MP. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* sept 2000;407(6800):98-102.
234. Mignot T. The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci.* 1 nov 2007;64(21):2733-45.
235. Islam ST, Mignot T. The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: A focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus*. *Semin Cell Dev Biol.* 1 oct 2015;46:143-54.
236. Mignot T, Nöllmann M. New insights into the function of a versatile class of membrane molecular motors from studies of *Myxococcus xanthus* surface (gliding) motility. *Microb Cell.* 4(3):98-100.
237. Hölscher T, Kovács ÁT. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiol.* 2017;19(7):2537-45.
238. Shrout JD. A fantastic voyage for sliding bacteria. *Trends Microbiol.* mai 2015;23(5):244-6.
239. Leifson E, Hugh R. Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. *J Bacteriol.* mars 1953;65(3):263-71.
240. Schuhmacher JS, Thormann KM, Bange G. How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiol Rev.* nov 2015;39(6):812-22.

241. Thormann KM, Beta C, Kühn MJ. Wrapped Up: The Motility of Polarly Flagellated Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2022;76(1):349-67.
242. Guttenplan SB, Shaw S, Kearns DB. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* janv 2013;87(1):211-29.
243. Grognot M, Taute KM. More than propellers: how flagella shape bacterial motility behaviors. *Curr Opin Microbiol.* 1 juin 2021;61:73-81.
244. Shinoda S, Okamoto K. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J Bacteriol.* mars 1977;129(3):1266-71.
245. Mears PJ, Koirala S, Rao CV, Golding I, Chemla YR. *Escherichia coli* swimming is robust against variations in flagellar number. *eLife.* 11 févr 2014;3:e01916.
246. Huitema E, Pritchard S, Matteson D, Radhakrishnan SK, Viollier PH. Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell.* 10 mars 2006;124(5):1025-37.
247. Davis NJ, Cohen Y, Sanselicio S, Fumeaux C, Ozaki S, Luciano J, et al. De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle. *Genes Dev.* 15 sept 2013;27(18):2049-62.
248. Green JCD, Kahramanoglou C, Rahman A, Pender AMC, Charbonnel N, Fraser GM. Recruitment of the earliest component of the bacterial flagellum to the old cell division pole by a membrane-associated signal recognition particle family GTP-binding protein. *J Mol Biol.* 28 août 2009;391(4):679-90.
249. Schuhmacher JS, Rossmann F, Dempwolff F, Knauer C, Altegoer F, Steinchen W, et al. MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 mars 2015;112(10):3092-7.
250. Bange G, Kümmerer N, Grudnik P, Lindner R, Petzold G, Kressler D, et al. Structural basis for the molecular evolution of SRP-GTPase activation by protein. *Nat Struct Mol Biol.* 6 nov 2011;18(12):1376-80.
251. Ono H, Takashima A, Hirata H, Homma M, Kojima S. The MinD homolog FlhG regulates the synthesis of the single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. *Mol Microbiol.* 2015;98(1):130-41.
252. Kazmierczak BI, Hendrixson DR. Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Mol Microbiol.* mai 2013;88(4):655-63.
253. Balaban M, Hendrixson DR. Polar Flagellar Biosynthesis and a Regulator of Flagellar Number Influence Spatial Parameters of Cell Division in *Campylobacter jejuni*. *PLOS Pathog.* 1 déc 2011;7(12):e1002420.
254. Yang RS, Chen YT. Flagellation of *Shewanella oneidensis* Impacts Bacterial Fitness in Different Environments. *Curr Microbiol.* 1 août 2020;77(8):1790-9.
255. van Amsterdam K, van der Ende A. *Helicobacter pylori* HP1034 (ylxH) is required for motility. *Helicobacter.* oct 2004;9(5):387-95.

256. Baraquet C, Harwood CS. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci.* 12 nov 2013;110(46):18478-83.
257. Wilhelms M, Molero R, Shaw JG, Tomás JM, Merino S. Transcriptional Hierarchy of *Aeromonas hydrophila* Polar-Flagellum Genes. *J Bacteriol.* oct 2011;193(19):5179-90.
258. Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, et al. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol.* nov 2009;191(21):6555-70.
259. Canals R, Ramirez S, Vilches S, Horsburgh G, Shaw JG, Tomás JM, et al. Polar Flagellum Biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol.* janv 2006;188(2):542-55.
260. Yamaichi Y, Bruckner R, Ringgaard S, Möll A, Cameron DE, Briegel A, et al. A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.* 15 oct 2012;26(20):2348-60.
261. Kusumoto A, Shinohara A, Terashima H, Kojima S, Yakushi T, Homma M. Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol Read Engl.* mai 2008;154(Pt 5):1390-9.
262. Nakamura S, Minamino T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules.* juill 2019;9(7):279.
263. Chen X, Berg HC. Torque-Speed Relationship of the Flagellar Rotary Motor of *Escherichia coli*. *Biophys J.* 1 févr 2000;78(2):1036-41.
264. Magariyama Y, Sugiyama S, Muramoto K, Maekawa Y, Kawagishi I, Imae Y, et al. Very fast flagellar rotation. *Nature.* oct 1994;371(6500):752-752.
265. Minamino T. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 août 2014;1843(8):1642-8.
266. Minamino T, Imada K, Namba K. Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol.* 1 déc 2008;18(6):693-701.
267. Branch RW, Sayegh MN, Shen C, Nathan VSJ, Berg HC. Adaptive Remodelling by FliN in the Bacterial Rotary Motor. *J Mol Biol.* 23 sept 2014;426(19):3314-24.
268. Delalez NJ, Berry RM, Armitage JP. Stoichiometry and Turnover of the Bacterial Flagellar Switch Protein FliN. *mBio.* juill 2014;5(4):e01216-14.
269. Delalez NJ, Wadhams GH, Rosser G, Xue Q, Brown MT, Dobbie IM, et al. Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FliM. *Proc Natl Acad Sci.* 22 juin 2010;107(25):11347-51.
270. Terashima H, Kawamoto A, Morimoto YV, Imada K, Minamino T. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophys Physicobiology.* 2017;14:191-8.

271. Kaplan M, Sweredoski MJ, Rodrigues JPGLM, Tocheva EI, Chang YW, Ortega DR, et al. Bacterial flagellar motor PL-ring disassembly subcomplexes are widespread and ancient. *Proc Natl Acad Sci.* 21 avr 2020;117(16):8941-7.
272. San Martin F, Fule L, Iraola G, Buschiazzo A, Picardeau M. Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum. *Trends Microbiol* [Internet]. 14 oct 2022 [cité 14 oct 2022]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X22002566>
273. Chang Y, Zhang K, Carroll BL, Zhao X, Charon NW, Norris SJ, et al. Molecular mechanism for rotational switching of the bacterial flagellar motor. *Nat Struct Mol Biol.* nov 2020;27(11):1041-7.
274. Minamino T, Terahara N, Kojima S, Namba K. Autonomous control mechanism of stator assembly in the bacterial flagellar motor in response to changes in the environment. *Mol Microbiol.* 2018;109(6):723-34.
275. Terahara N, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Namba K, Minamino T. Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the Bacillus flagellar motor. *Sci Adv.* nov 2017;3(11):eaao4119.
276. Ito M, Hicks DB, Henkin TM, Guffanti AA, Powers BD, Zvi L, et al. MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic Bacillus, and its homologue is a second functional Mot in Bacillus subtilis. *Mol Microbiol.* 2004;53(4):1035-49.
277. Sato K, Homma M. Multimeric Structure of PomA, a Component of the Na⁺-driven Polar Flagellar Motor of Vibrio alginolyticus *. *J Biol Chem.* 30 juin 2000;275(26):20223-8.
278. Braun TF, Al-Mawsawi LQ, Kojima S, Blair DF. Arrangement of Core Membrane Segments in the MotA/MotB Proton-Channel Complex of Escherichia coli. *Biochemistry.* 1 janv 2004;43(1):35-45.
279. Kojima S, Blair DF. Solubilization and Purification of the MotA/MotB Complex of Escherichia coli. *Biochemistry.* 1 janv 2004;43(1):26-34.
280. Terashima H, Fukuoka H, Yakushi T, Kojima S, Homma M. The Vibrio motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na⁺-driven flagella and required for stator formation. *Mol Microbiol.* 2006;62(4):1170-80.
281. Eggenhofer E, Haslbeck M, Scharf B. MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in Sinorhizobium meliloti. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):701-12.
282. Hirano T, Minamino T, Macnab RM. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagellum-specific muramidase | Edited by M. F. Moody. *J Mol Biol.* 14 sept 2001;312(2):359-69.
283. Cohen EJ, Hughes KT. Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. *J Bacteriol.* juill 2014;196(13):2387-95.

284. Spöring I, Martinez VA, Hotz C, Schwarz-Linek J, Grady KL, Nava-Sedeño JM, et al. Hook length of the bacterial flagellum is optimized for maximal stability of the flagellar bundle. *Sourjik V, éditeur. PLOS Biol.* 6 sept 2018;16(9):e2006989.
285. Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol.* 1 avr 2006;14(4):151-5.
286. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism. *J Bacteriol.* 15 juin 2003;185(12):3567-74.
287. Inoue T, Barker CS, Matsunami H, Aizawa SI, Samatey FAY 2018. The FlaG regulator is involved in length control of the polar flagella of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology.* 164(5):740-50.
288. Scharf B, Schuster-Wolff-Bühning H, Rachel R, Schmitt R. Mutational Analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* Flagellin Genes: Importance of Flagellin A for Flagellar Filament Structure and Transcriptional Regulation. *J Bacteriol.* 15 sept 2001;183(18):5334-42.
289. Faulds-Pain A, Birchall C, Aldridge C, Smith WD, Grimaldi G, Nakamura S, et al. Flagellin Redundancy in *Caulobacter crescentus* and Its Implications for Flagellar Filament Assembly. *J Bacteriol.* juin 2011;193(11):2695-707.
290. Suzuki T, Komeda Y. Incomplete flagellar structures in *Escherichia coli* mutants. *J Bacteriol.* févr 1981;145(2):1036-41.
291. Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol.* 20 juill 1992;226(2):433-46.
292. Al-Otaibi NS, Bergeron JRC. Structure and Assembly of the Bacterial Flagellum. In: Harris JR, Marles-Wright J, éditeurs. *Macromolecular Protein Complexes IV: Structure and Function* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [cité 12 oct 2022]. p. 395-420. (Subcellular Biochemistry). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-031-00793-4_13
293. Fabiani FD, Renault TT, Peters B, Dietsche T, Gálvez EJC, Guse A, et al. A flagellum-specific chaperone facilitates assembly of the core type III export apparatus of the bacterial flagellum. *PLOS Biol.* 3 août 2017;15(8):e2002267.
294. Fukumura T, Makino F, Dietsche T, Kinoshita M, Kato T, Wagner S, et al. Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex. *PLOS Biol.* 3 août 2017;15(8):e2002281.
295. Terashima H, Hirano K, Inoue Y, Tokano T, Kawamoto A, Kato T, et al. Assembly Mechanism of a Supramolecular MS-Ring Complex To Initiate Bacterial Flagellar Biogenesis in *Vibrio* Species. *J Bacteriol.* 27 juill 2020;202(16):e00236-20.
296. dos Santos RN, Khan S, Morcos F. Characterization of C-ring component assembly in flagellar motors from amino acid coevolution. *R Soc Open Sci.* 5(5):171854.

297. Morimoto YV, Ito M, Hiraoka KD, Che YS, Bai F, Kami-ike N, et al. Assembly and stoichiometry of FlhF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body. *Mol Microbiol.* 2014;91(6):1214-26.
298. Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SDJ, Hara N, Kami-ike N, Namba K, et al. Assembly dynamics and the roles of FlhI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Sci Rep.* 6 oct 2014;4(1):6528.
299. Singer HM, Erhardt M, Hughes KT. Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates. *Mol Microbiol.* août 2014;93(3):505-20.
300. Ferris HU, Minamino T. Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol.* 1 déc 2006;14(12):519-26.
301. Shibata S, Takahashi N, Chevance FFV, Karlinsey JE, Hughes KT, Aizawa SI. FlhK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol.* juin 2007;64(5):1404-15.
302. Zhao Z, Zhao Y, Zhuang XY, Lo WC, Baker MAB, Lo CJ, et al. Frequent pauses in *Escherichia coli* flagella elongation revealed by single cell real-time fluorescence imaging. *Nat Commun.* 14 mai 2018;9(1):1885.
303. Ikeda T, Yamaguchi S, Hotani H. Flagellar growth in a filament-less *Salmonella* flhD mutant supplemented with purified hook-associated protein 2. *J Biochem (Tokyo).* juill 1993;114(1):39-44.
304. Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* févr 1990;172(2):741-7.
305. Osterman IA, Dikhtyar YuYu, Bogdanov AA, Dontsova OA, Sergiev PV. Regulation of flagellar gene expression in Bacteria. *Biochem Mosc.* 1 nov 2015;80(11):1447-56.
306. Soutourina O, Kolb A, Krin E, Laurent-Winter C, Rimsky S, Danchin A, et al. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol.* déc 1999;181(24):7500-8.
307. Yamamoto S, Kutsukake K. FlhT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* sept 2006;188(18):6703-8.
308. Das C, Mokashi C, Mande SS, Saini S. Dynamics and Control of Flagella Assembly in *Salmonella typhimurium*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 [cité 16 oct 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00036>
309. Laventie BJ, Jenal U. Surface Sensing and Adaptation in Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2020;74(1):735-60.
310. Colin R, Ni B, Laganenka L, Sourjik V. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiol Rev.* 6 juill 2021;45(6):fuab038.

311. Eisenbach M. Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol.* 1996;20(5):903-10.
312. Sourjik V, Wingreen NS. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 1 avr 2012;24(2):262-8.
313. Karmakar R. State of the art of bacterial chemotaxis. *J Basic Microbiol.* 2021;61(5):366-79.
314. Adler J, Hazelbauer GL, Dahl MM. Chemotaxis Toward Sugars in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* sept 1973;115(3):824-47.
315. Mesibov R, Adler J. Chemotaxis Toward Amino Acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* oct 1972;112(1):315-26.
316. Tso WW, Adler J. Negative Chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* mai 1974;118(2):560-76.
317. Yang Y, M. Pollard A, Höfler C, Poschet G, Wirtz M, Hell R, et al. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. *Mol Microbiol.* juin 2015;96(6):1272-82.
318. Tohidifar P, Bodhankar GA, Pei S, Cassidy CK, Walukiewicz HE, Ordal GW, et al. The Unconventional Cytoplasmic Sensing Mechanism for Ethanol Chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *mBio.* 6 oct 2020;11(5):e02177-20.
319. Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell Mol Life Sci.* 1 sept 2017;74(18):3293-303.
320. Gegner JA, Graham DR, Roth AF, Dahlquist FW. Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell.* 18 sept 1992;70(6):975-82.
321. Bian J, Liu X, Cheng YQ, Li C. Inactivation of Cyclic Di-GMP Binding Protein TDE0214 Affects the Motility, Biofilm Formation, and Virulence of *Treponema denticola*. *J Bacteriol.* sept 2013;195(17):3897-905.
322. Harman MW, Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Belperron AA, Bockenstedt LK, Fu HC, et al. The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue. *Proc Natl Acad Sci.* 21 févr 2012;109(8):3059-64.
323. Nakamura S. Motility of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*: Insight into Association with Pathogenicity. *Int J Mol Sci.* 7 févr 2022;23(3):1859.
324. Nakamura S. Measurement of the Cell-Body Rotation of *Leptospira*. In: Koizumi N, Picardeau M, éditeurs. *Leptospira spp: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cité 13 oct 2022]. p. 139-48. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_13
325. Takabe K, Kawamoto A, Tahara H, Kudo S, Nakamura S. Implications of coordinated cell-body rotations for *Leptospira* motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 sept 2017;491(4):1040-6.

326. Abe K, Kuribayashi T, Takabe K, Nakamura S. Implications of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion. *Sci Rep.* 18 août 2020;10(1):13937.
327. Wadhwa N, Phillips R, Berg HC. Torque-dependent remodeling of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci.* 11 juin 2019;116(24):11764-9.
328. Nord AL, Gachon E, Perez-Carrasco R, Nirody JA, Barducci A, Berry RM, et al. Catch bond drives stator mechanosensitivity in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci.* 5 déc 2017;114(49):12952-7.
329. Lele PP, Hosu BG, Berg HC. Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci.* 16 juill 2013;110(29):11839-44.
330. Chawla R, Ford KM, Lele PP. Torque, but not FliL, regulates mechanosensitive flagellar motor-function. *Sci Rep.* 17 juill 2017;7(1):5565.
331. Gupta R, Yuan J, Lele PP. Bacterial Proprioception: Can a Bacterium Sense Its Movement? *Front Microbiol.* 7 juill 2022;13:928408.
332. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 1 sept 2014;22(9):517-27.
333. Takabe K, Nakamura S, Ashihara M, Kudo S. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiol Immunol.* mars 2013;57(3):236-9.
334. Kaiser et Doetsch. Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments | *Nature* [Internet]. 1975 [cité 8 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/255656a0>
335. Shigematsu M, Umeda A, Fujimoto S, Amako K 1998. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *J Med Microbiol.* 47(6):521-6.
336. Mappley LJ, La Ragione RM, Woodward MJ. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Vet Microbiol.* 31 janv 2014;168(2):245-60.
337. Rosey EL, Kennedy MJ, Petrella DK, Ulrich RG, Yancey RJ. Inactivation of *Serpulina hyodysenteriae* flaA1 and flaB1 periplasmic flagellar genes by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol.* oct 1995;177(20):5959-70.
338. Rosey EL, Kennedy MJ, Yancey RJ. Dual flaA1 flaB1 mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect Immun.* oct 1996;64(10):4154-62.
339. Charon NW, Goldstein SF, Curci K, Limberger RJ. The bent-end morphology of *Treponema phagedenis* is associated with short, left-handed, periplasmic flagella. *J Bacteriol.* août 1991;173(15):4820-6.
340. Ge Y, Li C, Corum L, Slaughter CA, Charon NW. Structure and Expression of the FlaA Periplasmic Flagellar Protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.* mai 1998;180(9):2418-25.

341. Li C, Corum L, Morgan D, Rosey EL, Stanton TB, Charon NW. The Spirochete FlaA Periplasmic Flagellar Sheath Protein Impacts Flagellar Helicity. *J Bacteriol.* déc 2000;182(23):6698-706.
342. Charon NW, Goldstein SF, Block SM, Curci K, Ruby JD, Kreiling JA, et al. Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. *J Bacteriol.* févr 1992;174(3):832-40.
343. Wolgemuth CW, Charon NW, Goldstein SF, Goldstein RE. The Flagellar Cytoskeleton of the Spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2006;11(3-5):221-7.
344. Bromley DB, Charon NW. Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol.* mars 1979;137(3):1406-12.
345. Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol.* juill 1992;174(14):4761-8.
346. Chevance FFV, Takahashi N, Karlinsey JE, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, et al. The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev.* 15 sept 2007;21(18):2326-35.
347. Chu J, Liu J, Hoover TR. Phylogenetic Distribution, Ultrastructure, and Function of Bacterial Flagellar Sheaths. *Biomolecules.* mars 2020;10(3):363.
348. Zhu S, Nishikino T, Kojima S, Homma M, Liu J. The Vibrio H-Ring Facilitates the Outer Membrane Penetration of the Polar Sheathed Flagellum. *J Bacteriol.* 10 oct 2018;200(21):e00387-18.
349. Chang Y, Liu J. Architecture and Assembly of Periplasmic Flagellum. *Microbiol Spectr.* 2 août 2019;7(4):7.4.22.
350. Nakamura S, Leshansky A, Magariyama Y, Namba K, Kudo S. Direct Measurement of Helical Cell Motion of the Spirochete *Leptospira*. *Biophys J.* 7 janv 2014;106(1):47-54.
351. Harman M, Vig DK, Radolf JD, Wolgemuth CW. Viscous Dynamics of Lyme Disease and Syphilis Spirochetes Reveal Flagellar Torque and Drag. *Biophys J.* 19 nov 2013;105(10):2273-80.
352. Harman MW, Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Belperron AA, Bockenstedt LK, Fu HC, et al. The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue. *Proc Natl Acad Sci.* 21 févr 2012;109(8):3059-64.
353. Hovind-Hougen K. Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J Biol Med.* 1984;57(4):543-8.
354. Izard J, Renken C, Hsieh CE, Desrosiers DC, Dunham-Ems S, La Vake C, et al. Cryo-Electron Tomography Elucidates the Molecular Architecture of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *J Bacteriol.* déc 2009;191(24):7566-80.
355. Holt SC. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev.* mars 1978;42(1):114-60.

356. Limberger RJ. The Periplasmic Flagellum of Spirochetes. *Microb Physiol.* 2004;7(1-2):30-40.
357. Ruby JD, Charon NW. Effect of temperature and viscosity on the motility of the spirochete *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett.* 1 déc 1998;169(2):251-4.
358. Wood EJ, Seviour RJ, Siddique ABM, Glaisher RW, Webb RI, Trott DJ. Spherical body formation in the spirochaete *Brachyspira hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1 juin 2006;259(1):14-9.
359. Wunder EA, Slamti L, Suwondo DN, Gibson KH, Shang Z, Sindelar CV, et al. FcpB Is a Surface Filament Protein of the Endoflagellum Required for the Motility of the Spirochete *Leptospira*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:130.
360. Gibson KH, Trajtenberg F, Wunder EA, Brady MR, San Martin F, Mechaly A, et al. An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. *eLife.* 2020;9:e53672.
361. Zhang K, He J, Cantalano C, Guo Y, Liu J, Li C. FlhF regulates the number and configuration of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* [Internet]. [cité 24 mars 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mmi.14482>
362. Altegoer F, Schuhmacher J, Pausch P, Bange G. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2 janv 2014;30(1):49-64.
363. Murray TS, Kazmierczak BI. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* oct 2006;188(19):6995-7004.
364. Zhang K, Qin Z, Chang Y, Liu J, Malkowski MG, Shipa S, et al. Analysis of a flagellar filament cap mutant reveals that HtrA serine protease degrades unfolded flagellin protein in the periplasm of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 2019;111(6):1652-70.
365. Qin Z, Tu J, Lin T, Norris SJ, Li C, Motaleb MA, et al. Cryo-electron tomography of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi* reveals a distinct cytoplasmic ATPase complex. *PLoS Biol* [Internet]. 9 nov 2018 [cité 10 oct 2019];16(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6248999/>
366. Wand ME, Sockett RE, Evans KJ, Doherty N, Sharp PM, Hardie KR, et al. *Helicobacter pylori* FlhB function: The FlhB C-terminal homologue HP1575 acts as a « spare part » to permit flagellar export when the HP0770 FlhBCC domain is deleted. *J Bacteriol.* 2006;188(21):7531-41.
367. Guyard C, Raffel SJ, Schrupf ME, Dahlstrom E, Sturdevant D, Ricklefs SM, et al. Periplasmic Flagellar Export Apparatus Protein, FliH, Is Involved in Post-Transcriptional Regulation of FlaB, Motility and Virulence of the Relapsing Fever Spirochete *Borrelia hermsii*. *PLOS ONE.* 29 août 2013;8(8):e72550.
368. Lin T, Gao L, Zhao X, Liu J, Norris SJ. Mutations in the *Borrelia burgdorferi* Flagellar Type III Secretion System Genes *fliH* and *fliI* Profoundly Affect Spirochete Flagellar

- Assembly, Morphology, Motility, Structure, and Cell Division. *mBio*. 12 mai 2015;6(3):e00579-15.
369. Lowenthal AC, Hill M, Sycuro LK, Mehmood K, Salama NR, Ottemann KM. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* flagellar switch proteins. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7147-56.
370. Henderson LD, Matthews-Palmer TRS, Gulbranson CJ, Ribardo DA, Beeby M, Hendrixson DR. Diversification of *Campylobacter jejuni* Flagellar C-Ring Composition Impacts Its Structure and Function in Motility, Flagellar Assembly, and Cellular Processes. *mBio*. 7 janv 2020;11(1):e02286-19.
371. Li C, Xu H, Zhang K, Liang FT. Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FliG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity. *Mol Microbiol*. mars 2010;75(6):1563-76.
372. Liu J, Lin T, Botkin DJ, McCrum E, Winkler H, Norris SJ. Intact Flagellar Motor of *Borrelia burgdorferi* Revealed by Cryo-Electron Tomography: Evidence for Stator Ring Curvature and Rotor/C-Ring Assembly Flexion. *J Bacteriol*. août 2009;191(16):5026-36.
373. Islam MS, Morimoto YV, Kudo S, Nakamura S. H(+) and Na(+) are involved in flagellar rotation of the spirochete *Leptospira*. *Biochem Biophys Res Commun*. 16 oct 2015;466(2):196-200.
374. Hall AN, Subramanian S, Oshiro RT, Canzoneri AK, Kearns DB. SwrD (Y1zI) Promotes Swarming in *Bacillus subtilis* by Increasing Power to Flagellar Motors. *J Bacteriol*. 20 déc 2017;200(2):e00529-17.
375. Motaleb MA, Pitzer JE, Sultan SZ, Liu J. A Novel Gene Inactivation System Reveals Altered Periplasmic Flagellar Orientation in a *Borrelia burgdorferi* fliL Mutant ∇ . *J Bacteriol*. juill 2011;193(13):3324-31.
376. Zhao X, Norris SJ, Liu J. Molecular Architecture of the Bacterial Flagellar Motor in Cells. *Biochemistry*. 15 juill 2014;53(27):4323-33.
377. Xu H, He J, Liu J, Motaleb MA. BB0326 is responsible for the formation of periplasmic flagellar collar and assembly of the stator complex in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. févr 2020;113(2):418-29.
378. Moon KH, Zhao X, Manne A, Wang J, Yu Z, Liu J, et al. Spirochetes flagellar collar protein FlbB has astounding effects in orientation of periplasmic flagella, bacterial shape, motility, and assembly of motors in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. oct 2016;102(2):336-48.
379. Moon KH, Zhao X, Xu H, Liu J, Motaleb MA. A tetratricopeptide repeat domain protein has profound effects on assembly of periplasmic flagella, morphology and motility of the lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. 2018;110(4):634-47.
380. Chang Y, Xu H, Motaleb MA, Liu J. Characterization of the Flagellar Collar Reveals Structural Plasticity Essential for Spirochete Motility. *mBio*. 2021;0(0):e02494-21.

381. Zhao X, Zhang K, Boquoi T, Hu B, Motaleb MA, Miller KA, et al. Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci*. 27 août 2013;110(35):14390-5.
382. Lynch MJ, Miller M, James M, Zhang S, Zhang K, Li C, et al. Structure and chemistry of lysinoalanine crosslinking in the spirochaete flagella hook. *Nat Chem Biol*. oct 2019;15(10):959-65.
383. Miller MR, Miller KA, Bian J, James ME, Zhang S, Lynch M, et al. Spirochete flagella hook protein self-catalyze a lysinoalanine covalent cross-link for motility. *Nat Microbiol*. 8 août 2016;1(10):16134.
384. Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol*. 1 avr 2005;13(4):143-9.
385. Charon NW, Goldstein SF. Genetics of Motility and Chemotaxis of a Fascinating Group of Bacteria: The Spirochetes. *Annu Rev Genet*. déc 2002;36(1):47-73.
386. Kennedy MJ, Rosey EL, Yancey RJ. Characterization of flaA⁻ and flaB⁻ mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;153(1):119-28.
387. Motaleb MA, Sal MS, Charon NW. The Decrease in FlaA Observed in a flaB Mutant of *Borrelia burgdorferi* Occurs Posttranscriptionally. *J Bacteriol*. juin 2004;186(12):3703-11.
388. Brady MR, Martin FS, Debs GE, Gibson KH, Rodríguez A, Durán R, et al. Structural basis of flagellar filament asymmetry and supercoil templating by *Leptospira* spirochete sheath proteins [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [cité 20 juill 2022]. p. 2022.03.03.482903. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.03.482903v1>
389. Charon NW, Cockburn A, Li C, Liu J, Miller KA, Miller MR, et al. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:349-70.
390. Li C, Sal M, Marko M, Charon NW. Differential Regulation of the Multiple Flagellins in Spirochetes. *J Bacteriol*. mai 2010;192(10):2596-603.
391. Phoka T, Fule L, Da Fonseca JP, Cokelaer T, Picardeau M, Patarakul K. Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in *Leptospira* spp. *PloS One*. 2021;16(12):e0260981.
392. Sze CW, Morado DR, Liu J, Charon NW, Xu H, Li C. Carbon storage regulator A (CsrABb) is a repressor of *Borrelia burgdorferi* flagellin protein FlaB. *Mol Microbiol*. 2011;82(4):851-64.
393. Xu J, Koizumi N, Morimoto YV, Ozuru R, Masuzawa T, Nakamura S. Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium. *Sci Rep*. 2022;12(1).
394. Bian J, Liu X, Cheng YQ, Li C. Inactivation of cyclic di-GMP binding protein TDE0214 affects the motility, biofilm formation, and virulence of *Treponema denticola*. *J Bacteriol*. 2013;195(17):3897-905.

395. Pitzer JE, Sultan SZ, Hayakawa Y, Hobbs G, Miller MR, Motaleb MA. Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect Immun*. 2011;79(5):1815-25.
396. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 24 avr 2003;422(6934):888-93.
397. Sourjik V, Armitage JP. Spatial organization in bacterial chemotaxis. *EMBO J*. 18 août 2010;29(16):2724-33.
398. Novak EA, Sekar P, Xu H, Moon KH, Manne A, Wooten RM, et al. The *Borrelia burgdorferi* CheY3 response regulator is essential for chemotaxis and completion of its natural infection cycle. *Cell Microbiol*. 2016;18(12):1782-99.
399. Xu H, Sultan S, Yerke A, Moon KH, Wooten RM, Motaleb MA. *Borrelia burgdorferi* CheY2 Is Dispensable for Chemotaxis or Motility but Crucial for the Infectious Life Cycle of the Spirochete. *Infect Immun* [Internet]. 1 janv 2017 [cité 29 avr 2020];85(1). Disponible sur: <https://iai.asm.org/content/85/1/e00264-16>
400. Motaleb MA, Miller MR, Li C, Bakker RG, Goldstein SF, Silversmith RE, et al. CheX is a phosphorylated CheY phosphatase essential for *Borrelia burgdorferi* chemotaxis. *J Bacteriol*. déc 2005;187(23):7963-9.
401. Li C, Bakker RG, Motaleb MA, Sartakova ML, Cabello FC, Charon NW. Asymmetrical flagellar rotation in *Borrelia burgdorferi* nonchemotactic mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 avr 2002;99(9):6169-74.
402. Zhang K, Liu J, Tu Y, Xu H, Charon NW, Li C. Two CheW coupling proteins are essential in a chemosensory pathway of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. août 2012;85(4):782-94.
403. Zhang Y, Dong K, Zeng L, Li Q, Liu C, Wang J, et al. Genetic and molecular biological characterization of two homologous cheR genes from *Leptospira interrogans*. *Acta Biochim Biophys Sin*. oct 2013;45(10):806-16.
404. Dong K, Li Q, Liu C, Zhang Y, Zhao G, Guo X. Cloning and characterization of three cheB genes in *Leptospira interrogans*. *Acta Biochim Biophys Sin*. 15 mars 2010;42(3):216-23.
405. Li ZH, Dong K, Yuan JP, Hu BY, Liu JX, Zhao GP, et al. Characterization of the cheY genes from *Leptospira interrogans* and their effects on the behavior of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 juin 2006;345(2):858-66.
406. Lambert A, Takahashi N, Charon NW, Picardeau M. Chemotactic Behavior of Pathogenic and Nonpathogenic *Leptospira* Species. *Appl Environ Microbiol*. déc 2012;78(23):8467-9.
407. Lambert A. *Leptospira* spp. Toolbox for Chemotaxis Assay. In: Koizumi N, Picardeau M, éditeurs. *Leptospira spp: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cité 13 oct 2022]. p. 123-30. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_11

408. Lambert A, Wong Ng J, Picardeau M. Gene inactivation of a chemotaxis operon in the pathogen *Leptospira interrogans*. *FEMS Microbiol Lett.* janv 2015;362(3):1-8.
409. Islam MS, Takabe K, Kudo S, Nakamura S. Analysis of the chemotactic behaviour of *Leptospira* using microscopic agar-drop assay. *FEMS Microbiol Lett.* juill 2014;356(1):39-44.
410. Orillard E, Watts KJ. *Leptospira interrogans* Aer2: an Unusual Membrane-Bound PAS-Heme Oxygen Sensor. *J Bacteriol.* 19 avr 2022;204(4):e0056721.
411. La Fontaine J de (1621 1695). *Le Chêne et le Roseau* [Internet]. Vol. I. 60927-yyfre [cité 17 oct 2022]. Disponible sur: <http://catalogue.bnf.fr>
412. Nelson R. Congenital syphilis increases in the USA. *Lancet Microbe.* 1 mars 2022;3(3):e171.
413. Šmajš D, Paštěková L, Grillová L. Macrolide Resistance in the Syphilis Spirochete, *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*: Can We Also Expect Macrolide-Resistant Yaws Strains? *Am J Trop Med Hyg.* 7 oct 2015;93(4):678-83.
414. Stamm LV. Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2010;54(2):583-9.
415. Adler B. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:251-72.
416. Wunder EA, Adhikarla H, Hamond C, Owers Bonner KA, Liang L, Rodrigues CB, et al. A live attenuated-vaccine model confers cross-protective immunity against different species of the *Leptospira* genus. *eLife.* 10:e64166.
417. Genome [Internet]. NCBI. [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/?taxon=171>
418. Salvetti S, Ghelardi E, Celandroni F, Ceragioli M, Giannessi F, Senesi S. FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiol Read Engl.* août 2007;153(Pt 8):2541-52.
419. Carpenter PB, Hanlon DW, Ordal GW. flhF, a *Bacillus subtilis* flagellar gene that encodes a putative GTP-binding protein. *Mol Microbiol.* 1992;6(18):2705-13.
420. Kusumoto A, Kamisaka K, Yakushi T, Terashima H, Shinohara A, Homma M. Regulation of Polar Flagellar Number by the flhF and flhG Genes in *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem (Tokyo).* 1 janv 2006;139(1):113-21.
421. Carloni M. Modulation de la virulence de *Yersinia pestis* impliquant le locus de la flagelline et un processus de variation de phase [Internet] [These en préparation]. Université Paris Cité; 2018 [cité 18 oct 2022]. Disponible sur: <https://theses.fr/s213608>
422. Renault TT, Abraham AO, Bergmiller T, Paradis G, Rainville S, Charpentier E, et al. Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism. *Jülicher F, éditeur. eLife.* 6 mars 2017;6:e23136.

Annexes

Annexe 1 : Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum

Review

Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum

Fabiana San Martin,^{1,2,8} Lenka Fule,^{2,3,8} Gregorio Iraola,^{4,5,6} Alejandro Buschiazso,^{1,2,7,*} and Mathieu Picardeau^{2,3,*}

Spirochaetes, a phylum that includes medically important pathogens such as the causative agents of Lyme disease, syphilis, and leptospirosis, are in many ways highly unique bacteria. Their cell morphology, subcellular organization, and metabolism reveal atypical features. Spirochetal motility is also singular, dependent on the presence of periplasmic flagella or endoflagella, inserted subterminally at cell poles and not penetrating the outer membrane and elongating outside the cell as in enterobacteria. In this review we present a comprehensive comparative genomics analysis of endoflagellar systems in spirochetes, highlighting recent findings on the flagellar basal body and filament. Continued progress in understanding the function and architecture of spirochetal flagella is uncovering paradigm-shifting mechanisms of bacterial motility.

Taxonomic diversity is uncovering a new picture of the structure and function of bacterial flagella

The flagellum is a complex nanomachine that allows bacteria to move at high speeds. Swimming is crucial for many pathogens to encounter their hosts, to penetrate, disseminate, and establish disease. Flagella are also involved in forms of adhesion and biofilm formation [1], and can be targeted by phages [2,3] and the host immune system [4]. The global architecture of the flagellum is well conserved among bacteria, and the systems from enteric bacteria, like *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, are among the best-studied models, constituting paradigms for bacterial motility. Most bacteria generate motility through flagellar gyration, powered by the rotation of the flagellar motor. Torque is subsequently transmitted through a hook to the flagellar filament that ultimately provokes thrust. The basal body of the bacterial flagellar motor is composed of the export apparatus, the L- (at the outer membrane) and P- (at the peptidoglycan interface) rings, the rod, MS-ring, and C-ring [5] (Figure 1A, Key figure). However, as a more diverse set of bacterial organisms are being studied, important differences to the archetype enteric flagellum have been steadily identified: Gram-positive bacteria lack P- and L-rings, flagellar filaments in *Vibrio cholerae* and *Helicobacter pylori* are enclosed by a membranous sheath [6], and flagella in spirochetes, called endoflagella, reside entirely inside the cell, within the periplasm.

Several important features distinguish spirochete endoflagella from the exoflagella of most other bacteria (Figure 1B). The spirochete basal body is associated with the inner membrane, and comprises a trans-inner membrane ring, and a rod that penetrates the peptidoglycan layer, but not penetrating the outer membrane. The basal body is also more complex in terms of protein composition as compared to bacteria with extracellular appendages [7], including unique structural features [8–10]. The periplasmic hook is heavily crosslinked via a self-catalyzed mechanism unique to spirochetes [11,12], instrumental in bearing with the higher torques that these bacteria typically produce [13]. Finally, the spirochetal flagellar filaments are not composed of a single flagellin protein, as in enterobacteria, but instead comprise core and sheath proteins, each

Highlights

Spirochetes are unique bacteria, exhibiting singular morphological and physiological features.

Spirochetal motility relies on endoflagella, which harbor a hook and filament confined within the periplasm, between the inner and outer cell membrane.

As opposed to the extensively studied models of exoflagellated organisms, including enteric bacteria, the periplasmic localization is seemingly linked to dragging the spiral- or wave-shaped cell body of spirochetes, thus propelling the organism.

Spirochetes have evolved high-torque motors, which include additional elements compared to exoflagellates. The hook and filament also reveal unique structures adapted to higher rotational forces.

A comprehensive genome analysis of flagellar components within spirochetes, and in comparison to exoflagellates, was a missing tool for the microbiology community.

¹Laboratory of Molecular and Structural Microbiology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

²Pasteur International Unit, Integrative Microbiology of Zoonotic Agents, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay/Institut Pasteur, Paris, France

³Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 6047, Biology of Spirochetes Unit, Paris, France

⁴Microbial Genomics Laboratory, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Montevideo, 11400 Uruguay

⁵Center for Integrative Biology, Universidad Mayor, Santiago de Chile, Chile

⁶Wellcome Sanger Institute, Hinxton, UK

⁷Institut Pasteur, Département de Microbiologie Paris, France

often present in several different isoforms [14,15], in some species eventually including more than ten proteins to assemble a very complex filament structure [16,17]. Added to the multiflagellin core, we have recently identified several novel sheath proteins in *Leptospira* filaments [18,19] organized asymmetrically onto the native supercoiled appendage. Previous reviews about spirochetal motility are mainly focused on the *Borrelia burgdorferi* model [7,20–24], generally overlooking the phylum Spirochaetes as a whole. Here, we analyze the genomes of representative genera spanning the phylum Spirochaetes, with special details of the genes that encode endoflagellar components. Providing a systematic insight into the architecture, function, and evolution of endoflagellar systems from these atypical bacteria will pave the way to visualizing and better understanding a new paradigm of bacterial motility.

⁸These authors contributed equally to this work

*Correspondence: alebus@pasteur.edu.uy (A. Buschiazio) and mathieu.picardeau@pasteur.fr (M. Picardeau).

Spirochetes: spiral-shaped bacteria with a unique motility system

The phylum Spirochaetes includes bacteria that are ubiquitous and can adapt and colonize a wide range of environments (Box 1). The spirochetes are one of the few bacterial phyla whose cell morphology features reflect its phylogenetic relationships, thus forming a distinct line of evolution among bacteria [26]. Except for a few coccoid and nonmotile bacteria, such as *Sphaerochaeta* spp. [27], spirochetes are diderm, long, thin, and spiral-shaped motile cells. They have helical or flat-wave shapes such as in *Leptospira* and *Borrelia*, respectively. The cells are usually 0.1–3 µm in diameter and 3–20 µm in length, but giant spirochetes up to 150 µm in

Key Figure

Schematic representation of the endoflagella of *Borrelia* and *Leptospira* spp

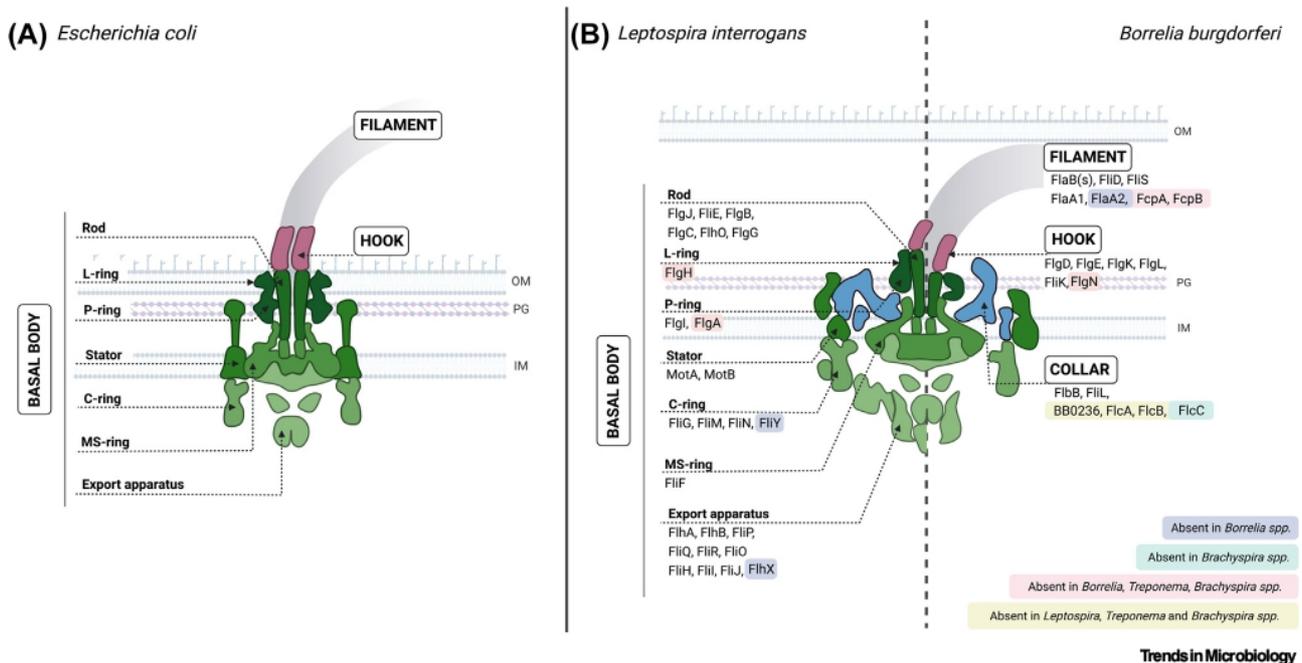


Figure 1. Schematic representation of the endoflagella of *Borrelia* and *Leptospira* spp. (A) and comparison with the *Escherichia coli* flagellum (B). Several flagellar proteins, such as MotA, MotB, FlgG, FlaB, or FlIN/FlIY, show apparent redundancy in some spirochetes but for convenience we kept only one paralog. A heatmap showing the distribution of flagellar proteins in the phylum Spirochaetes is shown in Figure 2.

Box 1. Ubiquity and diversity of spirochetes

The phylum of Spirochaetes is composed of a single class, the Spirochaetia, and four orders (Brachyspirales, Brevinematales, Leptospirales, and Spirochaetales) [25]. The Spirochaetales is the largest order, including several families and genera such as *Borrelia*, *Treponema*, *Cristispira*, and *Spirochaeta*. *Borrelia* spp. are arthropod-borne pathogens of humans, other mammals, and birds. *B. burgdorferi* and *Borrelia hermsii* are the agents of Lyme disease and relapsing fever, respectively. *Cristispira* spp. are found in the digestive tracts of marine and freshwater mollusks such as clams, mussels, and oysters. The genus *Treponema* includes the pathogens *Treponema pallidum* and *Treponema denticola*, the agents of syphilis and human periodontal disease, respectively. Most of the anaerobic spirochetes found in the hindguts of termites and wood-eating cockroaches belong to the genus *Treponema*. Among the order Brachyspirales, which is composed of a single family (Brachyspiraceae), the anaerobic spirochetes of the genus *Brachyspira*, including the agent of swine dysentery *Brachyspira hyodysenteriae*, colonize the intestines of various species of animals and birds. The order of Brevinematales and the family Brevinemataceae is composed of only one *Brevinema* species infecting shrews and mice. Among the order Leptospirales, the unique family Leptospiraceae is composed of the genera *Turneriella* and *Leptonema*, both composed of only one species, which are free-living bacteria, and the genus *Leptospira* which includes free-living saprophytes as well as pathogenic species that infect a wide range of mammals. Of note, most of the spirochetes described above are fastidious to grow *in vitro*, and several have not been amenable to grow in pure cultures.

length have also been described in the genera *Cristispira* and *Spirochaeta* [26]. The internal organelles of motility are called endoflagella, also referred to as axial fibrils/filaments, periplasmic flagella, or periplasmic fibrils/filaments [28]. Depending on the genus or species, spirochetes can have anything between one and hundreds of periplasmic flagella, inserted subterminally at each cell pole, and generally extending along most of the cell length, overlapping in the central region. *B. burgdorferi* has bundles of nine to 11 flagella arising from each pole and forming flat ribbons that wrap around the spirochete cell body [29]. *Treponema pallidum* and *T. denticola* have two to three periplasmic flagella that arise from each end of the cell, extending towards the center where they overlap [30,31]. The exceptions are the members of the family *Leptospiraceae*: they have a single periplasmic flagellum subterminally attached at each cell end, and their filaments are shorter, not overlapping towards the middle of the cells. In addition, and in contrast to *B. burgdorferi*, *Treponema phagedenis*, and *Brachyspira hyodysenteriae* – which display straight or slightly curved filaments [32–34] – the leptospiral periplasmic flagella adopt a highly curved supercoiled conformation once purified [35,36]. The rotation of these short, stiff, and supercoiled flagella in the periplasmic space, and their interaction with the cell body cylinder, generate very defined large-scale curved deformations of the cell body, resulting in the characteristic hook- and spiral-shaped ends, depending on the motors' rotational direction [18,37]. In *B. burgdorferi*, endoflagella not only induce undulations of the cell cylinder but also govern its shape [38]. The stiffness of the endoflagellar filament and its interaction with the outer membrane and the **protoplasmic cylinder** (see [Glossary](#)) drive a radically distinct way of swimming as opposed to the extensively studied models of exoflagellated organisms [39]. Spirochetes are capable of swimming in highly viscous, gel-like media that otherwise slow down or stop exoflagellated bacteria [40]. Furthermore, the swimming speeds of *Leptospira interrogans*, *Brachyspira pilosicoli*, and other spirochetes increase with **viscosity** [41,42]. Given that the motility of pathogenic spirochetes is crucial for host infection (Box 2), these swimming capabilities make spirochetes some of the most invasive mammalian pathogens among bacteria [23]. Recent studies have also shown that *Leptospira* spp. and *T. denticola* are capable of moving along surfaces by a mechanism called crawling, which may involve the flagella [43–45].

Uncovering the spirochetal flagellar proteins through genomic analysis

The main components of spirochetal endoflagella are highly conserved, yet some spirochetes have evolved genus-specific features (Figure 1B). Intriguingly, the evolutionary mechanisms that enabled the flagella from Spirochaetes to be confined within the periplasm are yet to be deciphered (Box 3). To better understand the evolutionary relationships of flagellar proteins within the phylum Spirochaetes we undertook a phylogenetic analysis by searching for homologous

Glossary

Collar: a large and complex spirochete-specific periplasmic structure that is anchored to the inner membrane and the MS ring. The collar may be crucial for the orientation of endoflagella in the periplasmic space.

Proton motive force: the electrochemical gradient of protons across a membrane due to a combination of the membrane potential and the concentration gradient of protons. It is used for various cellular processes, including flagellar rotation, ATP synthesis, and ion transport.

Protoplasmic cylinder: in bacteria, it comprises the cytoplasmic space, the inner membrane, and the peptidoglycan layer.

Stator units: the fixed component of the flagellar motor; it is an assembly of MotA–MotB complexes, also called force-generating units or torque-generating units, that power the rotation of the flagellar rotor, using energy derived from the transport of ions across the membrane.

Viscosity: the magnitude of the force required to shear a fluid. Water has a relatively low viscosity compared to gel-like media such as methylcellulose.

Box 2. Spirochetal motility and pathogenesis

Spirochetes are fastidious organisms to grow *in vitro* and to genetically manipulate. *T. pallidum*, for example, has been refractory to genetic manipulation until very recently [46]. In *B. burgdorferi*, several mutants have been generated, showing that motility and chemotaxis are required to invade and colonize both mammalian and tick hosts [22,47]. Similarly, analyses of *Leptospira* flagellar mutants, in animal models of the acute disease, have proved motility to be a key virulence determinant [16,48–50]. Flagellar mutants of *T. denticola*, the etiologic agent of periodontitis, were impaired in their ability to form dual-species biofilms with *Porphyromonas gingivalis* [51,52]. Analysis of motility of *B. burgdorferi* in the dermis of mice revealed new forms of motility, named lunging and wriggling [53]. Mathematical modeling predicts that *Borrelia* motility is the primary cause of the appearance and spread of the erythema migrans rash that characterizes Lyme disease [54]. *In vitro* studies have shown that *Leptospira* exhibits a back-and-forth movement when exposed to high viscosity environments, which could facilitate their ability to invade and spread during the infection [55]. It has been shown that *B. burgdorferi*, *T. pallidum*, and *L. interrogans* can cross the blood–brain barrier [56–58]. The syphilis agent is also able to cross the placental barrier, leading to fetal infection, and causing congenital syphilis [59]. *Leptospira* can also be found in placental tissue [60–62] and has long been known to affect pregnancy in cattle, but also in humans, leading to abortions and premature delivery [63,64] – which is consistent with the notion that *Leptospira* is capable of crossing the placenta barrier. In sum, pathogenic spirochetes can easily move through the dermis, break into and out of blood vessels, and can cross host barriers, but the exact mechanisms by which they do so remain elusive. Spirochetes are primarily extracellular bacteria, and translocation occurs predominantly via a trans-cellular route (crossing of pathogens through intercellular junctions) [47,65,66]. However, some reports suggest that *L. interrogans*, *T. denticola*, and *B. burgdorferi* can undergo intracellular invasion of different cell types [47,67,68].

sequences of 59 known flagellar proteins among 864 spirochetal genomes from 115 spirochetal species that belong to nine genera (Figure 2).

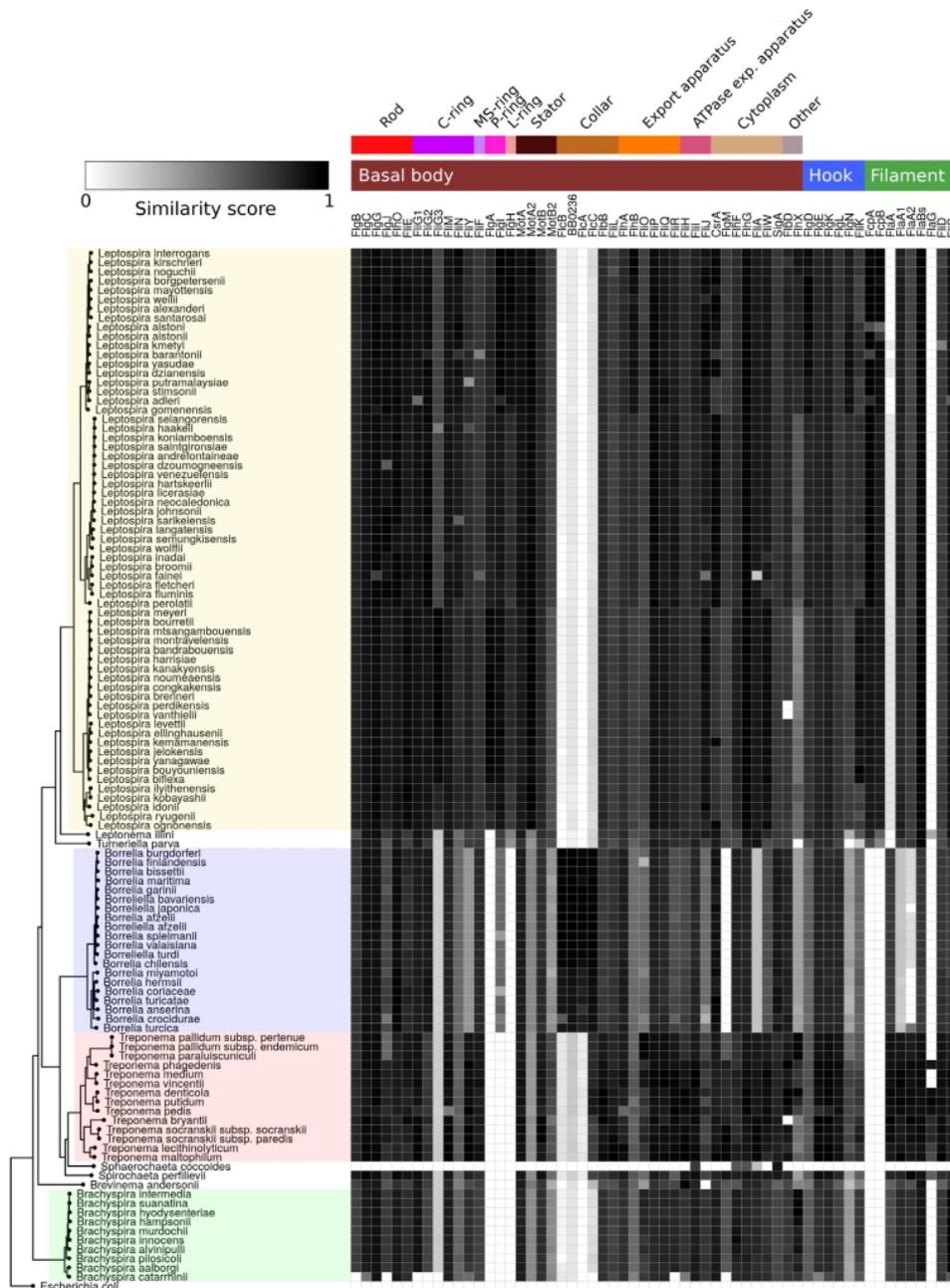
A heatmap depicting the presence/absence of flagellar proteins, and the degree of similarity among them, reveals an overall pattern that is largely in agreement with the phylogenetic tree (Figure 2). Excluding the coccoid and aflagellated *Sphaerochaeta coccoides* [27], which does not have flagellar proteins, 39/59 (66%) of the flagellar proteins are conserved among spirochetes (Figure 2). We can now clearly identify universal and genus-specific features for each of the major architectural elements of the spirochetal endoflagellum, namely the basal body, collar, hook and filament, as well as among flagellar regulators, as summarized below.

Basal body

The flagellar export apparatus is part of the flagellar basal body, and is highly conserved among bacteria, including in spirochetes (Figure 1). It consists of a transmembrane **proton-motive-force**-driven export gate (composed by the trans-membrane proteins FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ,

Box 3. The evolutionary origin of periplasmic flagella

The flagellar export apparatus is highly conserved among bacterial species. Its trans-membrane portion shares architectural features and homologous protein components with the virulence-associated type 3 secretion system (T3SS, or injectisome) [20,69], while the cytoplasmic portion of the flagellar export apparatus is homologous to F- and V-type ATPases [70]. Although the T3SS had initially been proposed to be an ancestor of the bacterial flagellum [71], recent phylogenetic reconstructions of both appendages suggest that the T3SS derived from a flagellar ancestor that subsequently lost flagellar genes [69]. This reduction of the flagellar structure is consistent with the observations of disassembly of different components of the flagella such as the hook, filament, cytoplasmic switch complex and associated ATPase, in exoflagellated bacteria under certain conditions [72,73]. Cryo-electron tomography studies have revealed structural diversity among flagellar motors from different species, showcasing adaptations to distinct environmental conditions [74–76]. Spirochetes, for example, have a unique multiprotein complex within the flagellar motor, called the collar, which seems essential to withstand the higher torques that spirochetal flagella produce [77]. The flagellar machinery of exoflagellated bacteria appears to be more simple in comparison to the spirochetal, and could have therefore preceded the emergence of periplasmic flagella. Chevance *et al.* showed that conversion of extracellular flagella of *Salmonella* to periplasmic flagella can arise by single amino acid changes in the flagellar basal-body rod protein FlgG [78]. Similarly, the deletion of *flgT* and *flgO*, which encode proteins that form a part of the flagellar outer membrane complex in *Vibrio alginolyticus*, shifts external sheathed flagella into periplasmic endoflagella [79]. Bacteria with sheathed flagella, such as most *Helicobacter* and *Vibrio* spp., and to a fewer extent members of the *Planctomyces* phylum [6], could therefore be evolutionary intermediates in the transition between the external and the periplasmic flagellum. Taken together, these results suggest that few mutational events could hamper the flagella to penetrate the outer membrane, leading to periplasmic appendages.



Trends in Microbiology

Figure 2. Distribution of flagellar protein-encoding genes in spirochetes. Distribution of flagellar protein-encoding genes in spirochetes. A heatmap is shown as a matrix, with columns corresponding to individual flagellar genes and lines corresponding to different species in the phylum Spirochaetes. The heatmap color indicates low to high sequence similarity, with the extremes corresponding to absence (white) or presence (black) of the gene. The distribution was analyzed by first calculating manually-curated multiple amino acid sequence alignments of 59 known flagellar proteins; for convenience, we kept one FlaB (spirochetes encode between one and four FlaB isoforms). Then, Hidden Markov Models (HMMs) were calculated for each individual alignment using hmmbuild v3.3.2 [122]. All available genomes belonging to the phylum Spirochaetes ($n = 971$) were downloaded from the PATRIC database (www.patricbrc.org/) and 864 genomes were kept for downstream analyses,

(Figure legend continued at the bottom of the next page.)

and FliR) and a cytoplasmic ATPase complex (formed by soluble components FliH, FliI, and FliJ in a 12:6:1 stoichiometry when assembled onto the flagellar appendage [80]). The assembled ATPase complex in spirochetes exhibits structural variations from the enterobacterial models [81]. Notably, each ATPase complex in *B. burgdorferi* appears to have a larger number of FliH subunits – which act as spokes that attach the hexameric FliI core to the rotating C-ring. The FliX protein, which can functionally substitute for the C-terminal domain of FliB in *H. pylori* [82], is also found in spirochetes but its function remains unknown. Previous studies in *B. burgdorferi* and *B. hermsii* show that the FliH–FliI complex is essential for motility and cell morphology but not for exporting rod, hook, and filament proteins [83,84]. In *Leptospira*, the transmembrane export gate is larger towards its cytoplasmic face, compared with those from other spirochetes [85], suggesting the presence of additional *Leptospira*-specific proteins. Similarly, cryo-electron tomography (cryoET) of *B. burgdorferi* flagella has recently revealed novel structures of the ATPase complex [81].

The *B. burgdorferi* motor has 16 **stator units**, in comparison to a maximum of 12 stator units in the motors of exoflagellated bacteria [10]. This is consistent with a larger motor (~80 nm of diameter in *Borrelia* vs. ~45 nm in *E. coli* and *Salmonella*) [81] and the higher torques that spirochetes ultimately achieve. The stator units in *Leptospira* comprise two copies of both MotA (MotA/MotA2) and MotB (MotB/MotB2). There seems to be no such redundancy in other spirochetes, which may be linked to the fact that *Leptospira biflexa* can translocate both H⁺ and Na⁺ ions as an energy source, while other spirochetes, including *Spirochaeta aurantia* and *B. burgdorferi*, use only protons [86]. In the C-ring, FliG is the protein most directly involved in interacting with the stator to generate torque. While there is only one isoform of FliG in most exoflagellated bacteria, two FliG paralogs are found in all spirochetes – except in *Leptospira*, which contains three paralogs. In *B. burgdorferi* only FliG2, and not FliG1, is present in the C-ring [10], and disruption of the *fliG1* gene did not affect flagellation, even though the swimming ability in highly viscous media is defective [50]. The function of the three FliG copies in *Leptospira* remains unknown. FliD (small flagellar operon protein D), which is present in all spirochetes, could be related to increasing the motor's torque as shown in the homologous SwrD (swarming motility protein D) from *Bacillus subtilis* [87].

The MS-ring constitutes the base of the rotor and is formed by multiple copies of FliF that polymerize forming a ring within the cytoplasmic membrane of bacteria, including in Spirochaetes. The P-ring protein FliG is present in *Leptospira*, *Leptonema*, *Turneriella*, and *Borrelia*, but is absent from *Treponema*, *Brevinema*, *Spirochaeta*, and *Brachyspira*. In *B. burgdorferi*, the P-ring, which appears to be masked by the collar (see below), is important for flagellar hook and/or filament assembly [88]. The periplasmic flagellar chaperone protein FliA, which is required for P-ring assembly in exoflagellated bacteria, is absent in all spirochetes except *Leptospira*. The L-ring protein FliH, which forms a circular complex traversing the outer membrane of exoflagellated Gram-negative bacteria, is found only in *Leptospira*, *Turneriella*, and *Leptonema* (Figures 1 and 2). In these spirochetes the function of FliH is still enigmatic since the structure it forms does not traverse the outer membrane, therefore lacking the bushing role ascribed to the L-ring in exoflagella [85]. A recent study suggests that the PL complex and its persistence is an ancient and conserved feature of the flagellar motor [89].

removing the ones not assigned to known species or from uncultivated samples. Each genome was reannotated with Prokka [123] and searched against the 59 flagellar HMMs using hmmsearch v3.3.2. We reported positive hits with e-value < 1 × 10⁻¹⁰. Resulting bitscores were scaled from 0 to 1 by normalizing by the highest score obtained for each flagellar protein. To put the results into an evolutionary context, a phylogenetic tree was built from the 864 spirochete and one *Escherichia coli* genome (outgroup) using gtdbtk v3.0 [124] based on a concatenated alignment of 120 universal bacterial marker genes. The resulting tree was collapsed at the species level, resulting in 115 species from genus *Leptospira* (n = 63), *Leptonema* (n = 1), *Turneriella* (n = 1), *Borrelia* (n = 21), *Treponema* (n = 15), *Sphaerochaeta* (n = 1), *Spirochaeta* (n = 1), *Brevinema* (n = 1), and *Brachyspira* (n = 10). For collapsed species, the mean normalized bitscore is shown for each protein. Visualizations were generated with the ggtree package [125]. Files, sequence alignments, and scripts to reproduce the analyses are available in the FigShare repository (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19686282>).

The C-ring, which includes the bidirectional rotor of the flagellar motor and the switch complex, typically comprises three proteins: FliG, FliM, and FliN or FliY (the latter two are mutually exclusive in most bacteria). However, as also seen in *Campylobacter* and *Helicobacter* [90,91], *Leptospira* species produce both FliN and FliY. Studies of *Campylobacter jejuni* indicate that these two proteins have distinct roles within the C-ring [90], while *L. interrogans fliY* and *fliM* mutants showed reduced motility and attenuation of virulence [92,93].

The rod is a short, hollow tube that connects the basal body to the hook, playing the role of a central shaft for the rotating appendage. It can be divided into an inner-membrane proximal portion, composed of four different proteins (six units of FliE, five FlgB, six FlgC, and five FlgF), and a distal rod segment, which comprises 24 protomers of the protein FlgG [94]. In spirochetes, FliH is the ortholog of FlgF [95]. The rod ends with a distal segment that comprises protomers of the protein FlgG. The distal rod is capped by the protein FlgJ on its tip, which, in enterobacteria, is a two-domain protein: an N-terminal portion involved in rod assembly, and a C-terminal muramidase domain engaged in peptidoglycan (PG) remodeling, a key event during flagellar biogenesis and PG wall-piercing [96]. Interestingly, in spirochetes, as well as in *Vibrio* and *C. jejuni*, FlgJ only comprises the N-terminal portion as a monodomain protein [97], implying that the muramidase domain is expressed as a separate protein. Work done with *B. burgdorferi* reveals singular features of both FlgJ and independent PG-remodeling enzymes. In contrast with the critical importance of FlgJ in Proteobacteria rod assembly, its influence on flagellation and motility is not substantial in *B. burgdorferi*, uncovering unique functional implications perhaps related to normal flagellar regulation [98]. A separate protein with PG-hydrolyzing activity, related to the C-terminal domain of FlgJ in two-domain variants of the protein, has recently been identified in *B. burgdorferi* [97]. This enzyme (encoded by *B. burgdorferi bb0259*) is indeed a lytic transglycosylase that interacts directly with FlgJ in the spirochete, enabling the flagella to penetrate through the PG layer and allow for proper filament assembly.

Collar

The flagellar basal body from spirochetes has a unique structure known as the **collar**, which is absent in exoflagellated bacteria. In *B. burgdorferi*, the collar is a large structure of ~71 nm in diameter and ~24 nm in height. Anchored in the cytoplasmic membrane and the MS-ring, the collar surrounds the central rod and the P-ring, interacting with the stator units and the FliL protein. FliL, in turn, interacts with the rotor, although its function is still not fully understood [7,99]. Several key components of the collar have been recently identified in *B. burgdorferi*: BB0326, also called periplasmic flagellar collar protein A (FicA) [77], FliB/BB0286 [100], BB0236 [101], BB0058 (FicB), and BB0624 (FicC) [8]. Combining *in situ* cryo-electron tomography (cryo-ET) studies of mutants, and protein-protein interaction data, it has been proposed that FicA is closely associated with the membrane and forms a turbine-shaped element; FicB forms a ring at the base of the collar; FicC is located on top of the collar structure; and BB0236 assembles onto FliB, which is located in the middle of the collar complex [8,100]. Although such structural complexity is not yet fully understood, several mutants have started to decipher the role that the collar exerts in the basal body. *fliB*, *bb0236*, *bb0362*, and *fliL* mutants produce fewer, shorter, and abnormal endoflagella, which can accommodate fewer stator complexes and are unusually tilted towards the cell pole [77]. Surprisingly, most of these proteins are not conserved in other spirochetes (Figures 1 and 2), strongly suggesting that other genus-specific collar proteins are yet to be identified. This is further confirmed by cryo-ET and subtomogram averaging data showing that the collar in *L. interrogans* is different from the structures of *B. burgdorferi* and *Treponema primitia* [7].

Hook

During hook assembly, the hook-capping protein FlgD and the hook protein FlgE are sequentially exported via the flagellar export apparatus. Recent studies demonstrate that, in spirochetes, subunits of FlgE self-catalyze a crosslinking reaction among different protomers, creating lysalanine covalent bonds that form a stable high-molecular-weight complex [11,12], likely conferring an unusually high robustness to the hook under stringent rotational stress, essential for spirochetal motility.

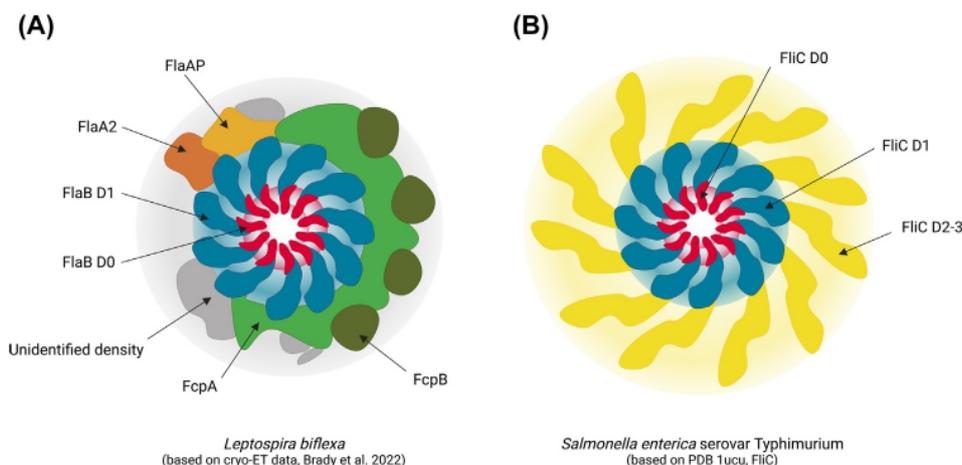
FlgE also plays a unique role in *B. burgdorferi*, regulating the expression of the filament proteins FlaA and FlaB [102]. Instead of affecting the transcription of filament-encoding genes, it is the translation and/or protein turnover of FlaA/B which is controlled. This mechanism appears to substitute the more classic cascades of motility gene transcriptional regulation exerted by dedicated sigma and anti-sigma factors such as σ^{28} /anti- σ^{28} (FlaA/FlgM), or σ^{54} (see the section 'Regulation of flagellar gene expression').

The molecular ruler FliK regulates the mature hook's length before FlgK and FlgL can be exported to form the hook–filament junction. This assembly process is essentially conserved in spirochetes [95] even though the cytosolic export chaperone protein FlgN (which binds specifically to the hook junction proteins FlgK and FlgL) is found only in *Leptospira*. In fact, the only chaperone which is conserved in spirochetes is FliS (described as a FliC chaperone in *E. coli*), which may here serve as a general chaperone with broad substrate specificity, at least partly substituting for FlgN and FliT (the latter is a FliD chaperone in *E. coli*) [103]. Of note, and for unclear reasons, the hook on top of the motor is wider (a diameter of ~21 nm) in *Leptospira* spp. than in *B. burgdorferi* (~16 nm) [85].

Filament

Flagellar filament assembly starts with the incorporation of a capping protein onto the tip of the nascent filament, a feature that spans bacteria, including spirochetes [104,105]. The filament cap protein, FliD, then serves as a flagellin-chaperoning component during filament assembly, also securing the filament's stability. The periplasmic flagellar filament in spirochetes was originally thought to be composed of a core of polymerized flagellin protomers (FlaBs), surrounded by a symmetric proteinaceous sheath of FlaA subunits [40]. Both FlaA and FlaB are essential to achieve full motility and virulence in many spirochetes [34,38,48,106,107]. Automatic genome annotations have resulted in some inconsistencies regarding gene nomenclature of flagellar multigene families. Such is the case for the several *flaA* and *flaB* variants found in different spirochete species, with numbering schemes that occasionally assign identical names to otherwise non-orthologous genes. The use of common gene names based on phylogenetic grounds is essential to facilitate comparison of data from different laboratories.

Spirochetal filaments express one (*Borrelia* spp.) or up to four different FlaBs (*Leptospira* spp.) which are orthologous to FliC, the widely known flagellin from *Salmonella* (Figure 3). The 3D structure of flagellins typically comprises four distinct domains. The N- and C-terminal regions are extremely conserved and fold into domains D0 and D1 that allow flagellins to polymerize into protofilaments; while domains D2 and D3, in the center, are less conserved among different bacterial taxons [108]. In spirochetal filaments, the FlaB core follows the same 11-protofilament helical organization shared by all bacteria, but each FlaB protomer lacks the external D2 and D3 domains (Figure 3A), resulting in a thinner tubular structure (~15 nm outer diameter vs. ~21 nm in *Salmonella*). FlaBs are O-glycosylated, as shown in *T. pallidum* and *T. denticola* [109,110], and strongly suggested to be present in *Leptospira* as well, where high-resolution cryo-EM maps of purified filaments show features compatible with saccharide moieties bound



Trends in Microbiology

Figure 3. Cross-sectional view of the flagellar filament from *Salmonella* and *Leptospira*. Schematic comparison highlighting the protein composition of (A) the *L. biflexa* endoflagellar filament adapted from Brady *et al.* [19]; vs (B) the *Salmonella* exoflagellar filament. Abbreviations: cryo-ET, cryo-electron tomography; PDB, Protein Data Bank accession number

to conserved Ser/Thr glycosylation sites in the sequence [19]. The FlaB proteins are likely exported via the flagellar protein export apparatus, as flagellins typically do.

The endoflagellar filaments exhibit a proteinaceous sheath that surrounds the FlaB flagellin core. Early on, one or two isoforms of FlaA proteins were identified as the constituents of such a sheath [40]. When present, the *FlaA1* and *FlaA2* isoforms are homologous, albeit displaying low sequence identity (<30%). The two genes form an operon [48], probably as a result of gene duplication and diversification. As shown in the heatmap, *Brevinema*, *Brachyspira*, *Treponema*, and *Spirochaeta* also have another FlaA isoform. Despite the relative low sequence identities, another *Leptospira* conserved protein-encoding gene exhibits similarities to FlaA1 and FlaA2, suggesting the presence of a third paralog in *Leptospira* spp. Further work is needed to check if the three isoforms are expressed and associated with the flagellar filament in these spirochetes.

Additional sheath proteins, FcpA and FcpB, have been identified more recently in *Leptospira* [16,17]. These two proteins are Leptospiraceae-specific (also found in *Turneriella* and *Leptonema*) (Figure 2), with no homology between the two, and with FcpA showing a novel protein fold previously absent in the entire Protein Data Bank. Both FcpA and FcpB are localized asymmetrically on the convex, and not on the concave, side of the curved filament [16–19]. The singularly asymmetric recruitment of all these sheath proteins, FlaAs and Fcps, plays a key role in enforcing the strong supercoiling that *Leptospira* filaments typically exhibit. It is worth stressing that such supercoiling is essential to normal flagellar function and cell motility [35]. The concave side of *Leptospira* filaments is composed of FlaA2 [18,19] and most likely FlaA1. *In vitro* pull-down assays have shown that FcpA interacts with FlaA2 and FlaB1 [111], which is consistent with our latest high-resolution cryo-EM data of assembled filaments [18,19]. Additional, yet poorly characterized, filament proteins of the sheath have been recently identified in *Leptospira*, such as FlaAP (FlaA2-associated protein) [19], and likely several other components still annotated as hypothetical proteins (Figure 3A). A FlaG-homolog is also found in some *Treponema* species [112], FlaG being present in numerous exoflagellated bacteria. All spirochetal sheath proteins are likely exported to the periplasmic space via the SecA secretion pathway, as their N-termini include signal peptide sequences.

Regulation of flagellar gene expression

Multiple checkpoints occur to efficiently coordinate flagellar gene expression with protein assembly during flagellar biogenesis. In *B. burgdorferi* only one sigma-factor (σ^{70} , also named SigA or RpoD) is present to transcribe flagellar genes [21]. Many of the flagellar genes appear to be constitutively expressed, and *B. burgdorferi* regulates the synthesis of some motility proteins at the post-transcriptional level [21,84] as described above. In this species, the earliest flagellar structures to be synthesized include the MS-ring, the C-ring, the stators, and the export apparatus. Their synthesis and successful assembly are, in turn, required for the transcription of other genes that encode the rod, the P-ring, and the hook proteins [95]. Notably absent from *Borrelia* spp. [21], the alternative σ^{28} factor FliA (also named RpoF), and its anti-sigma factor FlgM, are indeed expressed in other spirochetes, and likely involved in defining the transcriptional regulatory hierarchy of flagellar genes as in other bacteria [15] (Figure 2).

FliH and FliG, which are involved in the control of spatial and numerical regulation of bacterial flagella, also appear to play a role in the regulation of flagellar gene expression at the transcriptional and post-translational levels in *L. biflexa* and *B. burgdorferi*, respectively [113,114]. The Carbon Storage Regulator A (CsrA), together with the flagellar assembly protein FliW, are both present in Spirochaetes. These proteins usually regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to mRNA targets, and affecting mRNA stability and translation. It has been shown that CsrA acts as a regulator of the expression of *flaBs* in *Leptospira* and *B. burgdorferi* [115,116].

Finally, the second messengers, like c-di-GMP and other cyclic nucleotides, also play an important role in controlling motility in many spirochetes [117–120], in several cases regulating key protein–protein interactions. Much work is needed to uncover the details of the regulatory pathways in which cyclic nucleotides are involved in spirochetes, as well as the molecular mechanisms implicated that still remain unknown.

Concluding remarks and future perspectives

Since the *Trends in Microbiology* review from Pallen *et al.* in 2005 [103], which used the genome sequences of only three representative spirochetes (i.e., *B. burgdorferi* str. B31, *T. pallidum* subsp. *pallidum* str. Nichols, and *L. interrogans* serovar Lai str. 56601), we now have access to thousands of genome sequences and have made huge advances in understanding the structure and function of many components of spirochetal endoflagella, using protein crystallography, cryo-EM and genetic approaches.

The global architecture of the spirochetal endoflagellum is well conserved, and most of the individual flagellar protein components are indeed highly conserved among spirochetes. However, in this review we have found numerous and significant differences among the different spirochetal genera, which are likely linked to genus-specific morphological features such as the stiffness, length, and number of flagellar filaments, as well as their interaction with the cell body cylinder and the outer membrane. Swimming motility thus involves different variations of the endoflagellar-driven mechanism, as exhibited by *Treponema*, *Leptospira/Leptonema*, and *Borrelia* [39]. Spirochetes are a highly diverse group of bacteria (Box1) and their ability to adapt to different niches/habitats may have influenced the evolution of their genomes. For example, *T. pallidum* and *B. burgdorferi* have a minimal genome in comparison to *Leptospira* spp. (~1–1.5 Mb vs. ~4 Mb) and this might constitute an additional constraint with particular impact on the number of flagellar genes.

Continued efforts over the next few years will fill in the remaining gaps (see [Outstanding questions](#)). What are the molecular determinants that lead to filament asymmetry in *Leptospira*?

Outstanding questions

What are the evolutionary mechanisms that enabled flagella to be confined within the periplasm in spirochetes? Why do they not penetrate the outer membrane and elongate outside the cell, as in enterobacteria?

What molecular connections, if any, explain how the motor-generated torque, transmitted to the flagellar filament, induces undulation and/or deformation of the whole cell body, eventually propelling spirochetes with a forward thrust?

How do pathogenic spirochetes cross tissue barriers?

What are the mechanisms involved in regulating flagellar rotation in spirochetes, especially according to media exhibiting highly disparate viscosities?

What is the reason behind *Leptospira*'s greater complexity along most of its flagellar substructures compared to other bacteria, including other spirochetes?

Several spirochetal flagellar proteins, such as MotA, MotB, FliG, FlaA, FlaB, or FliN/FliY, show apparent redundancy in the form of several paralogous isoforms – is this actually the case?

What is the structural basis, and potential physiologic role, for filament asymmetry in *Leptospira* flagella? And what is the fundamental role for such a rich complexity in the composition of the sheath? Is this filament asymmetry shared in other spirochetes?

Is such asymmetry relevant to other spirochetes? Also, many flagellar proteins remain to be identified, including collar proteins in spirochetes other than *Borrelia*. Half (three out of six) of the recently identified collar or collar-associated proteins in *B. burgdorferi* [8,77,100,101] are not conserved in other spirochetes. Conversely, *Leptospira* exhibits a more complex filament architecture, with at least ten different proteins, instead of two in *B. burgdorferi* and five in *T. pallidum* and *B. hyodysenteriae*. Are there additional filament proteins to be identified in the latter organisms, or actual differences relating to disparate motility mechanisms waiting to be uncovered? We also observe some redundancy among flagellar proteins, such as in the cases of MotA, MotB, FliG, FlaB, etc; and an important focus for future studies will be to decipher whether the paralog proteins have distinct functions.

The success of spirochetes as pathogens is explained by their spiral shape and endoflagellar motility, which enable them to cross connective tissues and barriers very efficiently and swiftly, contributing to their escape from the host's immune system. A better knowledge of the moving function of the flagellar apparatus is essential to understanding the motility and the pathogenesis of these atypical bacteria, and also to enable novel strategies to treat or prevent these infectious diseases. It has been shown that the nonmotile attenuated *fcpA* mutant in *L. interrogans* is an attractive candidate for efficacious and universal vaccines protecting against leptospirosis in humans and animals [121].

Acknowledgments

This work was supported by ANR (Agence National de la Recherche) LEPTOMOVE (18-CE15-0027-01) and the Pasteur International Unit 'Integrative Microbiology of Zoonotic Agents' (IMIZA). We thank Ignacio Ferrés who contributed to the development of the pipeline used for the analysis of the sequences. Figures 1 and 3 were created with BioRender (publication licences XP24DAB17G and PV24CA4V47). We thank the reviewers for the valuable suggestions that improved the article. This work is part of the PhD of Fabiana San Martin and Lenka Fule.

Declaration of interests

No interests are declared.

References

1. Belas, R. (2014) Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 22, 517–527
2. Choi, Y. *et al.* (2013) Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4829–4837
3. Gonzalez, F. and Scharf, B.E. (2021) Identification of receptor binding proteins in flagellotropic *Agrobacterium* phage 7-7-1. *Viruses* 13, 1267
4. Smith, K.D. *et al.* (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4, 1247–1253
5. Johnson, S. *et al.* (2021) Molecular structure of the intact bacterial flagellar basal body. *Nat. Microbiol.* 6, 712–721
6. Chu, J. *et al.* (2020) Phylogenetic distribution, ultrastructure, and function of bacterial flagellar sheaths. *Biomolecules* 10, 363
7. Zhao, X. *et al.* (2014) Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry* 53, 4323–4333
8. Chang, Y. *et al.* (2021) Characterization of the flagellar collar reveals structural plasticity essential for spirochete motility. *mBio* 12, e0249421
9. Guo, S. *et al.* (2022) Fil ring enhances the function of periplasmic flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2117245119
10. Chang, Y. *et al.* (2020) Molecular mechanism for rotational switching of the bacterial flagellar motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 1041–1047
11. Lynch, M.J. *et al.* (2019) Structure and chemistry of lysinoalanine crosslinking in the spirochaete flagella hook. *Nat. Chem. Biol.* 15, 959–965
12. Miller, M.R. *et al.* (2016) Spirochaete flagella hook proteins self-catalyse a lysinoalanine covalent crosslink for motility. *Nat. Microbiol.* 1, 16134
13. Beeby, M. *et al.* (2016) Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stator rings using a conserved protein scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 E1917–1926
14. Li, C. *et al.* (2008) Genetic analysis of spirochete flagellin proteins and their involvement in motility, filament assembly, and flagellar morphology. *J. Bacteriol.* 190, 5607–5615
15. Li, C. *et al.* (2010) Differential regulation of the multiple flagellins in spirochetes. *J. Bacteriol.* 192, 2596–2603
16. Wunder Jr., E.A. *et al.* (2016) A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Mol. Microbiol.* 101, 457–470
17. Wunder, E.A.J. *et al.* (2018) FcpB is a surface filament protein of the endoflagellum required for the motility of the spirochete *Leptospira*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 130
18. Gibson, K.H. *et al.* (2020) An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the *Leptospira* spirochete. *eLife* 9, e53672
19. Brady, M.R. *et al.* (2022) Structural basis of flagellar filament asymmetry and supercoil templating by *Leptospira* spirochete sheath proteins. *bioRxiv* Published online March 3, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.03.03.482903>
20. Chang, Y. and Liu, J. (2019) Architecture and assembly of periplasmic flagellum. *Microbiol. Spectr.* 7, 10
21. Charon, N.W. *et al.* (2012) The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 349–370

22. Motaleb, M.A. *et al.* (2015) Spirochetal motility and chemotaxis in the natural enzootic cycle and development of Lyme disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 28, 106–113
23. Wolgemuth, C.W. (2015) Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 46, 104–112
24. Nakamura, S. (2020) Spirochete flagella and motility. *Biomolecules* 10, 550
25. Paster, B.J. (2020) Spirochaetes Garrity and Holt 2001. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 4) The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes* (Krieg, N.R. *et al.*, eds), pp. 471–563, Springer
26. Paster, B.J. and Dewhirst, F.E. (2000) Phylogenetic foundation of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 341–344
27. Caro-Quintero, A. *et al.* (2012) The chimeric genome of *Sphaerochaeta*: nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology. *mBio* 3 e00025-12
28. Canale-Parola, E. (1978) Motility and chemotaxis of spirochetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 69–99
29. Charon, N.W. *et al.* (2009) The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J. Bacteriol.* 191, 600–607
30. Izard, J. *et al.* (2008) Native cellular architecture of *Treponema denticola* revealed by cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.* 163, 10–17
31. Izard, J. *et al.* (2009) Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *J. Bacteriol.* 191, 7566–7580
32. Ge, Y. *et al.* (1998) Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180, 2418–2425
33. Charon, N.W. *et al.* (1991) The bent-end morphology of *Treponema phagedenis* is associated with short, left-handed, periplasmic flagella. *J. Bacteriol.* 173, 4820–4826
34. Li, C. *et al.* (2000) The spirochete FlaA periplasmic flagellar sheath protein impacts flagellar helicity. *J. Bacteriol.* 182, 6698–6706
35. Bromley, D.B. and Charon, N.W. (1979) Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 137, 1406–1412
36. Trueba, G.A. *et al.* (1992) Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 174, 4761–4768
37. Charon, N.W. *et al.* (1992) Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. *J. Bacteriol.* 174, 832–840
38. Motaleb, M.A. *et al.* (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10899–10904
39. Wadhwa, N. and Berg, H.C. (2022) Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 161–173
40. Charon, N.W. and Goldstein, S.F. (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu. Rev. Genet.* 36, 47–73
41. Kaiser, G.E. and Doetsch, R.N. (1975) Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature* 255, 656–657
42. Nakamura, S. *et al.* (2006) Improvement in motion efficiency of the spirochete *Brachyspira pilosicoli* in viscous environments. *Biophys. J.* 90, 3019–3026
43. Tahara, H. *et al.* (2018) The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: swimming and crawling. *Sci. Adv.* 4, eaar7975
44. Xu, J. *et al.* (2020) Crawling motility on the host tissue surfaces is associated with the pathogenicity of the zoonotic spirochete *Leptospira*. *Front. Microbiol.* 11, 1886
45. Kokubu, E. *et al.* (2021) Crawling motility of *Treponema denticola* modulated by outer sheath protein. *Microbiol. Immunol.* 65, 551–558
46. Romeis, E. *et al.* (2021) Genetic engineering of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, the syphilis spirochete. *PLoS Pathog.* 17, e1009612
47. Hyde, J.A. (2017) *Borrelia burgdorferi* keeps moving and carries on: a review of borrelial dissemination and invasion. *Front. Immunol.* 8, 114
48. Lambert, A. *et al.* (2012) FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect. Immun.* 80, 2019–2025
49. Sultan, S.Z. *et al.* (2015) Motor rotation is essential for the formation of the periplasmic flagellar ribbon, cellular morphology, and *Borrelia burgdorferi* persistence within kodes scapularis tick and murine hosts. *Infect. Immun.* 83, 1765–1777
50. Li, C. *et al.* (2010) Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FIG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity. *Mol. Microbiol.* 75, 1563–1576
51. Ng, H.M. *et al.* (2019) The role of *Treponema denticola* motility in synergistic biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 432
52. Lux, R. *et al.* (2001) Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* 69, 6276–6283
53. Harman, M.W. *et al.* (2012) The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3059–3064
54. Vig, D.K. and Wolgemuth, C.W. (2014) Spatiotemporal evolution of erythema migrans, the hallmark rash of Lyme disease. *Biophys. J.* 106, 763–768
55. Abe, K. *et al.* (2020) Implications of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion. *Sci. Rep.* 10, 13937
56. Rupprecht, T.A. *et al.* (2008) The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol. Med.* 14, 205–212
57. Lu, S. *et al.* (2021) Characterization of *Treponema pallidum* dissemination in C57BL/6 mice. *Front. Immunol.* 11, 577129
58. Wunder, E.A.J. *et al.* (2016) Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infect. Immun.* 84, 2105–2115
59. Radolf, J.D. *et al.* (2006) Pathogenesis of syphilis. In *Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology*, Caister Academic Press
60. Shaked, Y. *et al.* (1993) Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 17, 241–243
61. Cilla, G. *et al.* (2020) Presence of pathogenic *Leptospira* spp. in the reproductive system and fetuses of wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008982
62. Harter, C. and Benirschke, K. (1976) Fetal syphilis in the first trimester. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 124, 705–711
63. Ellis, W.A. (2014) Animal leptospirosis. In *Leptospira and Leptospirosis* (Adler, B., ed.), pp. 99–137, Springer
64. Selvarajah, S. *et al.* (2021) Leptospirosis in pregnancy: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009747
65. Sebastián, I. *et al.* (2021) Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 23, e13343
66. Nikaido, Y. *et al.* (2019) Transbronchial invasion and proliferation of *Leptospira interrogans* in lung without inflammatory cell infiltration in a hamster model. *Infect. Immun.* 87 e00727-19
67. Barocchi, M.A. *et al.* (2002) Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70, 6926–6932
68. Inagaki, S. *et al.* (2016) *Treponema denticola* invasion into human gingival epithelial cells. *Microb. Pathog.* 94, 104–111
69. Abby, S.S. and Rocha, E.P.C. (2012) The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet.* 8, e1002983
70. Minamino, T. (2014) Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1642–1648
71. Liu, R. and Ochmann, H. (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7116–7121

72. Ferreira, J.L. *et al.* (2019) γ -proteobacteria eject their polar flagella under nutrient depletion, retaining flagellar motor relic structures. *PLoS Biol.* 17, e3000165
73. Kaplan, M. *et al.* (2021) Loss of the bacterial flagellar motor switch complex upon cell lysis. *mBio* 12, e0029821
74. Rossmanna, F.M. and Beeby, M. (2018) Insights into the evolution of bacterial flagellar motors from high-throughput in situ electron cryotomography and subtomogram averaging. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 74, 585–594
75. Chaban, B. *et al.* (2018) Evolution of higher torque in Campylobacter-type bacterial flagellar motors. *Sci. Rep.* 8, 97
76. Chen, S. *et al.* (2011) Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J.* 30, 2972–2981
77. Xu, H. *et al.* (2020) BB0326 is responsible for the formation of periplasmic flagellar collar and assembly of the stator complex in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 113, 418–429
78. Chevance, F.F. *et al.* (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev.* 21 2326–2235
79. Zhu, S. *et al.* (2018) The *Vibrio* H-ring facilitates the outer membrane penetration of the polar sheathed flagellum. *J. Bacteriol.* 200 e00387–18
80. Halte, M. and M., E. (2021) Protein export via the type III secretion system of the bacterial flagellum. *Biomolecules* 11, 186
81. Qin, Z. *et al.* (2018) Cryo-electron tomography of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi* reveals a distinct cytoplasmic ATPase complex. *PLoS Biol.* 16, e3000050
82. Wand, M.E. *et al.* (2006) *Helicobacter pylori* FlhB function: the FlhB C-terminal homologue HP1575 acts as a 'spare part' to permit flagellar export when the HP0770 FlhBCC domain is deleted. *J. Bacteriol.* 188, 7531–7541
83. Lin, T. *et al.* (2015) Mutations in the *Borrelia burgdorferi* flagellar type III secretion system genes flhH and flhI profoundly affect spirochete flagellar assembly, morphology, motility, structure, and cell division. *mBio* 6 e00579–15
84. Guyard, C. *et al.* (2013) Periplasmic flagellar export apparatus protein, FlhH, is involved in post-transcriptional regulation of FlhB, motility and virulence of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermslii*. *PLoS One* 8, e72550
85. Raddi, G. *et al.* (2012) Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *J. Bacteriol.* 194, 1299–1306
86. Islam, S. *et al.* (2015) H⁺ and Na⁺ are involved in flagellar rotation of the spirochete *Leptospira*. *Biochim. Biophys. Res Commun.* 466, 196–200
87. Hall, A.N. *et al.* (2017) SwrD (Ylz) promotes swarming in *Bacillus subtilis* by increasing power to flagellar motors. *J. Bacteriol.* 200 e00529–17
88. Liu, J. *et al.* (2009) Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *J. Bacteriol.* 191, 5026–5036
89. Kaplan, M. *et al.* (2020) Bacterial flagellar motor PL-ring disassembly subcomplexes are widespread and ancient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 8941–8947
90. Henderson, L.D. *et al.* (2020) Diversification of Campylobacter jejuni flagellar C-ring composition impacts its structure and function in motility, flagellar assembly, and cellular processes. *mBio* 11 e02286–19
91. Lowenthal, A.C. *et al.* (2009) Functional analysis of the *Helicobacter pylori* flagellar switch proteins. *J. Bacteriol.* 191, 7147–7156
92. Fontana, C. *et al.* (2016) Analysis of a spontaneous non-motile and avirulent mutant shows that FIM is required for full endoflagella assembly in *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 11, e0152916
93. Liao, S. *et al.* (2009) Inactivation of the flfY gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates motility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol.* 9, 253
94. Tan, J. *et al.* (2021) Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. *Cell* 184, 2665–2679
95. Zhao, X. *et al.* (2013) Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14390–14395
96. Hirano, T. *et al.* (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* 312, 359–369
97. Xu, H. *et al.* (2021) BB0259 encompasses a peptidoglycan lytic enzyme function for proper assembly of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Front. Microbiol.* 12, 692707
98. Zhang, K. *et al.* (2012) A single-domain FlgJ contributes to flagellar hook and filament formation in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 194, 866–874
99. Motaleb, M.A. *et al.* (2011) A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* flhL mutant. *J. Bacteriol.* 193, 3324–3331
100. Moon, K.H. *et al.* (2016) Spirochetes flagellar collar protein FlhB has astounding effects in orientation of periplasmic flagella, bacterial shape, motility, and assembly of motors in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 102, 336–348
101. Moon, K.H. *et al.* (2018) A tetratricopeptide repeat domain protein has profound effects on assembly of periplasmic flagella, morphology and motility of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 110, 634–647
102. Sal, M.S. *et al.* (2008) *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J. Bacteriol.* 190, 1912–1921
103. Pallen, M.J. *et al.* (2005) Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol.* 13, 143–149
104. Al-Otaibi, N.S. *et al.* (2020) The cryo-EM structure of the bacterial flagellum cap complex suggests a molecular mechanism for filament elongation. *Nat. Commun.* 11, 3210
105. Zhang, K. *et al.* (2019) Analysis of a flagellar filament cap mutant reveals that HtrA serine protease degrades unfolded flagellin protein in the periplasm of *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 111, 1652–1670
106. Kennedy, M.J. *et al.* (1997) Characterization of flhA- and flhB-mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlhA and FlhB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 119–128
107. Lin, T. *et al.* (2012) Analysis of an ordered, comprehensive STM mutant library in infectious *Borrelia burgdorferi*: insights into the genes required for mouse infectivity. *PLoS One* 7, e47532
108. Yonekura, K. *et al.* (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424, 643–650
109. Wyss, C. (1998) Flagellins, but not endoflagellar sheath proteins, of *Treponema pallidum* and of pathogen-related oral spirochetes are glycosylated. *Infect. Immun.* 66, 5751–5754
110. Kurniyati, K. *et al.* (2017) A novel glycan modifies the flagellar filament proteins of the oral bacterium *Treponema denticola*. *Mol. Microbiol.* 103, 67–85
111. Sasaki, Y. *et al.* (2018) Leptospiroflagellar sheath protein FcpA interacts with FlhA2 and FlhB1 in *Leptospira biflex*. *PLoS One* 13
112. Kurniyati, K. *et al.* (2019) A pleiotropic role of FlhG in regulating the cell morphogenesis and flagellar homeostasis at the cell poles of *Treponema denticola*. *Cell. Microbiol.* 21, e12886
113. Zhang, K. *et al.* (2020) FlhF regulates the number and configuration of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 113, 1122–1139
114. Fule, L. *et al.* (2021) Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira*. *Mol. Microbiol.* 116, 1392–1406
115. Phoka, T. *et al.* (2021) Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in *Leptospira* spp. *PLoS One* 16, e0260981
116. Sze, C.W. *et al.* (2011) Carbon storage regulator A (CsrA(Bb)) is a repressor of *Borrelia burgdorferi* flagellin protein FlhB. *Mol. Microbiol.* 82, 851–864
117. Pitzer, J.E. *et al.* (2011) Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect. Immun.* 79, 1815–1825
118. Thibeaux, R. *et al.* (2020) The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *NPJ Biofilms Microbiomes* 6, 24

119. Bian, J. *et al.* (2013) Inactivation of cyclic Di-GMP binding protein TDE0214 affects the motility, biofilm formation, and virulence of *Treponema denticola*. *J. Bacteriol.* 195, 3897–3905
120. Xu, J. *et al.* (2022) Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium. *Sci. Rep.* 12, 6825
121. Wunder, E.A. *et al.* (2021) A live attenuated-vaccine model confers cross-protective immunity against different species of the *Leptospira* genus. *eLife* 10, e64166
122. Eddy, S.R. (2011) Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002195
123. Seemann, T. (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 15, 2068–2069
124. Chaumeil, P.A. *et al.* (2020) GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36, 1925–1927
125. Yu, G. *et al.* (2018) Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using Ggtree. *Mol. Biol. Evol.* 35, 3041–3043

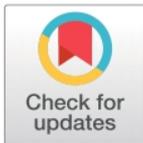
Annexe 2 : Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in *Leptospira* spp

RESEARCH ARTICLE

Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in *Leptospira* spp.Theerapat Phoka¹, Lenka Fule², Juliana Pipoli Da Fonseca³, Thomas Cokelaer^{3,4}, Mathieu Picardeau^{2‡}, Kanitha Patarakul^{5,6‡*}

1 Medical Microbiology, Interdisciplinary and International Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, **2** Institut Pasteur, Biology of Spirochetes Unit, French National Reference Centre for Leptospirosis, Paris, France, **3** Plate-forme Technologique Biomics, Centre de Ressources et Recherches Technologiques (C2RT), Institut Pasteur, Paris, France, **4** Hub de Bioinformatique et Biostatistique – Département Biologie Computationnelle, Institut Pasteur, Paris, France, **5** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand, **6** Chula Vaccine Research Center (Chula VRC), Center of Excellence in Vaccine Research and Development, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

‡ These authors are joint senior authors on this work

* kanitha.pa@chula.ac.th, kpatarakul@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Phoka T, Fule L, Da Fonseca JP, Cokelaer T, Picardeau M, Patarakul K (2021) Investigating the role of the carbon storage regulator A (CsrA) in *Leptospira* spp.. PLoS ONE 16(12): e0260981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981>

Editor: Brian Stevenson, University of Kentucky College of Medicine, UNITED STATES

Received: July 31, 2021

Accepted: November 20, 2021

Published: December 13, 2021

Copyright: © 2021 Phoka et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [S1–S6 Figs](#), [S1 File](#), [S1–S3 Tables](#) files.

Funding: This work is part of the PhD thesis of T. P., who received financial support from the 100th Anniversary Chulalongkorn University for Doctoral Scholarship and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund)*. K.P. is partly supported by Chulalongkorn University GB-CU-61-12-30-02 and Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (Matching fund), Faculty of

Abstract

Carbon Storage Regulator A (CsrA) is a well-characterized post-transcriptional global regulator that plays a critical role in response to environmental changes in many bacteria. CsrA has been reported to regulate several metabolic pathways, motility, biofilm formation, and virulence-associated genes. The role of *csrA* in *Leptospira* spp., which are able to survive in different environmental niches and infect a wide variety of reservoir hosts, has not been characterized. To investigate the role of *csrA* as a gene regulator in *Leptospira*, we generated a *L. biflexa* *csrA* deletion mutant ($\Delta csrA$) and *csrA* overexpressing *Leptospira* strains. The $\Delta csrA$ *L. biflexa* displayed poor growth under starvation conditions. RNA sequencing revealed that in rich medium only a few genes, including the gene encoding the flagellar filament protein FlaB3, were differentially expressed in the $\Delta csrA$ mutant. In contrast, 575 transcripts were differentially expressed when *csrA* was overexpressed in *L. biflexa*. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) confirmed the RNA-seq data in the $\Delta csrA$ mutant, showing direct binding of recombinant CsrA to *flaB3* mRNA. In the pathogen *L. interrogans*, we were not able to generate a *csrA* mutant. We therefore decided to overexpress *csrA* in *L. interrogans*. In contrast to the overexpressing strain of *L. biflexa*, the overexpressing *L. interrogans* strain had poor motility on soft agar. The overexpressing strain of *L. interrogans* also showed significant upregulation of the flagellin *flaB1*, *flaB2*, and *flaB4*. The interaction of *L. interrogans* rCsrA and *flaB4* was confirmed by EMSA. Our results demonstrated that CsrA may function as a global regulator in *Leptospira* spp. under certain conditions that cause *csrA* overexpression. Interestingly, the mechanisms of action and gene targets of CsrA may be different between non-pathogenic and pathogenic *Leptospira* strains.

Medicine, Chulalongkorn University. This research was also supported by ANR LEPTOMOVE (18-CE15-0027-01) to M.P. We thank the Biomix Platform, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France, supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09-09) and IBISA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Leptospira spp. are gram-negative, spiral-shaped bacteria categorized into non-pathogenic and pathogenic strains. Non-pathogenic *Leptospira* spend their entire life in the natural environment. Pathogenic *Leptospira* can survive in the environment and cause leptospirosis in susceptible hosts. It is estimated that 1 million people suffer from severe leptospirosis each year and there are approximately 60,000 deaths, mostly in developing tropical countries [1].

The ability to survive in a wide range of environments is crucial for both pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp. The pathogenic strains have to complete the zoonotic cycle to live in distinct habitats, including survival in aqueous or terrestrial environment [2], kidneys of their reservoir hosts [3], or target organs of their susceptible hosts [4]. Most transmission occurs when people are exposed to water and soil contaminated by urine of reservoir animals. *Leptospira* can then enter in the host through abraded skin or mucous membrane followed by hematogenous spread to the target organs. The mechanism underlying the long-term survival of pathogenic *Leptospira* under nutrient-poor conditions is not completely understood but biofilm formation may play an important role [5, 6]. Furthermore, omics studies revealed the changes in gene expression profiles in *Leptospira* in response to different environmental conditions such as temperature shift [7], physiologic osmolarity [8], serum exposure [9], iron limitation [10], *in vivo* cultivation on dialysis membrane chamber [11], and in the presence of biofilm [12]. These transcriptome studies highlighted the role of global gene regulation which is a crucial process employed by the bacteria to deal with the changes in the environment. However, due to the lack of efficient genetic manipulation, knowledge of gene regulation is not well understood in *Leptospira* spp. Some regulators have been characterized such as the peroxidase stress regulator PerR [10], the KdpE sensor potassium transport activator [13], DNA repair LexA [14], the sigma factor RpoN [15, 16] and, more recently, the pathogen-specific two-component system LvrAB [17]. Besides these regulators, all leptospiral genomes also possess a gene that encodes the putative CsrA [18–20].

Carbon Storage Regulator A (CsrA) (or its homolog RsmA) is one of the most studied RNA binding proteins in bacteria [21]. This protein is widely conserved in more than 1,500 bacterial species. A transposon mutant of *csrA* in *Escherichia coli* was first reported to display pleiotropic phenotypes including alteration in glycogen accumulation, adhesion ability, and cell size compared to the wild type strain [22]. Due to substantial pleiotropic effects, several omics studies have reported the effect of CsrA on global transcriptomic changes [23–33] (Table 1), showing that CsrA is a global regulator in both gram-positive and gram-negative bacteria. CsrA regulates gene expression at the post-transcriptional level by binding to mRNA targets, and affects mRNA stability and translation [34]. This protein could negatively or positively regulate mRNA expression. For negative regulation, CsrA binds to the Shine-Dalgarno region and prevents ribosome access to the targeted mRNA thus blocks the translation process of the bacteria [35–37]. In addition, CsrA may bind to mRNA targets that overlaps the start codon [38]. For positive regulation, CsrA binds to mRNA target and prevents the target from being cleaved by the RNase [39, 40]. In *E. coli*, the consensus sequence of the CsrA binding site is 5' RUA-CARGGAUGU' 3 where the GGA motif is located in a hairpin loop which is a critical binding site for CsrA [41]. The involvement of CsrA in the regulation of various bacterial processes has been reported including carbon metabolism [42], motility [40], biofilm formation [43], quorum sensing [44], stress response [45], as well as virulence-associated traits such as iron acquisition [46], invasion [47], and type III secretion [48].

Among the phylum of Spirochaetes, CsrA was extensively studied in *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease. The *csrA* mutant of *B. burgdorferi* showed that there was a decrease in the expression of some virulent-associated proteins and attenuation in the mouse

Table 1. Comparison of differentially expressed genes in *csrA* mutants.

Bacterial species	Phylum	Differentially expressed genes (DEGs)		Criteria for DEGs	Reference
		up	down		
<i>Leptospira biflexa</i>	Spirochaetes	2	2	$\log_2FC > 0.5$ padj < 0.05	This study
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Spirochaetes	86	153	$\log_2FC > 1$ and padj < 0.05	[23]
<i>Erwinia amylovora</i>	Proteobacteria	317	487	\log_2FC value ≥ 1 and a corrected p-value < 0.05	[24]
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655	Proteobacteria	530	390	$\log_2FC > 0.5$ and padj < 0.05	[25]
<i>Escherichia coli</i> (EHEC) O157:H7	Proteobacteria	641	703	$FC \geq 3$ and p-values < 0.05	[26]
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Proteobacteria	97	36	$\log_2FC \geq 2$ and corrected p-value of ≤ 0.05	[27]
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ¹	Proteobacteria	132	283	$\log_2FC > 0.8$ and FDR < 0.05	[28]
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteobacteria	386	326	$FC > 2$ and padj value < 0.05	[29]
<i>Helicobacter pylori</i>	Proteobacteria	3	50	$FC > 1.5$ and p-values < 0.05	[30]
<i>Legionella pneumophila</i>	Proteobacteria	236	195	$FC > 1.5$ and p-values < 0.05	[31]
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	Proteobacteria	323	523	FDR threshold of 5%	[33]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Firmicutes	240	312	FDR < 0.001 and normalized fold_-change ≥ 2	[32]

¹Significant change in protein coding RNA in LB medium.

FC, Fold change, FDR, False discovery rate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.t001>

model [49], but these data were not confirmed by another study [50]. CsrA also acts as a repressor of the flagellin protein FlaB [51]. RNA sequencing (RNA-seq) showed that 13% of the genes were differentially expressed in the *csrA* mutant [23].

Our objective was to investigate the role of CsrA in *Leptospira* spp. We generated a *csrA* deletion mutant and *csrA* overexpressing strains to answer this question. In non-pathogenic *L. biflexa*, *csrA* was required for growth under starvation conditions. RNA-seq revealed that in rich-nutrient conditions, deletion of *csrA* had minimal impact on global gene regulation. We showed that CsrA is a repressor of flagellin transcripts but no alteration of motility phenotype in both deletion mutant and overexpressing strains was observed. In the pathogen *L. interrogans*, overexpression of *csrA* resulted in motility defect and CsrA could bind to flagellin transcripts. Our results demonstrated that the mechanisms of action and gene targets of CsrA appear to be different between pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* strains.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Leptospira spp. were grown in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (Difco) at 30°C or 1% agar of solid EMJH at 30°C. The saprophyte *Leptospira biflexa* serovar Patoc strain Patoc1 and the pathogen *Leptospira interrogans* serovar Manilae strain L495 were obtained from the French National Reference Center (NRC) for Leptospirosis (Institut Pasteur, Paris, France). *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C. When needed, an appropriate antibiotic was added to the culture medium. Bacterial strains are listed in Table 2.

For growth curves, the bacteria were grown in EMJH medium until the culture reached exponential phase ($OD_{420} \sim 0.1$ to 0.2 or 2.5×10^8 cells/mL). Then, 2×10^6 bacteria were added into 10 mL of EMJH medium. The cultures were incubated at 30°C, at 30°C with 100 rpm shaking or at 37°C with 200 rpm shaking. One mL of each culture was taken for OD_{420} measurement every 24 h. In order to perform a growth curve in diluted EMJH, *Leptospira* cells

Table 2. Bacterial strains used in this study.

Strain	Antibiotic Selection	Description
WT <i>L. biflexa</i> serovar Patoc	No	Control strain
WT <i>L. biflexa</i> serovar Patoc + pMaORI	Spectinomycin 50 mg/mL	Control strain with empty replicative plasmid
WT <i>L. biflexa</i> serovar Patoc + pMaORI_PcsrA _{ib}	Spectinomycin 50 mg/mL	Overexpressing strain with Prom _{flgN-flgK-flgL-fliW-csrA} <i>csrA</i>
Δ <i>csrA</i> <i>L. biflexa</i> serovar Patoc	No (for selection: Kanamycin 100 mg/mL)	<i>csrA</i> deletion mutant
Δ <i>csrA</i> <i>L. biflexa</i> serovar Patoc + pMaORI_PcsrA _{ib}	Spectinomycin 50 mg/mL	Complemented strain with Prom _{flgN-flgK-flgL-fliW-csrA} <i>csrA</i>
Δ <i>csrA</i> <i>L. biflexa</i> serovar Patoc + pMaORI	Spectinomycin 50 mg/mL	Control strain with empty replicative plasmid
<i>L. interrogans</i> serovar Manilae WT	No	Control strain
<i>L. interrogans</i> serovar Manilae WT + pMaORI_PcsrA _{ii}	Spectinomycin 50 mg/mL	Overexpressing strain with Prom _{flgN-flgK-flgL-fliW-csrA} <i>csrA</i>
<i>L. interrogans</i> serovar Manilae WT + pMaORI	Spectinomycin 50 mg/mL	Control strain with empty replicative plasmid
<i>E. coli</i> DH5 α	No	Strain for cloning and plasmid amplification
<i>E. coli</i> TOP10 thermo	No	Strain for cloning and plasmid amplification
<i>E. coli</i> BL-21(DE3) pLysS	No	Strain for recombinant protein production
<i>E. coli</i> β 2163	No	Donor strain for conjugation with <i>Leptospira</i> spp.
<i>E. coli</i> P1	No	Strain for plasmid amplification

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.t002>

were prepared as described above before inoculation into 1/5 EMJH medium diluted in sterile water.

Allelic exchange mutagenesis of leptospiral *csrA*

A *L. biflexa* *csrA* deletion mutant was generated by allelic exchange. Briefly, a plasmid containing a kanamycin resistance cassette was used to replace the coding sequence of *csrA*, LEPBIA3210, and 0.8 kb sequences that flanked the target gene was synthesized by GeneArt (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), pretreated by UV, and used to transform *L. biflexa* as previously described [52]. A similar strategy was performed for the *csrA* homolog, LIMLP_17575, in *L. interrogans* serovar Manilae. The map of each suicide plasmid is shown in S1 Fig.

To check for a double crossing-over event among the kanamycin-resistant colonies of *L. biflexa*, genomic DNA was isolated from exponential phase cultures using a Maxwell 16 cell DNA purification kit and a Maxwell instrument (Promega, Madison, WI), and PCR was performed on DNA extracts with the following primer pairs: 1) Flk_L and Flk_R, and 2) ORF_L and ORF_R.

Construction of the plasmids and *E. coli* β 2163 conjugation with *Leptospira* spp.

To construct the plasmids for complementation and overexpression, the *L. biflexa* and *L. interrogans* *csrA* genes were cloned into 2 different vectors. We first cloned *csrA* in pMaGro [53] in front of a strong promoter *groES*. We also synthesized a transcription fusion of *csrA* with a promoter of operon *flgN-flgK-flgL-fliW-csrA* by GeneArt (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). This fusion was cloned into the SacI and XbaI sites of pMaORI [54]. All pMaORI constructs are shown in S2 Fig.

Conjugation was performed as previously described [55]. Briefly, *E. coli* β 2163 containing plasmid of interest was incubated with log-phase *Leptospira* on a membrane filter and placed on EMJH plate supplemented with 0.3 mM diaminopimelic acid and incubated for 16–20 h at 30°C. The bacteria were then resuspended in EMJH and spread onto EMJH solid agar plates supplemented with 50 μ g/mL spectinomycin. The plates were incubated at 30°C until

leptospiral colonies were observed, approximately 1 week for *L. biflexa* and 2 weeks for *L. interrogans*.

RNA purification and RT-qPCR

RNA isolation was performed as previously described [56]. Briefly, *Leptospira* spp. were grown until the growth reached exponential phase, $OD_{420} \sim 0.1$ to 0.2 or $\sim 2.5 \times 10^8$ cells/mL. The cells were harvested and RNA was extracted using TRIZOL reagent (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) as previously described [56]. RNA pellets were resuspended in UltraPure Dnase/Rnase Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific). Genomic DNA was removed by DNase treatment using the RNase-free Turbo DNA-free turbo kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The 500 ng of RNA were used for cDNA synthesis using iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was performed using SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad). The results were expressed as the normalized difference of the threshold cycle ($\Delta\Delta CT$), using *cysK* and *lipL32* as a reference gene for *L. biflexa* and *L. interrogans*, respectively. All primers are listed in [S1 Table](#).

RNA-sequencing

As previously described [57], RNA integrity was examined using the RNA 6000 Nano kit with the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Wilmington, DE) and all samples used for constructing the library had RNA Integrity Number (RIN) scores >8 .

The QIAseq FastSelect -5S/16S/23S kit (QIAGEN) was used to deplete ribosomal RNA according to the manufacturer's instructions. The libraries were built using the TruSeq Stranded mRNA library Preparation Kit (Illumina, USA) following the QIAseq Fastselect -5S/16S/23S protocol recommendations. Quality control of the libraries was made on the Fragment Analyzer. The sequencing of the libraries was performed on the Illumina NextSeq 500 platform using single-end 150bp format. The RNA-seq analysis was performed with Sequana (version 0.9.6) [58]. In particular, we used the RNA-seq pipeline (version 0.9.20, https://github.com/sequana/sequana_rnaseq). The differential expression analysis testing included normalization conducted with DESeq2 [59, 60]. For each comparison, a p-value adjustment (padj) was performed to take into account multiple testing indicating the significance (Benjamini-Hochberg adjusted p-values [61], $FDR < 0.05$) and the effect size (fold-change) for each comparison. Genes with an adjusted p-value (padj) lower than 0.05 and a \log_2FC higher or lower than 0.5 were considered differentially expressed. These datasets were deposited into the ArrayExpress database at EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under the accession number E-MTAB-10396.

Measurement of motility, cell length, and velocity

The motility was checked on 0.6% semisolid EMJH medium. Exponential-phase *Leptospira* were diluted in EMJH to obtain $OD_{420} = 0.1$ as a starter culture. A small divot was gouged into the agar surface into which 2 μ L or 5 μ L of the inoculum was pipetted. The plates were incubated for 1 week for *L. biflexa* and 2 weeks for *L. interrogans*. The diameter of the zone for each colony was measured to the nearest millimeter.

For cell length and velocity measurement, late exponential-phase cultures ($OD_{420} \sim 0.5$) were diluted in EMJH broth to obtain an appropriate number of cells per field for visualization under a dark-field microscope. For cell length, approximately 100 cells per strain were measured in randomly selected fields by using cellSens software (Olympus, Hamburg, Germany). Velocity measurement was performed by video microscopy as described previously [6].

Approximately 70 cells per strain were recorded over 60 s. Trajectory analysis and speed displacement were calculated using Olympus CellSens software. Statistical analysis of motility, cell length, and velocity was performed using an Unpaired T-Test (Prism 5.03, GraphPad Software). A p-value < 0.05 was defined as statistically significant.

Recombinant protein production

PCR products of full sequences of *csrA* amplified from *L. biflexa* serovar Patoc or *L. interrogans* serovar Manilae genomic DNA were cloned into pRSET-C (Invitrogen). The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α and verified by DNA sequencing (Macrogen., South Korea). Recombinant proteins with N-terminus 6 \times His tag was induced in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS by 1 mM IPTG at 37°C for 4 h. The pelleted bacteria were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and disrupted using a high-pressure homogenizer (Constant System Ltd., Northants, UK). The soluble fraction was isolated by centrifugation at 15000 \times g at 4°C for 30 min. Protein samples were purified using Ni Sepharose columns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and dialyzed with PBS pH 7.4. To check for the purity of the purified recombinant proteins, the proteins were subjected to 15% Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with blocking buffer (1% BSA in PBS pH 7.4 plus 0.05% Tween 20, PBST) before the anti-6 \times His tag monoclonal antibody (1:5000; KPL, MD, USA) was added. The membranes were further incubated with the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (secondary antibody). All incubations were performed at room temperature for 1 h. After incubation, washing step was performed with PBST three times for 5 min each. Amersham ECL (GE Healthcare), an HRP substrate, was added and incubated for 1 min at room temperature before the membrane was exposed to a CCD camera (Bio-Rad) for chemiluminescent signal reading.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

All RNA probes were synthesized (Thermo Fisher Scientific) as follows, LEPBIA_1872 WT 5' UGGACACACAGGAGGGUGUGAC' 3, LEPBIA_1872 Mut 5' UGGACACACAAAAGGGUGUGAC' 3, and LIMLP_07475 5' AUCGGAUUC AAGGAGGAACCGA' 3.

EMSA was performed according to the manual of LightShift™ EMSA Chemiluminescent RNA Kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly, the binding reaction was prepared. Each binding reaction consisted of 1X binding buffer (10mM HEPES pH 7.3, 20 mM KCL, 1 mM MgCl₂, and 1 mM DTT) 1 nM of biotinylated-RNA (LEPBIA_1872 WT, LEPBIA_1872 Mut, or LIMLP_07475), 7.5% glycerol, 10 mM DTT, 0.2 μ g/ μ L Yeast tRNA, and various concentrations of rCsrA in a total volume of 20 μ L. The binding reaction was incubated at 37°C for 30 min. After incubation, loading buffer was added into each reaction and separated on 10% native PAGE for 1 h at 100V. The reaction was transferred onto a nylon membrane, cross-linked with UV for 1 min, blocked for 15 min with a blocking buffer, and washed once with washing buffer. A 1:300 stabilized Streptavidin-HRP in a blocking buffer was added and incubated for 15 min. The membrane was washed 5 times with washing buffer and incubated for 5 min with a substrate equilibration buffer. The membrane was incubated for 5 min in HRP substrate before chemiluminescent signal reading. For competitive EMSA assay, the binding reaction was prepared as described above except rCsrA concentration was fixed at 800 nM while unlabeled RNA (LIMLP_07475) was added to the solution at the final concentrations ranged from 0.8 nM to 8 μ M (10-fold serial dilution).

Results

Genetic organization of the *csrA* locus in *L. interrogans* and *L. biflexa*

The *csrA* locus is conserved in the pathogen *L. interrogans* serovar Manilae and the saprophyte *L. biflexa* serovar Patoc; the *csrA* forms with the flagellar genes to develop an operon-like structure (Fig 1A). This operon consists of 5 consecutive genes: *flgN*, *flgK*, *flgL*, *fliW* and *csrA*. The genes *flgK* and *flgL* encode putative flagellar hook-associated proteins, and *flgN* encodes a putative chaperone for FlgK and FlgL. The gene *fliW* encodes a putative post-transcriptional regulator of flagellin. There is a 200-bp intergenic region located upstream of *flgN*, the first gene of the operon, suggesting that there is a putative promoter region. The CsrA of *L. biflexa* and *L. interrogans* share >88% sequence identity, while both share ~50–60% similarity compared with CsrA from other bacteria. The amino acid alignment of leptospiral CsrA shows conserved sequences (highlighted in yellow) and 2 domains (in square boxes) reported as critical for RNA binding in *E. coli* [62] (Fig 1B). In addition, leptospiral CsrA is slightly longer than that of other bacteria due to additional C-terminal amino acid residues.

Allelic exchange mutagenesis and complementation of *csrA* in *L. biflexa*

In this study, the suicide plasmids containing the *L. biflexa* *csrA* and *L. interrogans* *csrA* were disrupted by a kanamycin-resistance cassette (*Km^R*) and transformed in saprophyte *L. biflexa* and the pathogen *L. interrogans*, respectively. Transformant colonies were only obtained in *L. biflexa*. We were unable to get transformant colonies from *L. interrogans* after 5 attempts. Among the 16 randomly selected kanamycin-resistant colonies of *L. biflexa*, 5 (31%) produced a ~2.6 kb PCR product with Flk primers which indicated that *csrA* was successfully replaced with kanamycin-cassette by a double crossing-over event; for the other colonies, the kanamycin-cassette was successfully replaced by a single cross-over event (Fig 2A and S3A Fig). To further confirm the deletion of *csrA* in the double-crossover mutants, primers ORF-R and ORF-L were also used. While the WT produced the expected size of 199-bp PCR product, approximately 1-kb PCR products were obtained from the transformants with allelic exchange (S3B Fig). These results indicated that there was a successful allelic exchange of *csrA* in *L. biflexa* which was designated as $\Delta csrA$.

In order to complement the $\Delta csrA$, our first attempt was to express the wild-type *csrA* under a strong promoter of *Leptospira*, *P_{groES}*, but no transconjugant was obtained. We

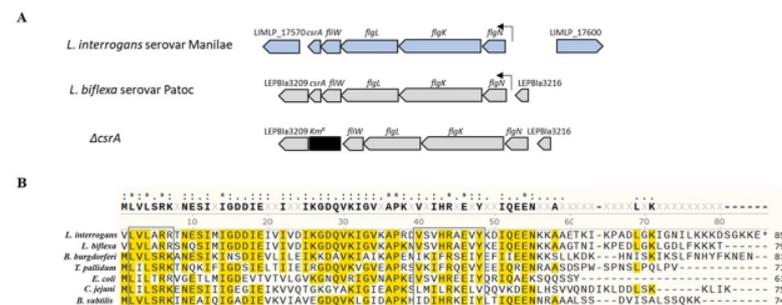


Fig 1. *csrA* operon in *Leptospira* spp. (A) A genetic organization of *csrA* in *Leptospira* spp. The arrangement of the genes in the *csrA* operon in *L. interrogans*, *L. biflexa*, and *L. biflexa* $\Delta csrA$ are shown. (B) The alignment of the amino acid sequences of CsrA in *L. biflexa* serovar Patoc and *L. interrogans* serovar Manilae strains used in this study was performed in comparison with CsrA from other bacteria. (*) represents conserved amino acid and the square boxes indicate conserved residues that are important for RNA binding in *E. coli* [62]. Sequences highlighted in yellow indicate the conserved residues.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g001>

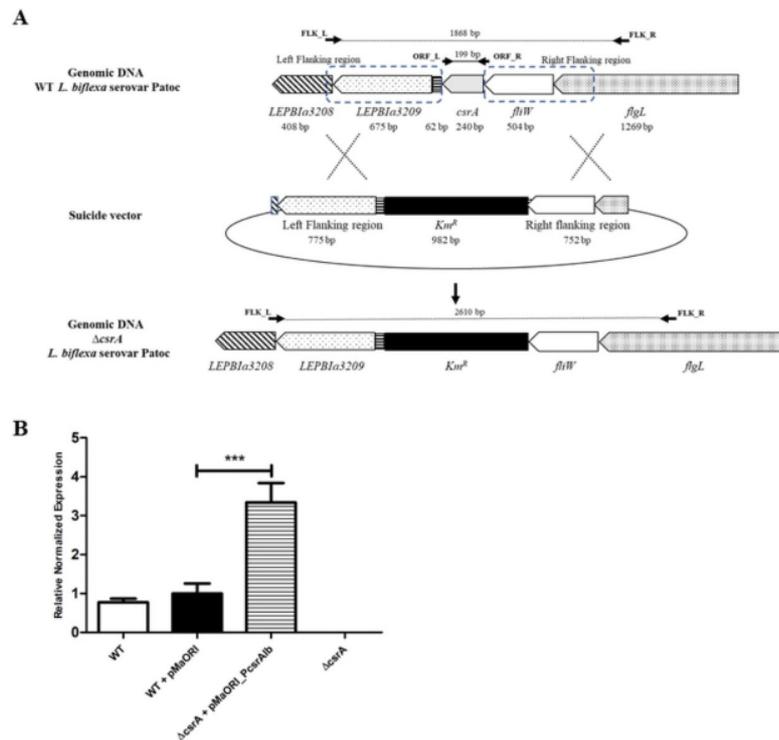


Fig 2. Allelic exchange of *csrA* in *L. biflexa*. (A) Schematic representation of homologous recombination. To generate a *csrA* mutant, *L. biflexa* serovar Patoc was electroporated with a suicide vector containing the *csrA* locus where *csrA* was replaced by a kanamycin resistance cassette (*Km^R*). Genes and non-coding regions with their sizes (bp) are indicated. The flanking regions of *csrA* used for homologous recombination are indicated by the dashed line square. Arrows indicate primers used for the confirmation of double crossing-over events. (B) *csrA* expression in *L. biflexa* strains was determined by RT-qPCR. Results obtained from 3 independent cultures were presented as relative fold changes \pm SEM using *cysK* gene for normalization. (***) indicates p-value < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g002>

hypothesized that the excess level of CsrA may be toxic to *Leptospira*. Therefore, we expressed *csrA* under the control of its native promoter, which is the promoter of the operon containing *flgN*, *flgK*, *flgL*, *fliW*, and *csrA* (Fig 1A). The resulting plasmid was used for complementation in Δ *csrA*. RT-qPCR revealed that the relative fold change of *csrA* in the complemented strain (Δ *csrA*+pMaORI_P*csrA*_{lb}) was 3.33-fold higher compared with WT+pMaORI (Fig 2B), indicating overexpression of *csrA*. In addition, RT-qPCR was unable to detect the expression of *csrA* in the Δ *csrA*+pMaORI, confirming the successful deletion of *csrA* in *L. biflexa*.

Phenotype analysis of the Δ *csrA* *L. biflexa*

Effects of *csrA* on growth and motility. The growth curve of WT, Δ *csrA*, and Δ *csrA* +pMaORI_P*csrA*_{lb} in regular EMJH were comparable (Fig 3A), suggesting that *csrA* was not essential for growth in *L. biflexa*. However, we found that Δ *csrA* displayed poor growth in 5-fold diluted EMJH compared to the WT (Fig 3B). Complementation of the Δ *csrA* partially restored the wild-type phenotype under starvation conditions (Fig 3B).

We performed soft agar assays to determine the motility of Δ *csrA*, but we did not find any differences between WT and Δ *csrA* (Fig 3C). Consistent with soft agar results, we did not find any difference in cell length or velocity in liquid EMJH between WT and Δ *csrA* (Fig 3D and

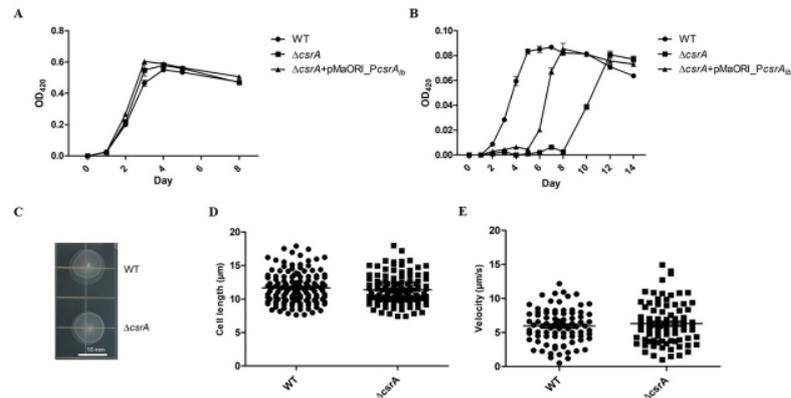


Fig 3. Phenotype analysis of the $\Delta csrA$ *L. biflexa*. To investigate the effect of *csrA* on growth, 2×10^6 cells of each bacterial strain were grown in 10 mL of (A) regular EMJH and (B) 5-fold diluted EMJH. OD₄₂₀ measurement for growth was performed every 24 h. Results obtained from 3 independent experiments are expressed as Mean \pm SEM. (C) Soft agar assay of WT and $\Delta csrA$. *Leptospira* were inoculated onto 0.6% semisolid EMJH plate and incubated at 30°C for one week before measuring the diameter of each colony. The late exponential phase of *Leptospira* grown in EMJH medium were measured for (E) cell length and (D) velocity under a dark-field microscope using cellSens software (OLYMPUS).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g003>

3E). In addition, the motility behavior of $\Delta csrA$ observed under the dark-field microscope was similar to WT (data not shown).

RNA-sequencing. To investigate the role of *csrA* as a global gene regulator in *L. biflexa*, RNA-seq was performed on exponential-phase cultures of WT, $\Delta csrA$, and $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{1b}$. With $\log_2FC > \pm 0.5$ and $p_{adj} < 0.05$ as the criteria for differentially expressed gene (DEG), only 3 genes, not including *csrA*, were differentially expressed in $\Delta csrA$ compared with the WT strain which is accounting for less than 0.1% of total ORF (3 in 3730) (Fig 4A, Table 3 and S2 Table). Two genes were significantly upregulated in $\Delta csrA$; *LEPBIa_1872* (encodes a flagellin protein FlaB3), and *LEPBIa_0812* (encodes putative acyltransferase) by 2.331-, and 1.423-fold, respectively, while *LEPBIa_0979* (encodes oligopeptidase A) was 0.668-fold downregulated (Table 3). Furthermore, the level of *LEPBIa_1872* was restored to WT level of $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{1b}$, suggesting that *LEPBIa_1872* should be a specific gene

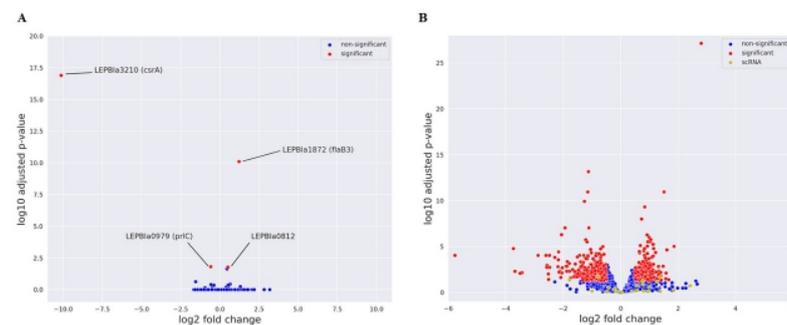


Fig 4. RNA-sequencing. The up- and downregulated genes in $\Delta csrA$ or $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{1b}$ compared with WT are shown in the Volcano analysis. (A) Comparison between $\Delta csrA$ and WT and (B) Comparison between $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{1b}$ and WT. Red dots indicated up- or downregulated genes with $\log_2FC > \pm 0.5$ and adjusted p-value (p_{adj}) < 0.05 . Representative genes are labeled. Blue and yellow dots indicate non-differentially expressed genes and scRNA, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g004>

Table 3. Selected differentially expressed genes in Δ csrA and Δ csrA+pMaORI_PcsrA₁₀ compared to WT.

ORF ID ^a	Gene ^a	Product ^a	COGs ^a	Δ csrA vs WT FC	Δ csrA vs WT padj	Δ csrA vs WT padj	Δ csrA vs WT padj	Δ csrA vs Δ csrA+pMaORI_PcsrA ₁₀ FC	Δ csrA vs Δ csrA+pMaORI_PcsrA ₁₀ padj	Δ csrA vs WT FC	FC (RT-qPCR) ^b
LEPBIa1872	<i>flaB3</i>	Flagellar filament 35 kDa core protein	N	2.331	7.95E-11	0.919	0.624	2.537	8.83E-14	4.26 ^c	1.68
LEPBIa0812		Putative acyltransferase, MBOAT family; putative membrane protein	M	1.423	0.016	1.785	4.81E-10	0.797	0.091	2.16 ^c	1.97 [*]
LEPBIa0979	<i>prfC</i>	Oligopeptidase A	E	0.668	0.015	0.458	6.82E-14	1.455	0.005	0.52	0.66
LEPBIa3210	<i>csrA</i>	Carbon storage regulator homolog	T	0.001	1.23E-17	1.848	0.043	0	3.16E-21	U	3.33 [*]
LEPBIa2344	<i>groL</i>	GroEL protein, Hsp60 family	O	0.858	0.994	0.136	8.97E-05	6.288	0.001	ND	ND
LEPBIa2449	<i>clpB</i>	Chaperone ClpB	O	0.716	0.994	0.169	0.001	4.236	0.034	ND	ND

^a ORF ID, Gene, Product, and COG are according to *Leptospira biflexa* serovar Patoc. Patoc 1 was obtained from MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform: <https://image.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>.

^b Relative fold change (FC) of each gene obtained by RT-qPCR experiments.

(^{*}) indicates significant expression level with p < 0.05. U, undetectable. ND, not determined.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.t003>

target of *L. biflexa* CsrA. In contrast, the complementation of $\Delta csrA$ could not restore wild-type expression of *LEPBla_0812* and *LEPBla0979*, suggesting that these genes are not putative gene targets of CsrA (Table 3).

While a few differentially expressed genes were found in $\Delta csrA$, 575 transcripts consisting of 569 genes (15% of total ORF), 4 ncRNA, and 2 23S rRNA were differentially expressed in the $\Delta csrA$ complemented strain compared with WT transcriptome (Fig 4B, S4 Fig and S2 Table). The gene *csrA* (*LEPBla_3210*) was significantly up-regulated (1.84-fold), further confirming the upregulation of *csrA* observed by RT-qPCR (Fig 2B and Table 3). Among the 569 genes, *clpB* (*LEPBla_2449*) and *groL* (*LEPBla2344*), known genes involved in general stress response, are one of the most strongly downregulated genes (Table 3 and S2 Table), indicating that overexpression of *csrA* may induce stress conditions in *L. biflexa*. Complete set of ORF expression is shown in S2 Table.

RT-qPCR was performed to validate the RNA-seq results. As shown in Table 3, the significant upregulation of *LEPBla_0812* and *LEPBla_1872* was confirmed in $\Delta csrA$, while *LEPBla_0979* was not differentially expressed by RT-qPCR. The restoration of *LEPBla_1872* in complemented strain was confirmed by RT-qPCR, further confirming this gene as a specific target of CsrA.

***FlaB* gene as a potential target of CsrA in *L. Biflexa*.** Because *L. biflexa* has 4 *flaB* genes, the effect of *csrA* on the relative expression of these *flaB* genes was determined (Fig 5A). RT-qPCR confirmed an upregulation of *flaB3* in $\Delta csrA$ and the expression level of *flaB3* was restored in the complemented strain. We also found that *flaB2* (*LEPBla_2132*) was significantly upregulated in $\Delta csrA$ and its expression was restored in the complemented strain (Fig 5A). These results indicated that *flaB2* and *flaB3* are potential CsrA targets. The upregulation of both genes was correlated with RNA-seq of $\Delta csrA$, of which only *flaB3*, not *flaB2* was differentially expressed (S2 Table).

CsrA regulates its targets by binding to their upstream sequences overlapping the Shine Dalgarno sequence [63]. The consensus sequence of the CsrA binding site is 5' RUACARG-GAUGU' 3 [41]. The upstream sequence analysis of *flaB2* and *flaB3* showed potential CsrA binding sites with 4 nucleotide mismatches compared with the consensus sequence (Fig 5B and S3 Table). The putative binding sites were similar in terms of nucleotide composition and sequence order, 5' ACACAAAGGAGT' 3 for *flaB2* and 5' ACACAGGAGGGT' 3 for *flaB3*. The Shine Dalgarno sequence (5' AGGAGG' 3) was present in the upstream region of *flaB3*, but not *flaB2*, suggesting that *flaB3* might be more promising to be a CsrA target. Secondary

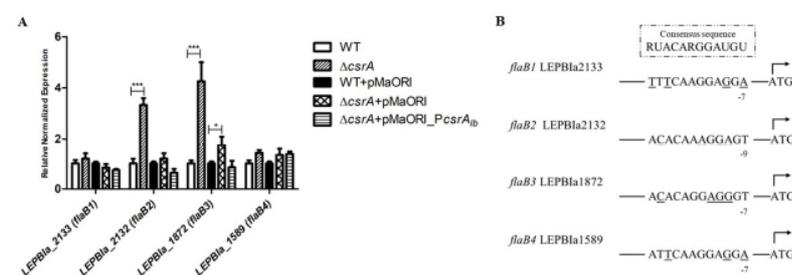


Fig 5. *FlaB* genes expression of *L. biflexa*. (A) Expression of *L. biflexa* *flaB* genes by RT-qPCR, RNAs were prepared from 3 independent cultures of each leptospiral strains. Results are presented as relative fold changes \pm SEM using *cysK* for normalization. (*), (**), and (***) indicate p-value <0.05 , <0.01 and <0.001 , respectively. For statistical analysis, $\Delta csrA$ was compared to WT; $\Delta csrA$ +pMaORI or $\Delta csrA$ +pMaORI_PcsrA_{flaB} was compared to WT+pMaORI. (B) Analysis of *flaB* 5' untranslated regions of *L. biflexa* serovar Patoc. The gene and distances to the start codon are indicated. Underlined letters represent mismatched nucleotides compared with the consensus sequence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g005>

structure prediction of 120 nucleotides upstream of *flaB3* revealed that the possible binding site formed a GGA motif-containing hexaloop and localized 7 nucleotides before the start codon (Fig 6A). These findings strongly suggest that *flaB3* is a specific CsrA target in *L. biflexa*. Therefore, only the putative CsrA binding site of *flaB3* was selected for further verification.

To confirm the interaction of *L. biflexa* CsrA and *flaB3* transcripts *in vitro*, N-terminal 6× His-tag recombinant CsrA protein (rCsrA) of *L. biflexa*, with an approximate molecular weight of 14 kDa, was produced in *E. coli* (S5 Fig). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed to investigate the interaction between *L. biflexa* rCsrA and synthesized 22-nucleotide RNA probe upstream of *flaB3*. Because GGA is a known critical binding site of CsrA, the interaction between rCsrA and GGA motif-containing LEPBla_1872 WT probe was compared to AAA-containing LEPBla_1872 Mut probe (Fig 6A). The rCsrA could bind to the WT probe in a dose dependent manner whereas no interaction was observed between rCsrA and the Mut probe (Fig 6B), indicating that GGA motif was critical for *L. biflexa* CsrA binding. Therefore, CsrA regulates *flaB3* by binding to its upstream sequence at the GGA motif.

Overexpression of *csrA* in *Leptospira* spp.

To generate *csrA* overexpressing strains of *L. biflexa* and *L. interrogans*, we first overexpressed *csrA* of each strain under the control of the promoter of *L. interrogans* *groES*, which previously showed to be a strong promoter [53]. Consistent with the results observed in the complementation experiment, no colony was obtained for both *L. interrogans* and *L. biflexa*. In contrast,

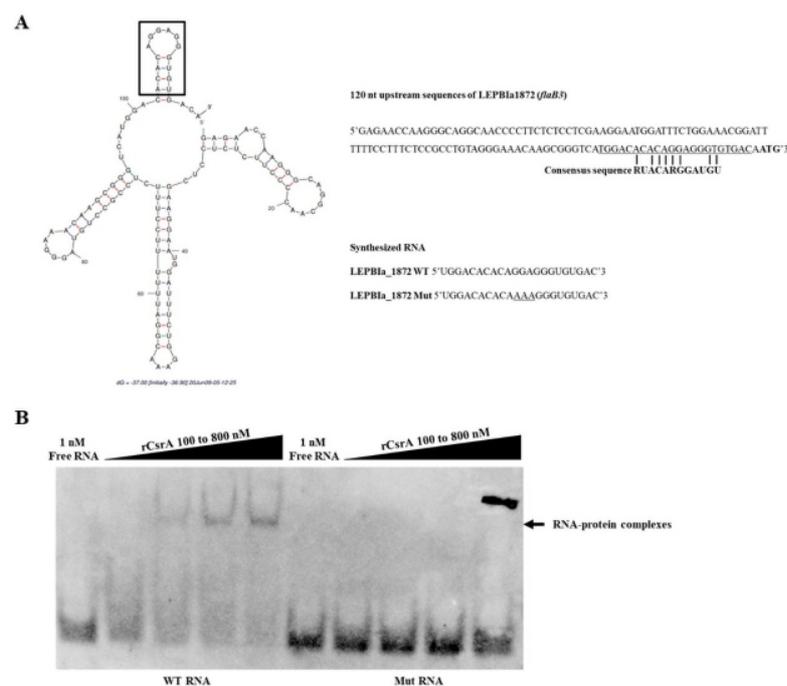


Fig 6. *FlaB* gene as a potential target of CsrA in *L. biflexa*. (A) Secondary structure of 120-nucleotide 5' untranslated region of *LEPBla1872* (*flaB3*) was predicted using MFOLD [64]. The putative CsrA binding site is shown and the start codon (ATG) is indicated in bold letters. The sequences of the synthesized 5' biotinylated RNAs of *LEPBla_1872* WT and *LEPBla_1872* Mut probes for *flaB3* are shown. (B) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA), 1 nM biotinylated RNA of either *LEPBla_1872* WT or *LEPBla_1872* Mut probes were incubated with different concentrations of rCsrA of *L. biflexa*. The reaction solution was subjected to 10% native PAGE, transferred to a nylon membrane, probed with HRP-conjugated streptavidin, and detected for chemiluminescent signal after the detection reagent was added.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g006>

conjugation with the empty replicative plasmid resulted in hundreds of colonies for both *L. interrogans* and *L. biflexa*. We therefore overexpressed *csrA* under its native promoter, the promoter of the operon *flgN-flgK-flgL-fljW-csrA*. Numerous spectinomycin resistant colonies were then obtained from both leptospiral strains. RT-qPCR showed that the relative fold change of *csrA* was 3.70-fold higher in *L. interrogans* (Fig 7A) and 18.77-fold higher in *L. biflexa* (S6A Fig) compared to its parental WT strain.

The *csrA* overexpressing strain of both *L. interrogans* (WT+pMaORI_PcsrA_{li}) and *L. biflexa* (WT+pMaORI_PcsrA_{lb}) had a growth rate similar to WT in regular and 5-fold diluted EMJH (Fig 7B and S6B and S6C Fig). These results suggested that overexpression of *csrA* did not affect the growth of *Leptospira*.

To investigate the effect of *csrA* overexpression on motility, the soft agar assay and measurement of cell length and motility were performed. We found that the motility of the WT+pMaORI_PcsrA_{lb} was not deficient (S6D–S6F Fig), which was consistent with the results observed in $\Delta csrA$. In contrast, overexpression of *csrA* in *L. interrogans* had poor motility on soft agar (Fig 7C); however, the cell length and velocity were not significantly different from WT (Fig 7D and 7E).

Overexpression of *csrA* had a distinct effect on *flaB* expression

The relative expression levels of the 4 *flaB* genes in *csrA* overexpressing strains of both *L. biflexa* and *L. interrogans* were investigated. In WT+pMaORI_PcsrA_{lb}, *flaB2* and *flaB3* were significantly downregulated by 0.433- and 0.439-fold change (Fig 8A), respectively, which is in agreement with the data in $\Delta csrA$ showing that CsrA acts as a repressor in *L. biflexa*. In contrast, the overexpressing strain of *L. interrogans* showed poor motility on soft agar plates and had a significant upregulation of *flaB1*, *flaB2*, and *flaB4* by 3.02-, 2.10-, and 1.57-fold change,

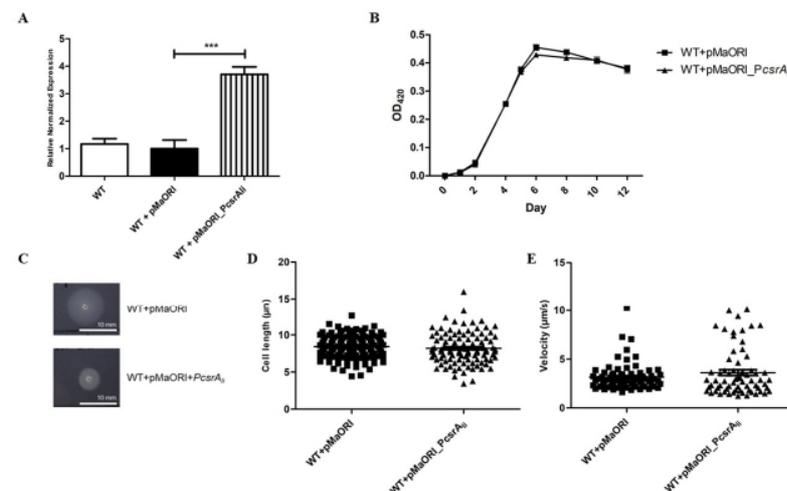


Fig 7. Overexpression of *csrA* in *L. interrogans*. (A) Overexpression of *csrA* in *L. interrogans*. To confirm overexpression of *csrA*, RNA was extracted from each *Leptospira* strain and then subjected to RT-qPCR. Results obtained from 3 independent cultures were presented as relative fold changes \pm SEM. *LipL32* was used for normalization. (***) indicates p-value < 0.001. (B) Growth curve of *L. interrogans*. The 2×10^6 cells of each bacterial strain were grown in 10 mL of regular EMJH. OD₄₂₀ measurement for growth was performed every 24 h. Results obtained from 3 independent experiments are expressed as Mean \pm SEM. (C) Soft agar assay of *L. interrogans*. *Leptospira* at OD₄₂₀ = 0.1 were inoculated onto 0.6% semisolid EMJH plates and incubated at 30°C. (D) Measurement of cell length of *L. interrogans* (E) Measurement of velocity of *L. interrogans*. Late exponential phase of *Leptospira* grown in EMJH medium were measured for cell length and velocity under a dark-field microscope using cellSens software (OLYMPUS).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g007>

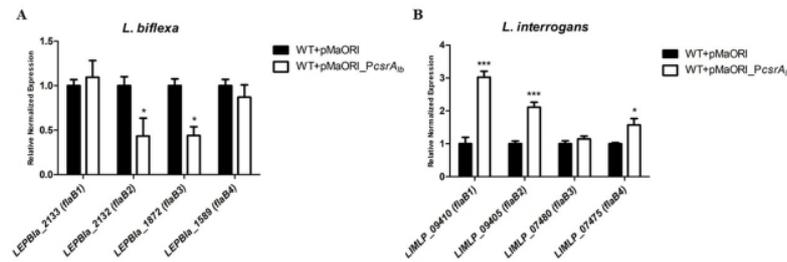


Fig 8. Effect of overexpressed CsrA on *flaB* expression. Expression of 4 *flaB* genes in *Leptospira* strains by RT-qPCR. RNAs were prepared from 3 independent cultures of each leptospiral strain and used for RT-qPCR. Results are presented as relative fold changes \pm SEM using *cysK* and *lipL32* for normalization in *L. biflexa* and *L. interrogans*, respectively. (*), (**) and (***) indicate p-value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g008>

respectively (Fig 8B), suggesting that CsrA might be involved in transcriptional activation of flagellin genes in *L. interrogans*.

Analysis of 5' untranslated region of *L. interrogans flaBs* revealed putative CsrA binding sites in *flaB1*, *flaB2*, *flaB3*, and *flaB4* (Fig 9A). Among 3 upregulated *flaB* genes, *flaB4* is more likely a CsrA target because of the highest match of its upstream region to the consensus sequence (Fig 9B and S3 Table). Secondary structure prediction of 120 nucleotides upstream of *flaB4* (LIMLP_07475) revealed a GGA motif-containing hexaloop locating 6 nucleotides before the start codon (Fig 9B). Therefore, *flaB4* was selected for further binding studies. Recombinant CsrA protein of *L. interrogans* was produced (S5 Fig) and used for EMSA. As expected, rCsrA bound to *flaB4* upstream in a dose-dependent manner (Fig 9C). The specificity was further confirmed by competitive EMSA (Fig 9D). Our results not only demonstrated that CsrA of *L. interrogans* is an RNA-binding protein but also showed *flaB4* as a specific target.

Discussion

Leptospira spp. are ubiquitous bacteria found as free-living saprophytes in environmental water and soil or as pathogens excreted in the urine of asymptomatic hosts to cause disseminated infections in both humans and animals. Global gene regulators are required for their rapid adaptation to environmental changes. However, the knowledge of gene regulation in *Leptospira* remains limited. We found that *csrA* homolog, a well-characterized post-transcriptional global regulator, is present in all available leptospiral genomes. The leptospiral *csrA* is located inside an operon of genes involved in the flagellum biosynthesis (Fig 1A) like other bacteria [65]. Moreover, the *csrA* operon of both *L. biflexa* and *L. interrogans* are in synteny with *csrA* operons of other spirochete bacteria including *B. burgdorferi* and *T. pallidum* [66]. In gamma-proteobacteria, non-coding RNA (ncRNA), such as *csrB* [67] and *csrC* [68], modulates CsrA function. In epsilon-proteobacteria and firmicutes that have no gene encoding ncRNA antagonist, FliW was reported as the protein antagonist of CsrA [69, 70]. The *Leptospira* genomes do not possess *csrB* and *csrC* homologs but *fliW* is located adjacent to *csrA* (Fig 1A). Thus, FliW may function as the leptospiral CsrA antagonist. A CsrA-like ncRNA, which could regulate leptospiral CsrA activity, was also identified in *L. biflexa* [12].

While generation of *csrA* deletion was feasible in *L. biflexa*, we were unable to delete *csrA* in *L. interrogans*. Because targeted mutation particularly in pathogenic *Leptospira* is difficult and inefficient, a limited number of virulence genes have been confirmed [71]. Likewise, the present study could not successfully generate a deletion mutant in *L. interrogans*. Alternatively,

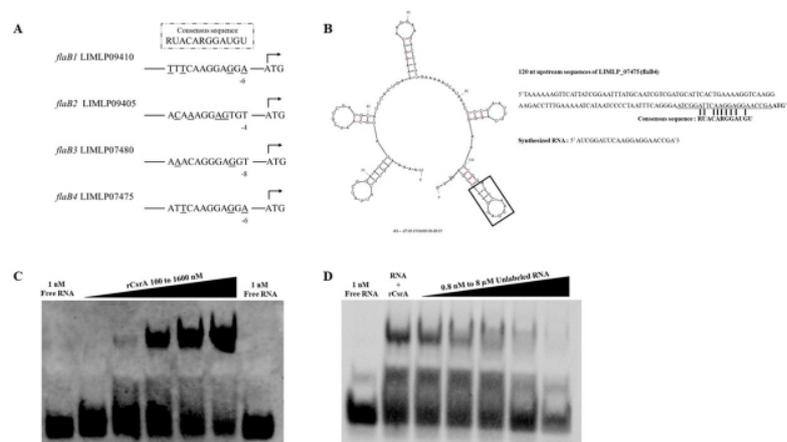


Fig 9. *L. interrogans* CsrA regulated *flaB* expression. (A) Analysis of *flaB* 5' untranslated regions of *L. interrogans* serovar Manilae. The genes and distances to the start codon are indicated. Underlined letters represent mismatched nucleotides compared to the consensus sequence. (B) Secondary structure of 120-nucleotide 5' untranslated region of LIMLP07475 (FlaB4) was predicted using MFOLD [64]. The putative CsrA binding site is shown and the start codon (ATG) is indicated in bold letters. The sequences of the synthesized 5' biotinylated RNA of LIMLP_07475 is shown. (C) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA), 1 nM biotinylated RNA of LIMLP_07475 was incubated with different concentrations of *L. interrogans* rCsrA. The reaction solution was subjected to 10% native PAGE, transferred to a nylon membrane, probed with HRP-conjugated streptavidin, and detected for chemiluminescent signal after the detection reagent was added. (D) Competitive EMSA, biotinylated RNA of LIMLP_07475 and rCsrA concentration were fixed at 1 nM and 800 nM, respectively. Unlabeled LIMLP_07475 was added in the reaction concentration range from 0.8 nM to 8 μM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.g009>

csrA may have an essential role in the viability of *L. interrogans* but not in *L. biflexa*. The *csrA* mutant of *Salmonella* Typhimurium showed severe growth defect compared to its parental strain [47]. Moreover, CsrA might be toxic to *Leptospira* because we were unable to obtain any transconjugant in both *L. biflexa* and *L. interrogans* when *csrA* was fused to a strong promoter.

Metabolism is one of the common phenotypes regulated by CsrA in many bacteria [72–76]. For instance, *E. coli* CsrA regulates the carbon starvation gene, *cstA*, which plays a role in peptide transport during carbon starvation [76]. Another study reported a strong activity of CsrA during iron-limited condition [46]. In regular EMJH, growth curves of $\Delta csrA$ and WT+*pMaORI_PcsrA_{fb}* were not different from those of their parental strains (Fig 3A and S6B Fig), suggesting that *csrA* was not essential for growth in *L. biflexa* in rich medium. However, the growth of $\Delta csrA$ was defective under starvation condition compared to its parental WT strain. There was a relatively slow lag phase before reaching a similar growth rate as that in WT in the stationary phase, indicating that *csrA* is required in the early phase of growth when nutrients are limited. However, the complemented strain was unable to fully restore the phenotype. This is probably due to the overexpression (3-fold increase) of *csrA* in *trans* in $\Delta csrA$ compared to the wild-type which may result in massive gene deregulation as shown by RNA-seq which had more than 500 differentially expressed genes (Fig 4B). Our data suggested that CsrA is required for growth of *L. biflexa* under starvation so that they can survive in the environment where nutrients are limited.

Several reports showed that there was an alteration of transcriptomic profile in *csrA* mutant strains and those strains support CsrA as a global gene regulator (Table 1). In *csrA* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, 641 genes were upregulated, and 703 transcripts (~15% of total genes) were downregulated compared to its parental WT strain [26]. A total of 239 genes (13.4% of total genes) showed different expression in *csrA* mutant of *B. burgdorferi* compared to its parental WT [23]. Surprisingly, only 3 genes (<1% of total genes) were

differentially expressed in $\Delta csrA$ of *L. biflexa*, but only 1, LEPBIA1872 (*flaB3*), was significantly upregulated more than 1.5-fold change and its expression level could be restored in the complemented strain indicating that *csrA* is a repressor of *flaB3*. A small number of genes were detected by RNA-seq probably because of different mechanisms employed by CsrA to regulate its gene targets [63]. For example, CsrA post-transcriptionally regulates its gene targets by affecting their mRNA stability [35, 36, 77] or it can regulate its targets without any change in the number of target transcripts [76, 78]. As a result, such post-transcriptional control might not be detected by RNA-seq. Proteomic profiling may be necessary to investigate post-translational effects of CsrA as well as to identify its targets. In addition, we found that $\Delta csrA$ of *L. biflexa* grew slower than WT strain under starvation conditions. Thus, transcriptomic profiling of $\Delta csrA$ under starvation may yield more information on the target genes.

In contrast to $\Delta csrA$, a higher number of genes were differentially expressed in the $\Delta csrA$ +pMaORI_P*csrA*_{lb} overexpressing CsrA in *L. biflexa* (Fig 4B). This finding might be a result of deregulation of other regulators as reported in some bacteria [63]. Presumably, CsrA exerts global regulation in *L. biflexa* when its expression reaches a substantial level. RNA-seq of WT demonstrated low *csrA* expression in rich medium (low total read/sample of *csrA* in S2 Table), therefore deletion of *csrA* might not result in major transcriptomic changes. In addition, other unknown factors might inhibit *csrA* expression at its native locus because the expression of *csrA* under its native promoter was significantly higher than WT (Fig 2B). Accordingly, we cannot exclude the possibility that CsrA is a global regulator in *L. biflexa* especially under the conditions that upregulate *csrA*. The impact of CsrA on expression of other genes under such conditions require further investigation.

Motility is one of the common traits regulated by CsrA. The alteration in motility affected by CsrA as well as the molecular mechanisms of CsrA that act on motility genes have been well documented in many bacteria [40, 79–84]. Flagellin genes have been reported as targets of CsrA in many bacteria. For example, CsrA bound to 5'untranslated regions of borrelial *flaB* at the consensus sequences overlapping the Shine Dalgarno sequence resulted in the translational block [51]. Hag protein, which shares ~47% amino acid identical to leptospiral *flaB3*, is regulated by CsrA using the same mechanism as *Borrelia* [78]. Our transcriptome analysis showed that *flaB3* is a potential target of CsrA. This was further confirmed by the presence of putative CsrA binding site in the promoter and gel shift assays which showed that there was a specific binding of rCsrA to the WT *flaB3* 5'untranslated region through the GGA conserved residues, which is consistent with a previous report [41]. In contrast, this finding is inconsistent with the results from the RNA-seq and EMSA results which showed that there were no differences in motility on soft agar, cell length, and velocity (Fig 3C–3E). While most bacteria harbor one flagellin component [85], *Leptospira* have 4 homologs of the flagellin FlaB in their genome [86]. The numbers of each FlaB in *L. interrogans* are approximately 14000, 2000, 300, and 3500 copies for FlaB1, FlaB2, FlaB3, and FlaB4, respectively [86]. Our RNA-seq results revealed that *flaB4* (LEPBIA1589) was the most transcribed *flaB*, more than 3-fold compared to other *flaB* transcripts (S2 Table). Apparently, FlaB3 (LEPBIA_1872), which is regulated by CsrA, is not a major FlaB protein, which could explain the absence of change in the motility phenotype. It is possible that *flaB2* is a target of *L. biflexa* CsrA because it was significantly upregulated in $\Delta csrA$ and its expression was restored in the complemented strain (Fig 5A), but the interaction was not investigated in this study. The putative CsrA binding site of *flaB2* shares high similarity to the *flaB3* binding site and harbors GGA motif (Fig 5B and S3 Table). However, although *flaB1* and *flaB4* genes contain a possible CsrA binding site (Fig 5B and S3 Table), no transcriptional change was observed. Other cooperating factors might be required for gene regulation. It is noteworthy to mention that the flagellar expression and motility phenotype observed here occurred in a nutrient-rich culture medium.

Because we were unable to generate a *csrA* mutant strain of *L. interrogans*, an overexpressing *csrA* strain was constructed. A 4-fold increase of *csrA* in *L. interrogans* resulted in poor motility on soft agar (Fig 7C), suggesting that *csrA* may regulate the motility of *L. interrogans*. Due to no alteration in cell length or velocity, other pathways regulated by CsrA may be responsible for this phenotype. These results indicated the crucial function of *csrA* in the pathogenic strain because motility is known to be a virulence factor of *Leptospira* [87–89].

The upregulation of *flaB* in *csrA* overexpressing strain of *L. interrogans* is in contrast to the downregulation in *csrA* overexpressing strain of *L. biflexa*, suggesting the distinct mechanisms of *csrA* among leptospiral strains. As previously reported, the mechanism of CsrA on motility regulation can be distinct in different bacteria. For example, the *csrA* mutants in *E. coli* and *S. Typhimurium* were non-motile and CsrA positively regulated the master operon in flagellum biosynthesis, *flhDC* [40, 90]. In contrast, RsmA, a CsrA homolog of *Erwinia carotovora*, negatively regulated *flhDC*, and the *rsmA* mutant was hypermotile [82]. In addition, CsrA in *Salmonella* regulated different motility genes compared to *E. coli* [38]. These results indicated that CsrA in different bacteria may have distinct effects on motility. For example, the same gene in different bacteria may have different mechanisms or control of different gene targets. Comparative transcriptomic and proteomic profiles of *csrA*-overexpressing *L. biflexa* and *L. interrogans* might give useful information on the global role of CsrA as well as different mechanisms of CsrA between these 2 species.

In conclusion, we characterized the role of CsrA in *Leptospira* spp. We found that *csrA* of the saprophyte *L. biflexa* is required for starvation response and repressed the expression of *flaB3* (*LEPB1a_1872*) without any change in motility phenotype. *L. biflexa* CsrA may exert a global effect under certain conditions that upregulate *csrA* expression. In contrast, overexpression of CsrA in pathogenic *L. interrogans* resulted in poor motility and CsrA may be an activator of *flaB1*, *flaB2*, and *flaB4* genes. This study suggested that pathways of gene regulation by CsrA may be different in bacteria belonging to the same genus, i.e., pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp.

Supporting information

S1 Fig. Map of suicide vectors. Map of suicide vectors, *L. interrogans* serovar Manilae and *L. biflexa* serovar Patoc. These vectors have Km^R located between the flanking sequences of *csrA*. (TIF)

S2 Fig. Map of pMaORI used for complementation and overexpression. pMaORI containing *csrA* of *L. interrogans* serovar Manilae and *L. biflexa* serovar Patoc with its native promoter. (TIF)

S3 Fig. PCR confirmation of *csrA* mutant strain in *L. biflexa* serovar Patoc. (A) Genomic DNA of wild type and 16 selected transformants were prepared and amplified by PCR using specific primers that flanked sequences of *csrA* (Flk-L and Flk-R). (B) To confirm the absence of *csrA*, we amplified 2 transformants which were positive for double crossing over event using PCR with specific primers to the coding sequence of *csrA* (ORF-L and ORF-R). (TIF)

S4 Fig. GO term enrichment analyses on DEGs identified from WT and $\Delta csrA$ +pMaORI_PcsrA_{fb}. The significant enriched biological process for downregulated genes in the complemented strain are shown. No enriched GO terms were found in the upregulated genes in the complemented strain. (TIF)

S5 Fig. Recombinant CsrA production. PCR products of complete sequences of *csrA* either from *L. interrogans* or *L. biflexa* were cloned into pRSET-C expression vector, transformed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, and induced the expression IPTG. Purified N-terminal 6x His tag recombinant CsrA was subjected to 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Separated recombinant proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane, detected with mouse monoclonal antibody against 6xHis tag (primary antibody) and HRP-conjugated anti-mouse IgG (secondary antibody) using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent.

(TIF)

S6 Fig. Overexpression of *csrA* in *L. biflexa*. (A) Overexpression of *csrA* in *L. biflexa*. To confirm overexpression of *csrA*, RNAs were extracted from each *Leptospira* strain and subjected to RT-qPCR. Results obtained from 3 independent cultures were presented as relative fold changes \pm SEM. *cysK* was used for normalization. (***) indicated p-value <0.001 . The growth curve of *L. biflexa*. The 2×10^6 cells of each bacterial strain were grown in 10 mL of regular EMJH or 5-fold diluted EMJH in water, (B) represented growth in regular EMJH and (C) growth in 5-fold diluted EMJH. OD₄₂₀ measurement for growth was performed every 24 h. Results obtained from 3 independent experiments are expressed as Mean \pm SEM. (D) Soft agar assay of *L. biflexa*. *Leptospira* OD₄₂₀ = 0.1 were inoculated onto 0.6% semisolid EMJH plate and incubated at 30°C. (E) Measurement of cell length of *L. biflexa* (F) Measurement of velocity of *L. biflexa*. Late exponential phase of *Leptospira* grown in EMJH medium were measured for cell length and velocity under a dark-field microscope using cellSens software (OLYMPUS).

(TIF)

S1 File.

(PDF)

S1 Table. Primers used in this study.

(XLSX)

S2 Table. Significantly deregulated genes in the $\Delta csrA$ and $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{II}$ with $\log_2FC > \pm 0.5$ cut-off and adjusted p-value of <0.05 .

(XLSX)

S3 Table. Analysis of *flaB* 5' untranslated region. ^a Gene, ORF ID, Product, and Distance to the start codon are according to *Leptospira biflexa* serovar Patoc Patoc 1 and *L. interrogans* serovar Manilae strains. UP-MMC-NIID LP was obtained from MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform; <https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>. Underlined letters represented mismatch nucleotide compared to the consensus sequence. Bold letters represented the Shine-Dalgarno sequence.

(XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank Robert Gaultney for his assistance in processing the RNA samples.

Author Contributions

Conceptualization: Theerapat Phoka, Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

Formal analysis: Theerapat Phoka, Juliana Pipoli Da Fonseca, Thomas Cokelaer.

Funding acquisition: Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

Investigation: Theerapat Phoka.

Methodology: Theerapat Phoka, Lenka Fule, Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

Project administration: Kanitha Patarakul.

Resources: Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

Supervision: Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

Validation: Theerapat Phoka, Lenka Fule, Juliana Pipoli Da Fonseca, Thomas Cokelaer, Kanitha Patarakul.

Visualization: Theerapat Phoka, Lenka Fule.

Writing – original draft: Theerapat Phoka.

Writing – review & editing: Theerapat Phoka, Lenka Fule, Juliana Pipoli Da Fonseca, Thomas Cokelaer, Mathieu Picardeau, Kanitha Patarakul.

References

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9):e0003898. Epub 2015/09/18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898> PMID: 26379143
2. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA Jr., Diggle PJ, Begon M, Ko AI. Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. *Appl Environ Microbiol*. 2018; 84(13). Epub 2018/04/29. <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18> PMID: 29703737
3. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:65–97. Epub 2014/11/13. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5 PMID: 25388133
4. Zuemer RL. Host response to *leptospira* infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:223–50. Epub 2014/11/13. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_9 PMID: 25388137
5. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol*. 2004; 7(1):35–40. PMID: 15179605.
6. Thibeaux R, Soupe-Gilbert ME, Kainiu M, Girault D, Bierque E, Fernandes J, et al. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020; 6(1):24. Epub 2020/06/14. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1> PMID: 32532998
7. Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun*. 2006; 74(10):5848–59. <https://doi.org/10.1128/IAI.00755-06> PMID: 16988264
8. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuemer RL, Adler B, Haake DA. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun*. 2007; 75(6):2864–74. <https://doi.org/10.1128/IAI.01619-06> PMID: 17371863
9. Patarakul K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol*. 2010; 10:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-31> PMID: 20113507
10. Lo M, Murray GL, Khoo CA, Haake DA, Zuemer RL, Adler B. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. *Infect Immun*. 2010; 78(11):4850–9. Epub 2010/09/02. <https://doi.org/10.1128/IAI.00435-10> PMID: 20805337
11. Nally JE, Grassmann AA, Planchon S, Sergeant K, Renaut J, Seshu J, et al. Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:362. Epub 2017/08/30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00362> PMID: 28848720
12. Iraola G, Spangenberg L, Lopes Bastos B, Grana M, Vasconcelos L, Almeida A, et al. Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. *mSphere*. 2016; 1(2). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00042-16> PMID: 27303713

13. Matsunaga J, Coutinho ML. Positive regulation of *Leptospira interrogans* *kdp* expression by KdpE as Demonstrated with a novel beta-galactosidase reporter in *Leptospira biflexa*. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(16):5699–707. <https://doi.org/10.1128/AEM.00713-12> PMID: 22685146
14. Cune J, Cullen P, Mazon G, Campoy S, Adler B, Barbe J. The *Leptospira interrogans* *lexA* gene is not autoregulated. *J Bacteriol*. 2005; 187(16):5841–5. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5841-5845.2005> PMID: 16077133
15. Zhang JJ, Hu WL, Yang Y, Li H, Picardeau M, Yan J, et al. The sigma factor sigma(54) is required for the long-term survival of *Leptospira biflexa* in water. *Mol Microbiol*. 2018. <https://doi.org/10.1111/mmi.13967> PMID: 29633391
16. Hu WL, Pappas CJ, Zhang JJ, Yang YY, Yan J, Picardeau M, et al. The EbpA-RpoN Regulatory Pathway of the Pathogen *Leptospira interrogans* Is Essential for Survival in the Environment. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02377-16> PMID: 27864172
17. Adhikaria H, Wunder EA Jr., Mechaly AE, Mehta S, Wang Z, Santos L, et al. Lvr, a Signaling System That Controls Global Gene Regulation and Virulence in Pathogenic *Leptospira*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:45. Epub 2018/03/31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00045> PMID: 29600195
18. Vami V, Koval A, Nagel A, Ruybal P, Caimi K, Amadio AF. First Genome Sequence of *Leptospira interrogans* Serovar Pomona, Isolated from a Bovine Abortion. *Genome Announc*. 2016; 4(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00345-16> PMID: 27198013
19. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003; 422(6934):888–93. <https://doi.org/10.1038/nature01597> PMID: 12712204.
20. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*. 2008; 3(2):e1607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607> PMID: 18270594
21. Van Assche E, Van Puyvelde S, Vanderteyden J, Steenackers HP. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front Microbiol*. 2015; 6:141. Epub 2015/03/19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00141> PMID: 25784899
22. Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkemagel AM. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol*. 1993; 175(15):4744–55. <https://doi.org/10.1128/jb.175.15.4744-4755.1993> PMID: 8393005
23. Arnold WK, Savage CR, Lethbridge KG, Smith TC 2nd, Brissette CA, Seshu J, et al. Transcriptomic insights on the virulence-controlling CsrA, BadR, RpoN, and RpoS regulatory networks in the Lyme disease spirochete. *PLoS One*. 2018; 13(8):e0203286. Epub 2018/08/31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203286> PMID: 30161198
24. Lee JH, Ancona V, Chatnaparat T, Yang HW, Zhao Y. The RNA-Binding Protein CsrA Controls Virulence in *Erwinia amylovora* by Regulating RelA, RcsB, and FlhD at the Posttranscriptional Level. *Mol Plant Microbe Interact*. 2019; 32(10):1448–59. Epub 2019/05/30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0077-R> PMID: 31140921.
25. Potts AH, Vakulskas CA, Pannuri A, Yakhnin H, Babitzke P, Romeo T. Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. *Nat Commun*. 2017; 8(1):1596. Epub 2017/11/19. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01613-1> PMID: 29150605
26. Wang S, Yang F, Yang B. Global effect of CsrA on gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Res Microbiol*. 2017; 168(8):700–9. Epub 2017/09/06. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.003> PMID: 28870757.
27. Berndt V, Beckstette M, Volk M, Dersch P, Bronstrup M. Metabolome and transcriptome-wide effects of the carbon storage regulator A in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2019; 9(1):138. Epub 2019/01/16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36932-w> PMID: 30644424
28. Potts AH, Guo Y, Ahmer BMM, Romeo T. Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics. *PLoS One*. 2019; 14(1):e0211430. Epub 2019/01/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211430> PMID: 30682134
29. Butz HA, Mey AR, Ciosek AL, Crofts AA, Davies BW, Payne SM. Regulatory Effects of CsrA in *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2021; 12(1). Epub 2021/02/04. <https://doi.org/10.1128/mBio.03380-20> PMID: 33531387
30. Kao CY, Chen JW, Wang S, Sheu BS, Wu JJ. The *Helicobacter pylori* J99 jhp0106 Gene, under the Control of the CsrA/RpoN Regulatory System, Modulates Flagella Formation and Motility. *Front Microbiol*. 2017; 8:483. Epub 2017/04/13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00483> PMID: 28400753
31. Sahr T, Rusniok C, Impens F, Oliva G, Sismeiro O, Coppee JY, et al. The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system.

- PLoS Genet. 2017; 13(2):e1006629. Epub 2017/02/18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006629> PMID: 28212376
32. Tan Y, Liu ZY, Liu Z, Zheng HJ, Li FL. Comparative transcriptome analysis between *csrA*-disruption *Clostridium acetobutylicum* and its parent strain. *Mol Biosyst.* 2015; 11(5):1434–42. Epub 2015/04/03. <https://doi.org/10.1039/c4mb00600c> PMID: 25832359.
 33. Wilf NM, Reid AJ, Ramsay JP, Williamson NR, Croucher NJ, Gatto L, et al. RNA-seq reveals the RNA binding proteins, Hfq and RsmA, play various roles in virulence, antibiotic production and genomic flux in *Serratia* sp. ATCC 39006. *BMC Genomics.* 2013; 14:822. Epub 2013/11/26. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-822> PMID: 24267595
 34. Romeo T. Post-transcriptional regulation of bacterial carbohydrate metabolism: evidence that the gene product CsrA is a global mRNA decay factor. *Res Microbiol.* 1996; 147(6–7):505–12. Epub 1996/07/01. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)84004-6](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)84004-6) PMID: 9084762.
 35. Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T, Babitzke P. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2002; 44(6):1599–610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02982.x> PMID: 12067347.
 36. Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2005; 56(6):1648–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04648.x> PMID: 15916613.
 37. Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P. Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol.* 2013; 15(2):313–24. Epub 2012/06/08. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02794.x> PMID: 22672726
 38. Martinez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol.* 2011; 80(6):1637–56. Epub 2011/04/27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x> PMID: 21518393
 39. Yakhnin AV, Baker CS, Vakulskas CA, Yakhnin H, Berezin I, Romeo T, et al. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol.* 2013; 87(4):851–66. <https://doi.org/10.1111/mmi.12136> PMID: 23305111
 40. Wei BL, Brun-Zinkemagel AM, Simecka JW, Pruss BM, Babitzke P, Romeo T. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001; 40(1):245–56. Epub 2001/04/12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02380.x> PMID: 11298291.
 41. Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA.* 2005; 11(10):1579–87. <https://doi.org/10.1261/ma.2990205> PMID: 16131593
 42. Sabnis NA, Yang H, Romeo T. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem.* 1995; 270(49):29096–104. Epub 1995/12/08. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29096> PMID: 7493933
 43. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002; 184(1):290–301. Epub 2001/12/14. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.290-301.2002> PMID: 11741870
 44. Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2005; 58(4):1186–202. Epub 2005/11/03. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04902.x> PMID: 16262799.
 45. Fields JA, Thompson SA. *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *J Bacteriol.* 2008; 190(9):3411–6. Epub 2008/03/04. <https://doi.org/10.1128/JB.01928-07> PMID: 18310331
 46. Pourciau C, Pannuri A, Potts A, Yakhnin H, Babitzke P, Romeo T. Regulation of Iron Storage by CsrA Supports Exponential Growth of *Escherichia coli*. *mBio.* 2019; 10(4). Epub 2019/08/08. <https://doi.org/10.1128/mBio.01034-19> PMID: 31387901
 47. Altier C, Suyemoto M, Lawhon SD. Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun.* 2000; 68(12):6790–7. Epub 2000/11/18. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6790-6797.2000> PMID: 11083797
 48. Mulcahy H, O'Callaghan J, O'Grady EP, Adams C, O'Gara F. The posttranscriptional regulator RsmA plays a role in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and human airway epithelial cells by positively regulating the type III secretion system. *Infect Immun.* 2006; 74(5):3012–5. Epub 2006/04/20. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.3012-3015.2006> PMID: 16622241
 49. Sze CW, Li C. Inactivation of *bb0184*, which encodes carbon storage regulator A, represses the infectivity of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 2011; 79(3):1270–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.00871-10> PMID: 21173314

50. Ouyang Z, Zhou J, Norgard MV. CsrA (BB0184) is not involved in activation of the RpoN-RpoS regulatory pathway in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2014; 82(4):1511–22. Epub 2014/01/24. <https://doi.org/10.1128/IAI.01555-13> PMID: 24452681
51. Sze CW, Morado DR, Liu J, Charon NW, Xu H, Li C. Carbon storage regulator A (CsrA(Bb)) is a repressor of *Borrelia burgdorferi* flagellin protein FlaB. *Mol Microbiol*. 2011; 82(4):851–64. Epub 2011/10/18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07853.x> PMID: 21999436
52. Louvel H, Picardeau M. Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. *Curr Protoc Microbiol*. 2007; Chapter 12:Unit 12E 4. Epub 2008/09/05. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e04s05> PMID: 18770609.
53. Gaultney RA, Vincent AT, Lorigoux C, Coppee JY, Sismeiro O, Varet H, et al. 4-Methylcytosine DNA modification is critical for global epigenetic regulation and virulence in the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48(21):12102–15. Epub 2020/12/11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa966> PMID: 33301041
54. Pappas CJ, Benaroudj N, Picardeau M. A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(9):3176–81. Epub 2015/03/01. <https://doi.org/10.1128/AEM.00173-15> PMID: 25724960
55. Picardeau M. Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(1):319–22. Epub 2007/11/13. <https://doi.org/10.1128/AEM.02172-07> PMID: 17993560
56. Zavala-Alvarado C, Benaroudj N. The Single-Step Method of RNA Purification Applied to *Leptospira*. *Methods Mol Biol*. 2020; 2134:41–51. Epub 2020/07/08. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_5 PMID: 32632858.
57. Zavala-Alvarado C, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, Bussotti G, Bayram J, et al. The transcriptional response of pathogenic *Leptospira* to peroxide reveals new defenses against infection-related oxidative stress. *PLoS Pathog*. 2020; 16(10):e1008904. Epub 2020/10/07. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008904> PMID: 33021995
58. Cokelaer T, Desvillechabrol D, Legendre R, Cardon M. 'Sequana': a Set of Snakemake NGS pipelines. *The Journal of Open Source Software*. 2017; 2(16). <https://doi.org/10.21105/joss.00352>
59. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15(12):550. Epub 2014/12/18. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID: 25516281
60. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010; 11(10):R106. Epub 2010/10/29. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106> PMID: 20979621
61. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *J The Annals of Statistics* 2001; 29(4):1165–88, 24.
62. Mercante J, Suzuki K, Cheng X, Babitzke P, Romeo T. Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem*. 2006; 281(42):31832–42. Epub 2006/08/23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606057200> PMID: 16923806.
63. Pourciau C, Lai YJ, Gorelik M, Babitzke P, Romeo T. Diverse Mechanisms and Circuitry for Global Regulation by the RNA-Binding Protein CsrA. *Front Microbiol*. 2020; 11:601352. Epub 2020/11/17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601352> PMID: 33193284
64. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13):3406–15. Epub 2003/06/26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595> PMID: 12824337
65. Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BM, Romeo T. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 79(2):193–224. Epub 2015/04/03. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14> PMID: 25833324
66. Sanjuan E, Esteve-Gassent MD, Maruskova M, Seshu J. Overexpression of CsrA (BB0184) alters the morphology and antigen profiles of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2009; 77(11):5149–62. <https://doi.org/10.1128/IAI.00673-09> PMID: 19737901
67. Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yuksel U, et al. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1997; 272(28):17502–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502> PMID: 9211896.
68. Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, et al. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2003; 48(3):657–70. Epub 2003/04/16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x> PMID: 12694612.
69. Mukherjee S, Oshiro RT, Yakhnin H, Babitzke P, Kearns DB. FliW antagonizes CsrA RNA binding by a noncompetitive allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(35):9870–5. Epub 2016/08/16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602455113> PMID: 27516547

70. Li J, Gulbranson CJ, Bogacz M, Hendrixson DR, Thompson SA. FliW controls growth-phase expression of *Campylobacter jejuni* flagellar and non-flagellar proteins via the post-transcriptional regulator CsrA. *Microbiology (Reading)*. 2018; 164(10):1308–19. Epub 2018/08/17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000704> PMID: 30113298
71. Picardeau M, Genomics proteomics, and genetics of leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:43–63. Epub 2014/11/13. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4 PMID: 25388132.
72. Wei B, Shin S, LaPorte D, Wolfe AJ, Romeo T. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J Bacteriol*. 2000; 182(6):1632–40. Epub 2000/02/29. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1632-1640.2000> PMID: 10692369
73. Yang H, Liu MY, Romeo T. Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J Bacteriol*. 1996; 178(4):1012–7. Epub 1996/02/01. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1012-1017.1996> PMID: 8576033
74. Morin M, Ropers D, Cinquemani E, Portais JC, Enjalbert B, Coccagn-Bousquet M. The Csr System Regulates *Escherichia coli* Fitness by Controlling Glycogen Accumulation and Energy Levels. *mBio*. 2017; 8(5). Epub 2017/11/02. <https://doi.org/10.1128/mBio.01628-17> PMID: 29089432
75. Hauslein I, Sahr T, Escoll P, Klausner N, Eisenreich W, Buchrieser C. *Legionella pneumophila* CsrA regulates a metabolic switch from amino acid to glycerolipid metabolism. *Open Biol*. 2017; 7(11). Epub 2017/11/03. <https://doi.org/10.1098/rsob.170149> PMID: 29093212
76. Dubey AK, Baker CS, Suzuki K, Jones AD, Pandit P, Romeo T, et al. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol*. 2003; 185(15):4450–60. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4450-4460.2003> PMID: 12867454
77. Esquerre T, Bouvier M, Turlan C, Carpusis AJ, Girbal L, Coccagn-Bousquet M. The Csr system regulates genome-wide mRNA stability and transcription and thus gene expression in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2016; 6:25057. Epub 2016/04/27. <https://doi.org/10.1038/srep25057> PMID: 27112822
78. Yakhnin H, Pandit P, Petty TJ, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (hag) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol*. 2007; 64(6):1605–20. Epub 2007/06/09. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05765.x> PMID: 17555441.
79. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. CsrA regulates *Helicobacter pylori* J99 motility and adhesion by controlling flagella formation. *Helicobacter*. 2014; 19(6):443–54. Epub 2014/08/12. <https://doi.org/10.1111/hel.12148> PMID: 25109343.
80. Ang S, Homg YT, Shu JC, Soo PC, Liu JH, Yi WC, et al. The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *J Biomed Sci*. 2001; 8(2):160–9. Epub 2001/04/05. <https://doi.org/10.1007/BF02256408> PMID: 11287746.
81. Liaw SJ, Lai HC, Ho SW, Luh KT, Wang WB. Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol*. 2003; 52(Pt 1):19–28. Epub 2002/12/19. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05024-0> PMID: 12488561.
82. Chatterjee A, Cui Y, Chakrabarty P, Chatterjee AK. Regulation of motility in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: quorum-sensing signal controls FlhDC, the global regulator of flagellar and exoprotein genes, by modulating the production of RsmA, an RNA-binding protein. *Mol Plant Microbe Interact*. 2010; 23(10):1316–23. Epub 2010/09/14. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-10-0017> PMID: 20831410.
83. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. Global regulation by CsrA in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2003; 48(6):1633–45. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x> PMID: 12791144.
84. Heroven AK, Bohme K, Rohde M, Dersch P. A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. *Mol Microbiol*. 2008; 68(5):1179–95. Epub 2008/04/24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06218.x> PMID: 18430141.
85. Erhardt M, Namba K, Hughes KT. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2(11):a000299. Epub 2010/10/12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000299> PMID: 20926516
86. Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebbersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 2009; 460(7256):762–5. Epub 2009/07/17. <https://doi.org/10.1038/nature08184> PMID: 19606093
87. Lambert A, Picardeau M, Haake DA, Sermswan RW, Srikrum A, Adler B, et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun*. 2012; 80(6):2019–25. Epub 2012/03/28. <https://doi.org/10.1128/IAI.00131-12> PMID: 22451522
88. Fontana C, Lambert A, Benaroudj N, Gasparini D, Gorgette O, Cachet N, et al. Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows That FlIM Is Required for Full Endoflagella Assembly in

Leptospira interrogans. PLoS One. 2016; 11(4):e0152916. Epub 2016/04/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152916> PMID: [27044038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27044038/)

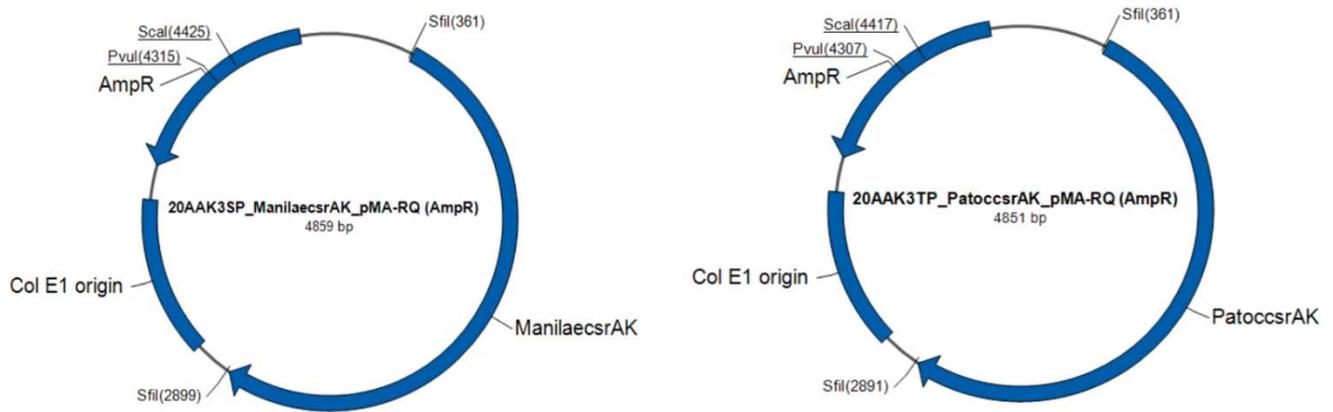
89. Wunder EA Jr., Figueira CP, Benaroudj N, Hu B, Tong BA, Trajtenberg F, et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. Mol Microbiol. 2016; 101(3):457–70. Epub 2016/04/27. <https://doi.org/10.1111/mmi.13403> PMID: [27113476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27113476/)
90. Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Romling U, Melefors O. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella* Typhimurium. Environ Microbiol. 2010; 12(2):524–40. Epub 2009/11/19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02097.x> PMID: [19919539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19919539/)

S1 Fig. Map of suicide vectors.

Map of suicide vectors, *L. interrogans* serovar Manilae and *L. biflexa* serovar Patoc. These vectors have Km^R located between the flanking sequences of *csrA*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s001>

(TIF)

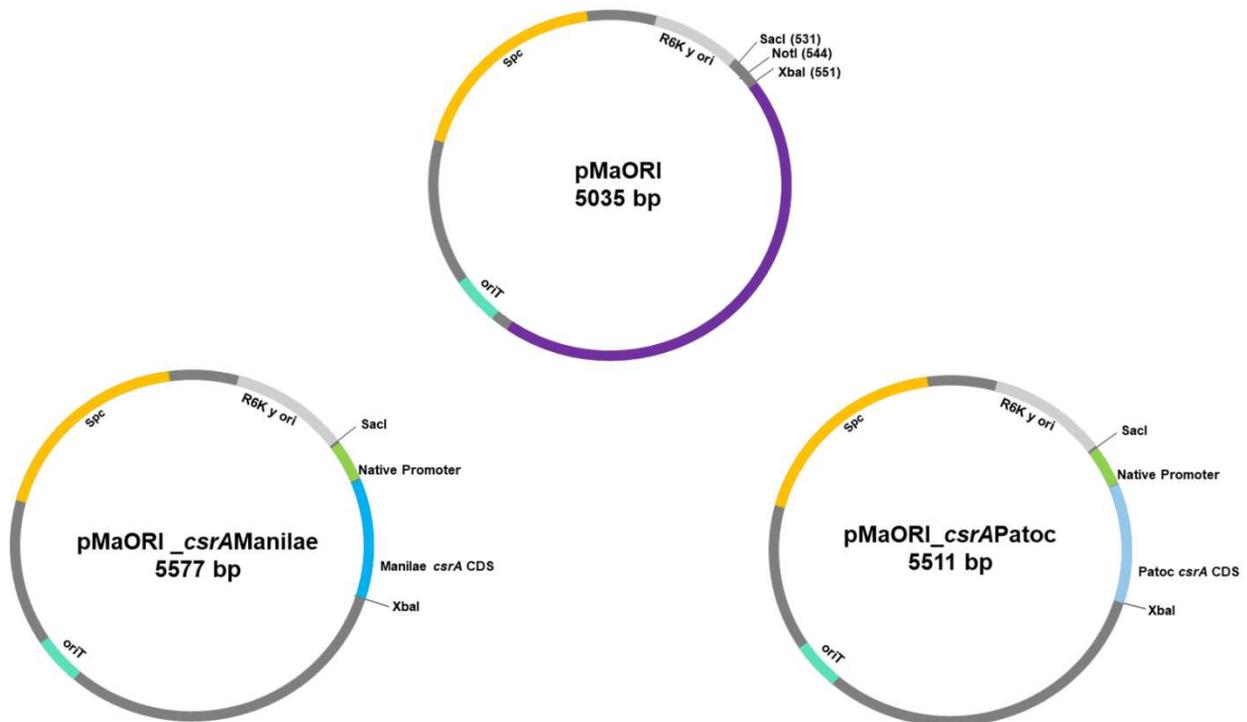


S2 Fig. Map of pMaORI used for complementation and overexpression.

pMaORI containing *csrA* of *L. interrogans* serovar Manilae and *L. biflexa* serovar Patoc with its native promoter.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s002>

(TIF)

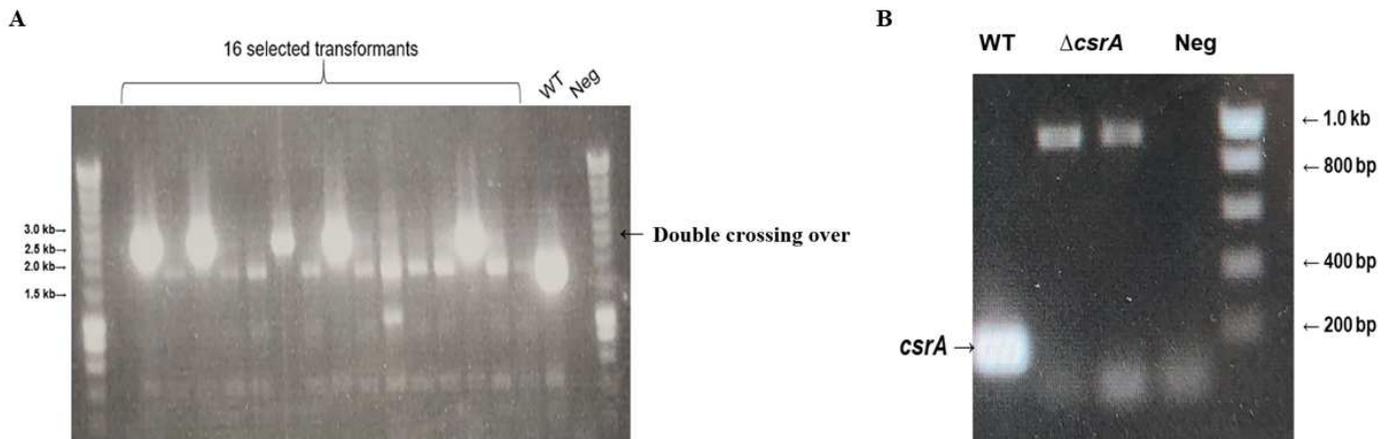


S3 Fig. PCR confirmation of *csrA* mutant strain in *L. biflexa* serovar Patoc.

(A) Genomic DNA of wild type and 16 selected transformants were prepared and amplified by PCR using specific primers that flanked sequences of *csrA* (Flk-L and Flk-R). (B) To confirm the absence of *csrA*, we amplified 2 transformants which were positive for double crossing over event using PCR with specific primers to the coding sequence of *csrA* (ORF-L and ORF-R).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s003>

(TIF)

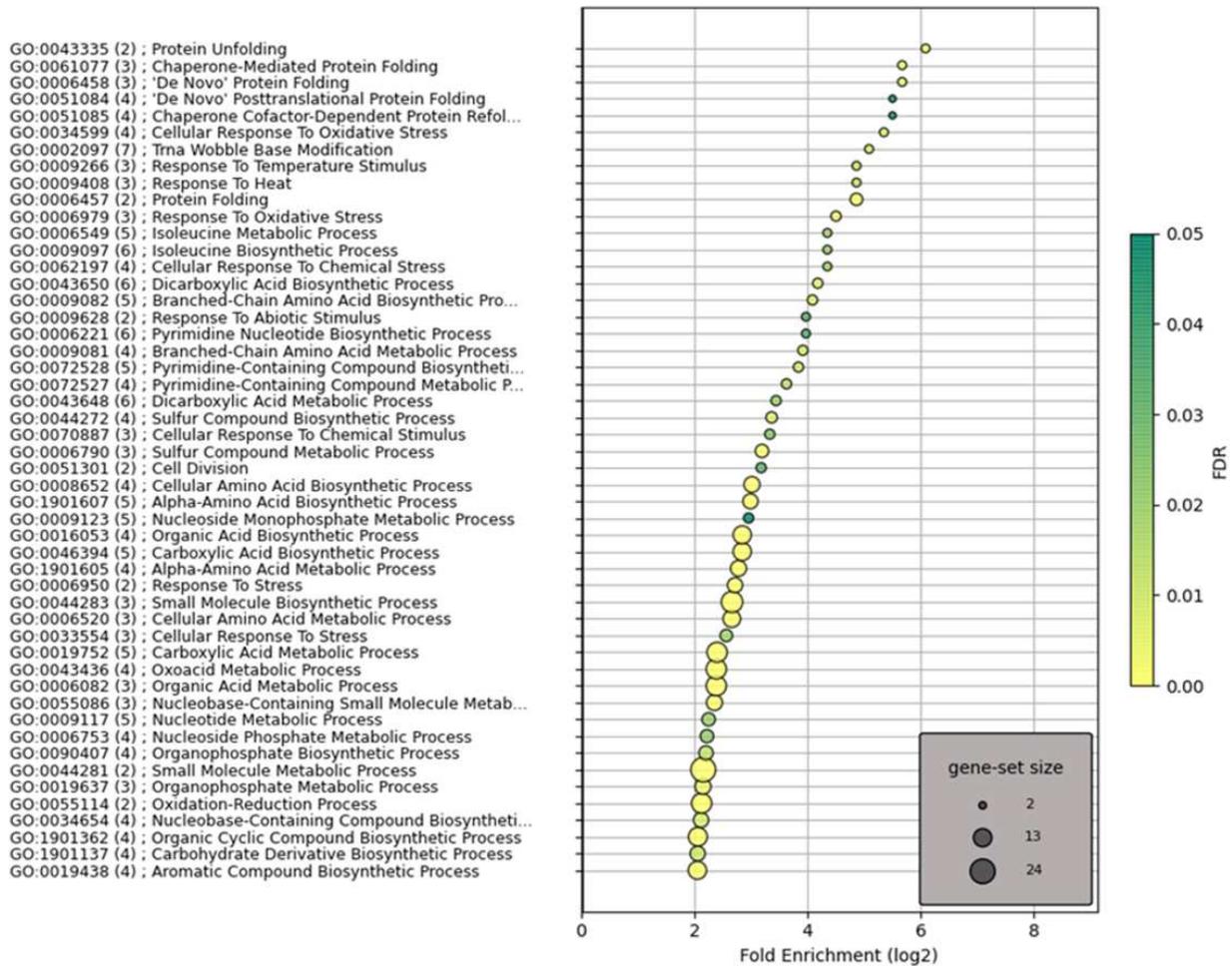


S4 Fig. GO term enrichment analyses on DEGs identified from WT and $\Delta csrA + pMaORI_PcsrA_{lb}$.

The significant enriched biological process for downregulated genes in the complemented strain are shown. No enriched GO terms were found in the upregulated genes in the complemented strain.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s004>

(TIF)

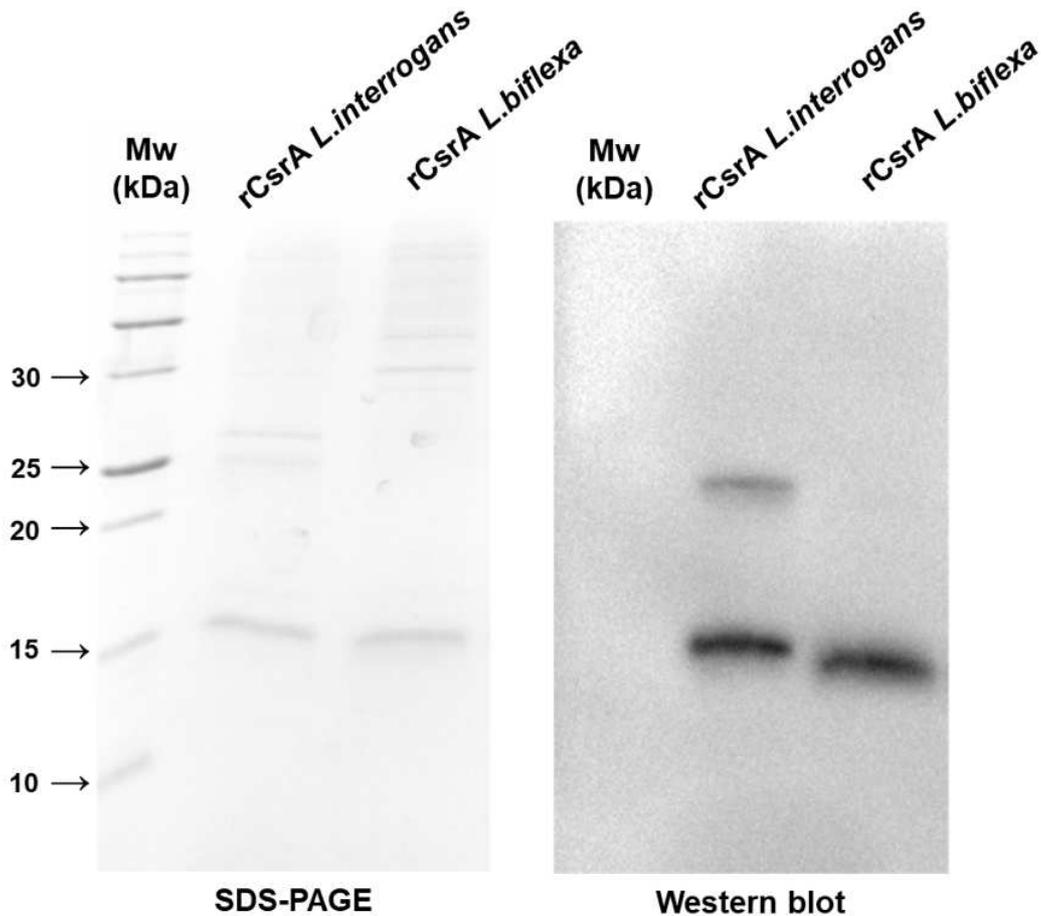


S5 Fig. Recombinant CsrA production.

PCR products of complete sequences of *csrA* either from *L. interrogans* or *L. biflexa* were cloned into pRSET-C expression vector, transformed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, and induced the expression IPTG. Purified N-terminal 6x His tag recombinant CsrA was subjected to 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Separated recombinant proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane, detected with mouse monoclonal antibody against 6xHis tag (primary antibody) and HRP-conjugated anti-mouse IgG (secondary antibody) using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s005>

(TIF)

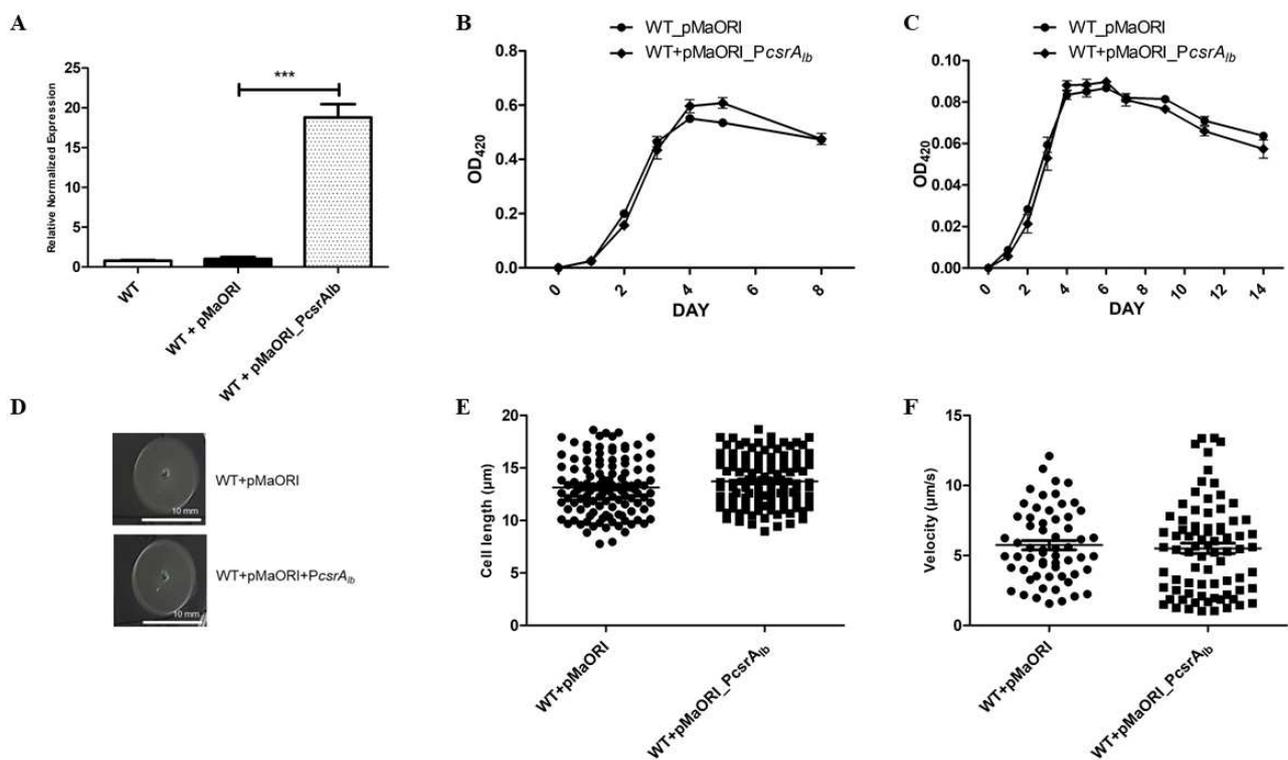


S6 Fig. Overexpression of *csrA* in *L. biflexa*.

(A) Overexpression of *csrA* in *L. biflexa*. To confirm overexpression of *csrA*, RNAs were extracted from each *Leptospira* strain and subjected to RT-qPCR. Results obtained from 3 independent cultures were presented as relative fold changes \pm SEM. *cysK* was used for normalization. (***) indicated p-value < 0.001 . The growth curve of *L. biflexa*. The 2×10^6 cells of each bacterial strain were grown in 10 mL of regular EMJH or 5-fold diluted EMJH in water, (B) represented growth in regular EMJH and (C) growth in 5-fold diluted EMJH. OD₄₂₀ measurement for growth was performed every 24 h. Results obtained from 3 independent experiments are expressed as Mean \pm SEM. (D) Soft agar assay of *L. biflexa*. *Leptospira* OD₄₂₀ = 0.1 were inoculated onto 0.6% semisolid EMJH plate and incubated at 30°C. (E) Measurement of cell length of *L. biflexa* (F) Measurement of velocity of *L. biflexa*. Late exponential phase of *Leptospira* grown in EMJH medium were measured for cell length and velocity under a dark-field microscope using cellSens software (OLYMPUS).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s006>

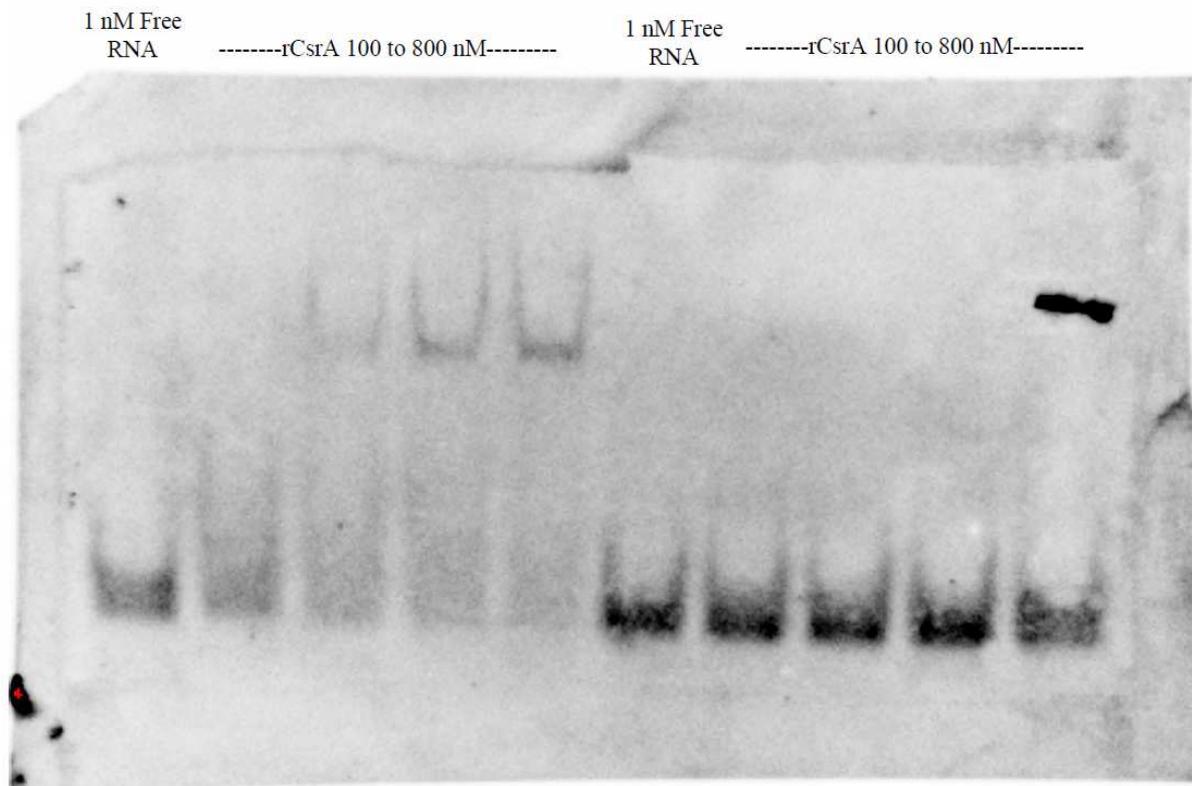
(TIF)



[S1 File.](#)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s007>

Fig 6B original image



(PDF)

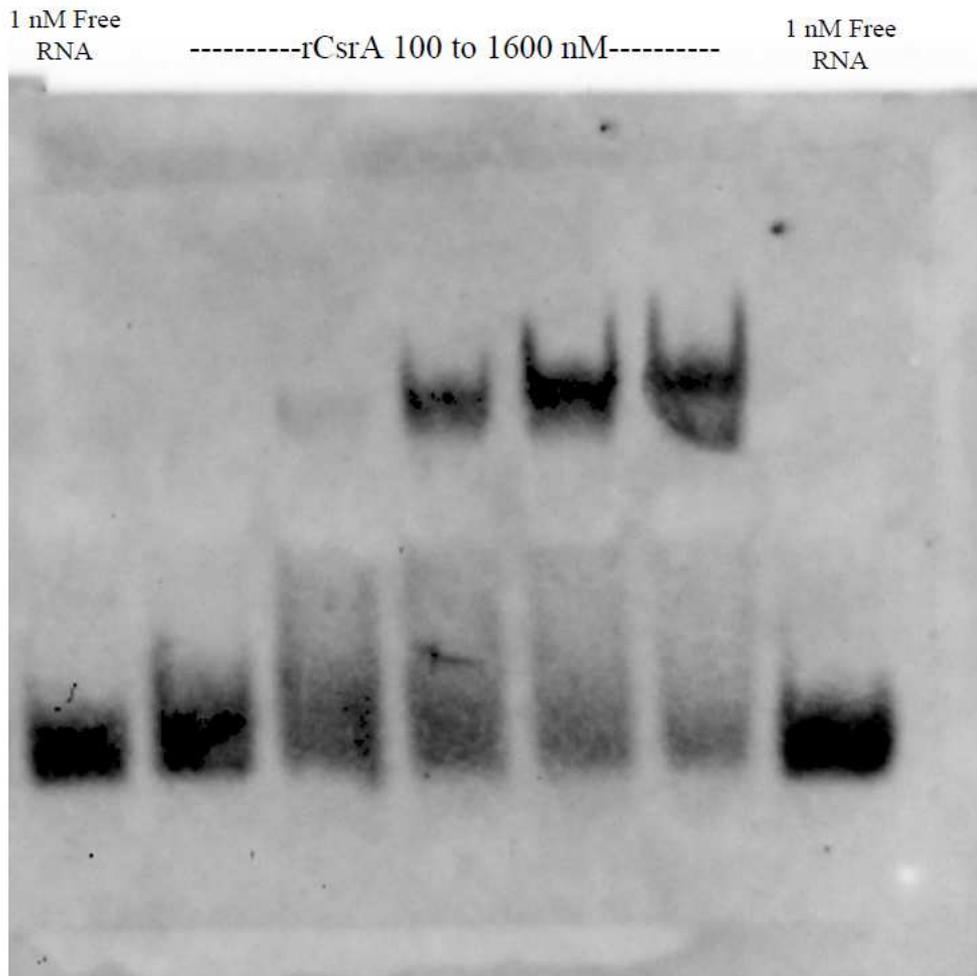
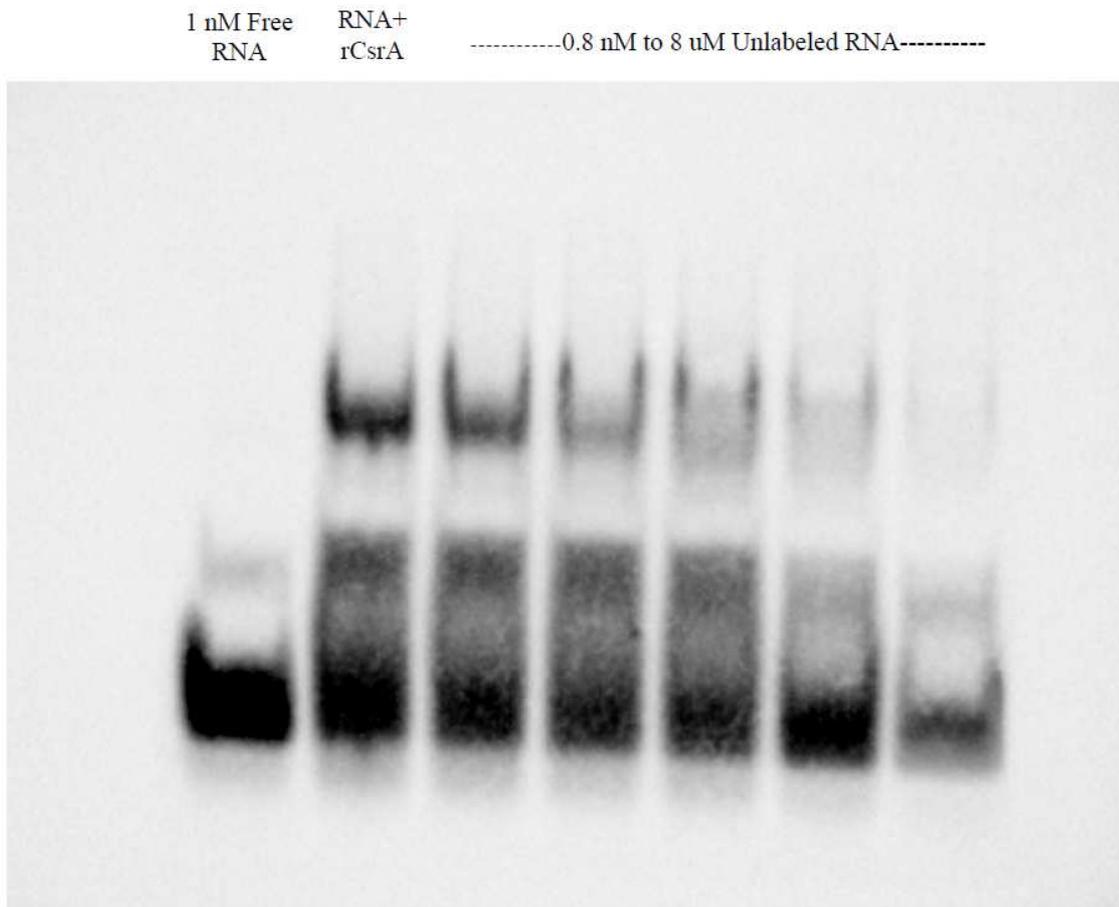
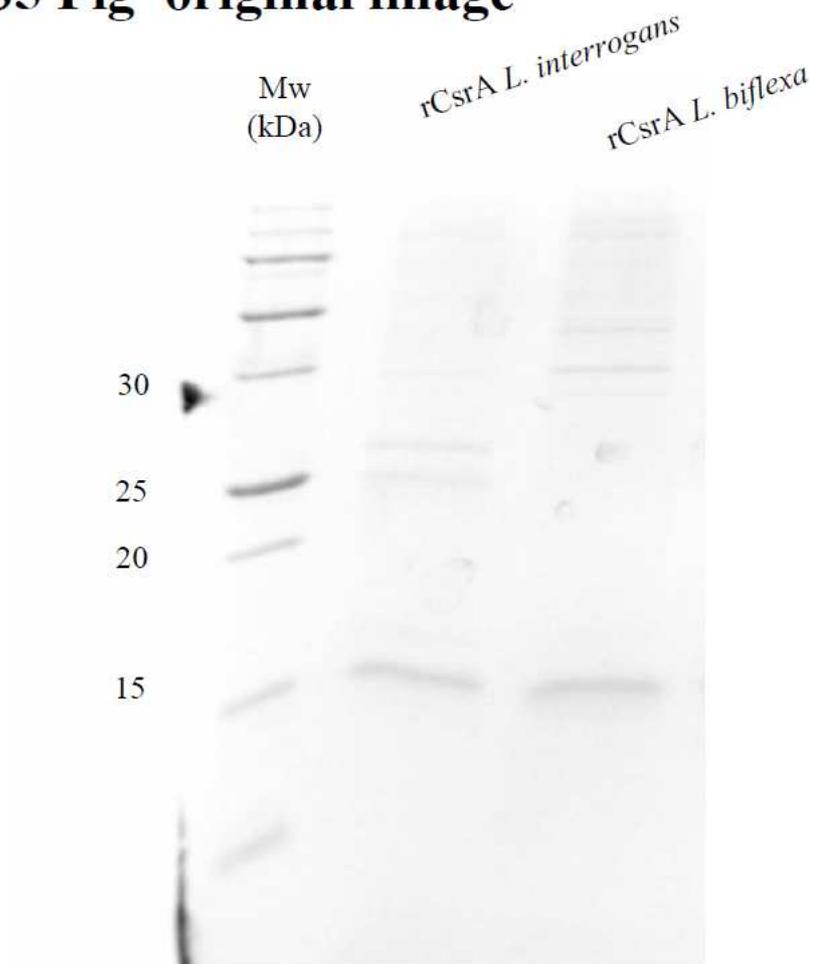
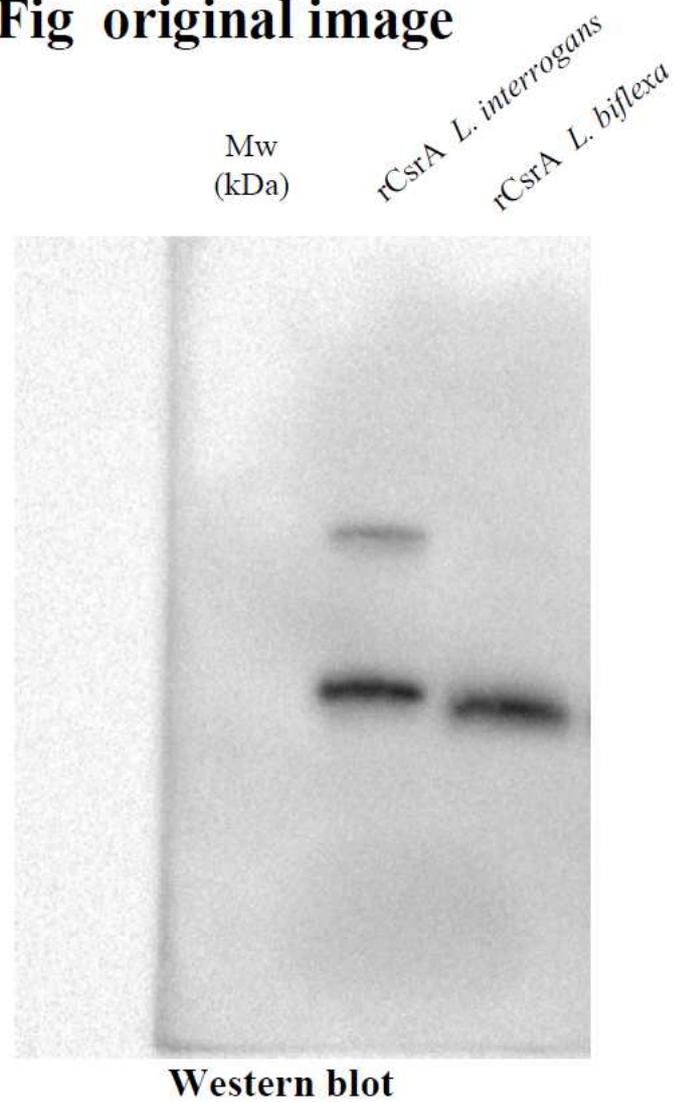
Fig 9C original image

Fig 9D original image

S5 Fig original image**SDS-PAGE**

S5 Fig original image

[S1 Table](#). Primers used in this study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s008>

(XLSX)

[S2 Table](#). Significantly deregulated genes in the $\Delta csrA$ and $\Delta csrA+pMaORI_PcsrA_{lb}$ with $\log_2FC > \pm 0.5$ cut-off and adjusted p-value of <0.05 .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s009>

(XLSX)

[S3 Table](#). Analysis of *flaB* 5' untranslated region.

^a Gene, ORF ID, Product, and Distance to the start codon are according to *Leptospira biflexa* serovar Patoc Patoc 1 and *L. interrogans* serovar Manilae strains. UP-MMC-NIID LP was obtained from MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis

Platform; <https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>. Underlined letters represented mismatch nucleotide compared to the consensus sequence. Bold letters represented the Shine-Dalgarno sequence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260981.s010>

(XLSX)



La leptospirose est une zoonose présente surtout dans les zones tropicales, transmise aux hôtes accidentels (humains, animaux domestiques ou d'élevage) par contact indirect avec l'environnement souillé par les urines des hôtes réservoir (rongeurs). L'infection par *Leptospira interrogans* et les autres leptospires pathogènes engendre chez l'humain des symptômes s'apparentant à un syndrome grippal. Non traitée, la maladie peut évoluer en sa forme grave, le syndrome de Weil, qui se manifeste par des ictères, une insuffisance rénale et des hémorragies pulmonaires.

Les leptospires appartiennent au phylum des Spirochaetes, reconnaissables à leur morphologie en forme d'hélice et à la présence de flagelles ancrés au sein du périplasme, s'allongeant des pôles en direction du milieu de la cellule – les endoflagelles. Cette morphologie leur confère un mécanisme de motilité unique dans le règne bactérien : les leptospires déforment leurs extrémités en forme de crochet ou de spirale, en fonction du sens de la rotation du flagelle, pour générer un déplacement translationnel. Ceci fait des spirochètes des pathogènes très invasifs, capables de traverser aisément les barrières épithéliales et les tissus afin de disséminer dans l'organisme.

Les leptospires possèdent un endoflagelle par pôle, ne s'entrecroisant pas au milieu de la cellule. Ils ont une composition protéique complexe : les corps basaux sont plus volumineux que ceux des espèces exoflagellées, et le filament est composé de plusieurs flagellines – quatre protéines de cœur et plus d'une dizaine de protéines de gaine, s'organisant de manière asymétrique autour du cœur flagellaire, entraînant un surenroulement du flagelle.

L'objectif de ce mémoire est d'élucider les mécanismes inhérents à la motilité des spirochètes en se basant sur le modèle de l'endoflagelle de *L. interrogans* (pathogène) et *L. biflexa* (saprophyte). Par l'étude phénotypique, transcriptomique et protéomique de plusieurs mutants de transposition de gènes de motilité, nous souhaitons apporter de nouvelles connaissances quant à la structure et la composition de l'endoflagelle, ainsi qu'à la régulation de la motilité des leptospires.

D'abord, je me suis intéressée au rôle des déterminants de la localisation et du nombre de flagelles, FlhF et FlhG. L'étude de deux mutants de transposition dans le gène *flhG* chez *L. interrogans* et *L. biflexa* démontrent que contrairement aux bactéries aux flagelles externes, les mutants *flhG*⁻ sont peu affectés au niveau de la polarité et du nombre de flagelles. Des reconstructions par cryo-tomographie ont montré un rapprochement du corps basal vers l'extrémité du pôle cellulaire, entraînant un défaut de motilité et une perte de virulence chez la souche pathogène.

Ensuite, j'ai étudié la contribution de la protéine majoritaire du cœur du filament, FlaB1, dans la motilité et la structure de l'endoflagelle. Le mutant *flaB1*⁻ chez *L. interrogans* est non-motile et avirulent, mais synthétise toujours des flagelles. L'analyse protéomique du mutant montre qu'un mécanisme de compensation est mis en place entre les quatre isoformes de la protéine FlaB et ceci a un impact sur la structure du filament, notamment au niveau de l'asymétrie de la gaine du filament.

En conclusion, au cours de ma thèse, j'ai analysé les mécanismes moléculaires sous-jacents à la localisation des endoflagelles et à la structure asymétrique des filaments flagellaires chez les leptospires. Ces découvertes devraient permettre de mieux comprendre l'organisation des endoflagelles chez les leptospires et, par extrapolation, une meilleure compréhension des avantages évolutifs de la motilité atypique des spirochètes.