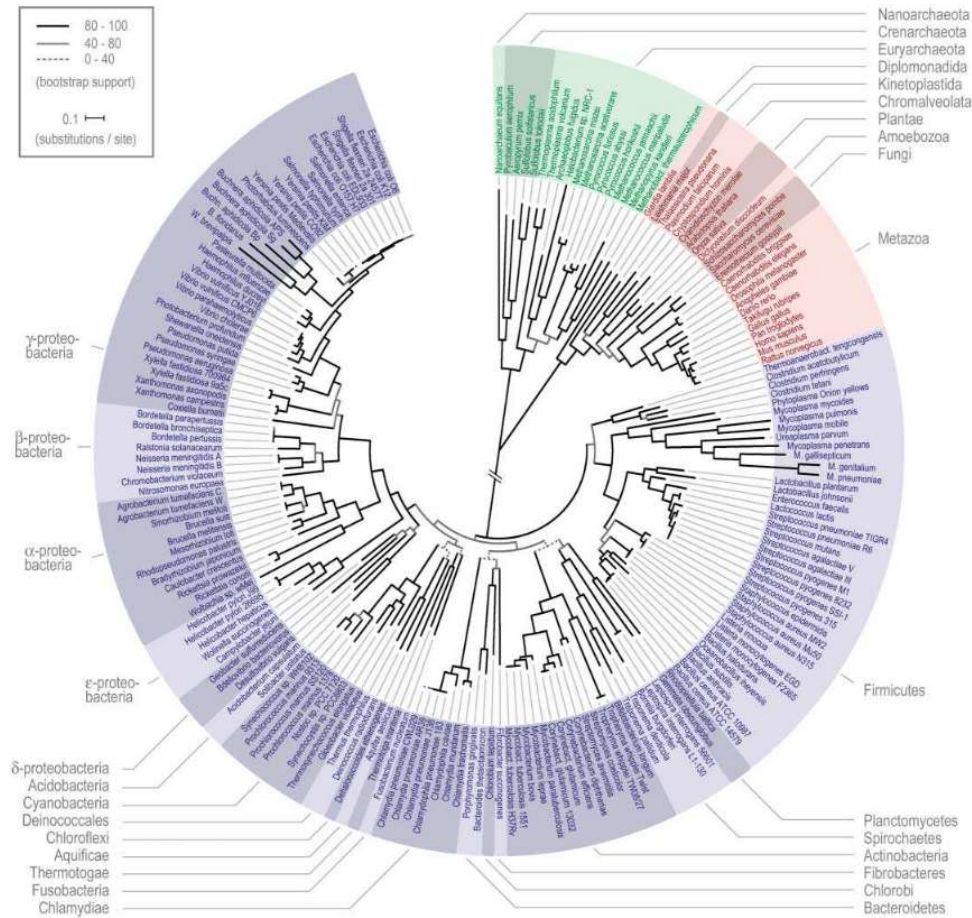


# Evolution des Procaryotes sous le prisme de la Différenciation Cellulaire



D'après Ciccarelli et al., 2006.

UE: Evolution et Biodiversité Microbienne  
 Christophe Regard  
 (christophe.regard@universite-paris-saclay.fr)

## Plan du cours:

I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.

II-Exemple d'un protiste dont la différenciation et la « sexualité » est sous l'influence des bactéries.

III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxococcales.

V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

VII-Conclusions-Questions

Notion à retenir: ★

A vous de faire le commentaire:



Notion à comprendre:



# I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.



Les cellules présentes sur terre sont en majorité Procaryotes : Nombre de cellules animales estimé à  $1.3 \times 10^{26}$ , de plantes à  $2.45 \times 10^{28}$ , de procaryotes à  $5 \cdot 10^{30}$ . (d'après Landenmark et al, 2015).

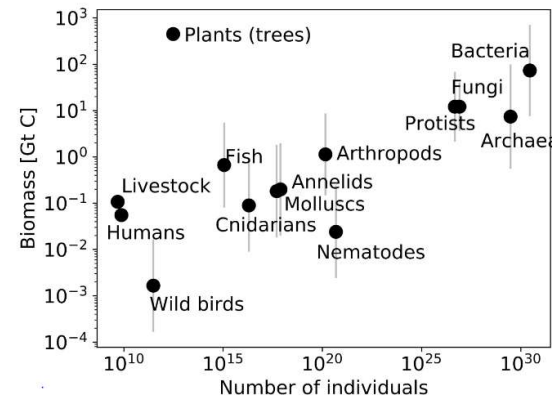


40-50 % de la biomasse sur Terre?

Table 1. The total DNA content in the biosphere

	DNA amount (Mb)
Prokaryotes	$1.6 (1.1) \times 10^{31}$
Unicellular eukaryotes	$1.3 (0.9) \times 10^{29}$
Fungi	$1.7 (3.4) \times 10^{27}$
Animals	$4.2 (1.5) \times 10^{29}$
Plants	$3.6 (3.4) \times 10^{31}$
Viruses	$4.0 (3.4) \times 10^{29}$
<b>Total</b>	<b><math>5.3 (3.6) \times 10^{31}</math></b>

(d'après Landenmark et al, 2015)



(d'après Bar-On et al, 2018)

Production cellulaire / an chez les procaryotes:  $1.7 \times 10^{30}$  cellules

(D'après Whitman et al. 1998)

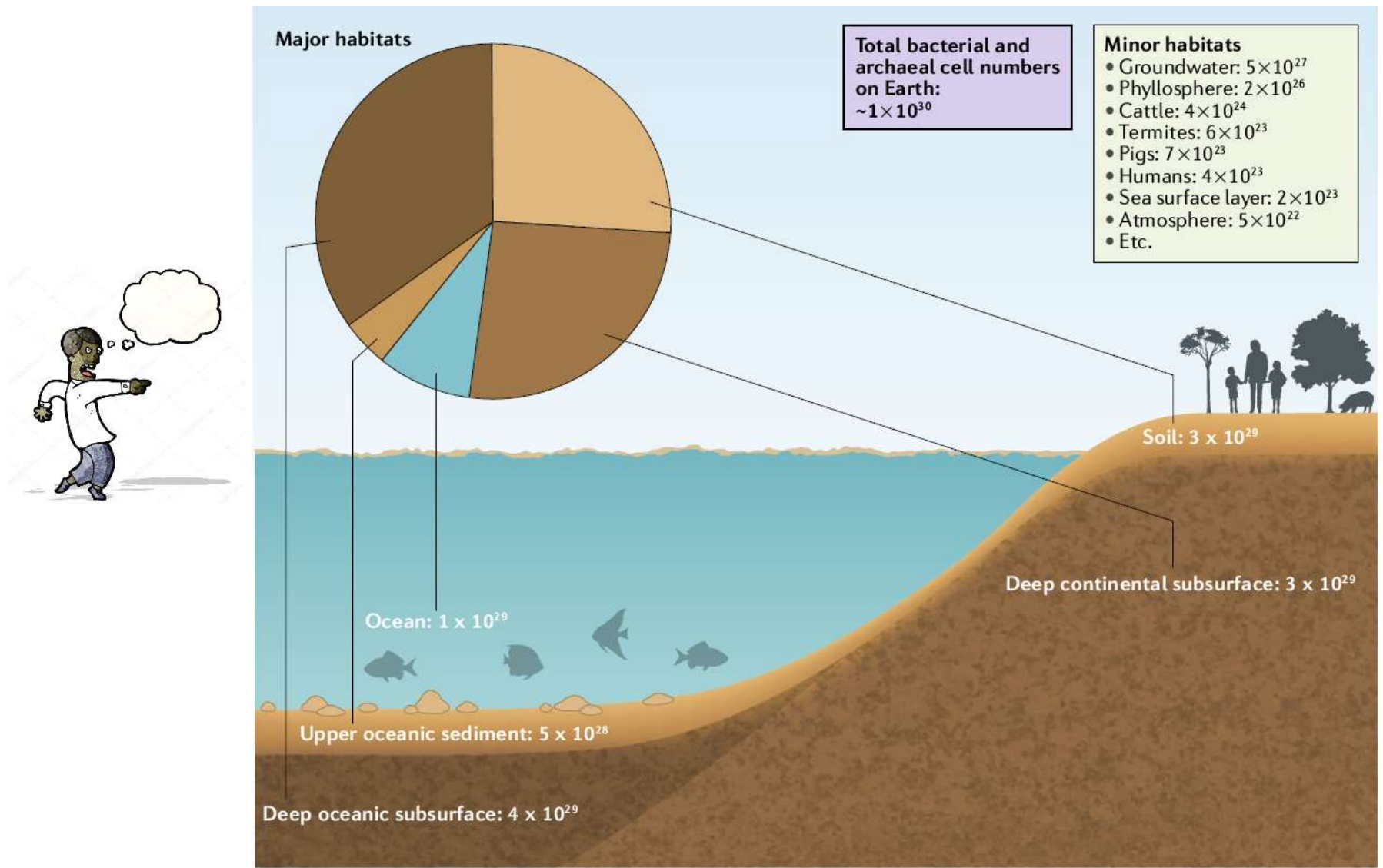
80% des procaryotes vivent sous une forme adhérente. (d'après Richards et al, 2009).

Les microorganismes sont les acteurs prépondérants des cycles de la matière.

95% des microorganismes ne sont pas cultivables.



# I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.



(d'après Flemming et Wuertz 2019)

## I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.

Dans l'esprit populaire:

Microorganisme = 1) invisible → OK

2) simple → Faux



De nombreux microorganismes ont développées des stratégies de vie complexe pouvant menées à des phénomènes de différenciation cellulaire. Le *simple* devient alors **ingénieux**.

## I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.



### Définitions:

**Processus biologique qui conduit à la spécialisation des cellules, qui acquièrent des propriétés spécifiques.**

La différenciation cellulaire (ou développement), selon les auteurs correspond à des « sens » différents.

- 1) Changements ou série de changements stables ou métastables au cours du cycle de vie d'un organisme.
- 2) Changements entraînant des différences de composition moléculaire en fonction du temps de vie d'une cellule et/ou de l'espace d'une cellule.
- 3) Changements modifiant une cellule mère d'un point de vue **fonctionnel** et/ou **morphologique**.

Chez les Procaryotes, cette notion est quelque fois difficile à définir.  
Est-ce qu'une bactérie adhérente à une surface est suffisamment différente d'une bactérie « planctonique » pour être considérée comme « différenciée »?



# I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.

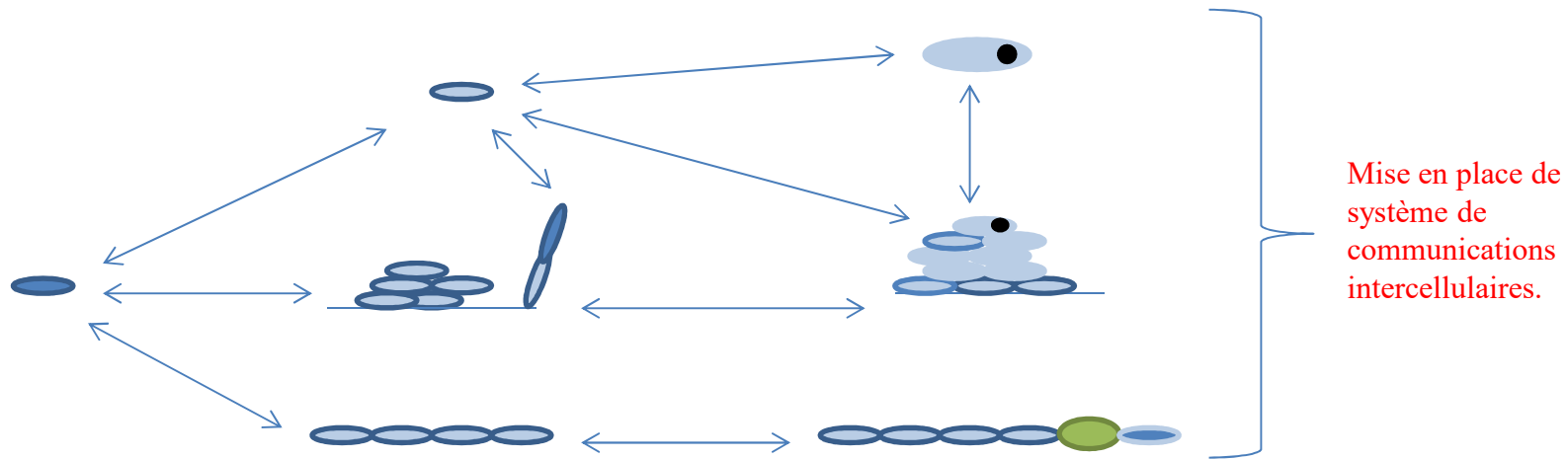
Ces changements nécessitent une coordination selon le temps et/ou selon l'espace.

Donc des contrôles sont nécessaires pour que les « changements » ne soient pas anarchiques.

- Contrôle de la production de substances.
- Contrôle du temps d'apparition de ces substances.
- Contrôle de la compartimentation (localisation) de ces substances.



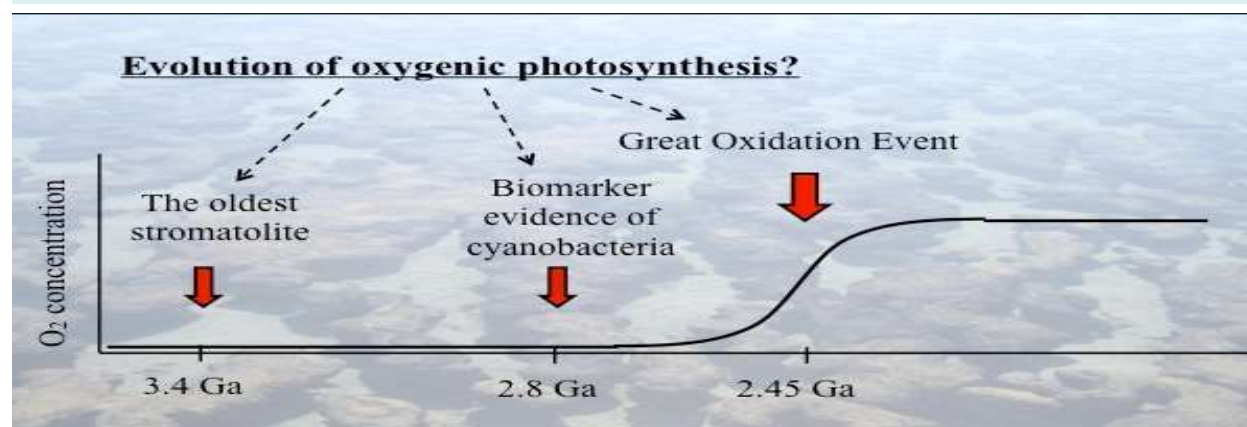
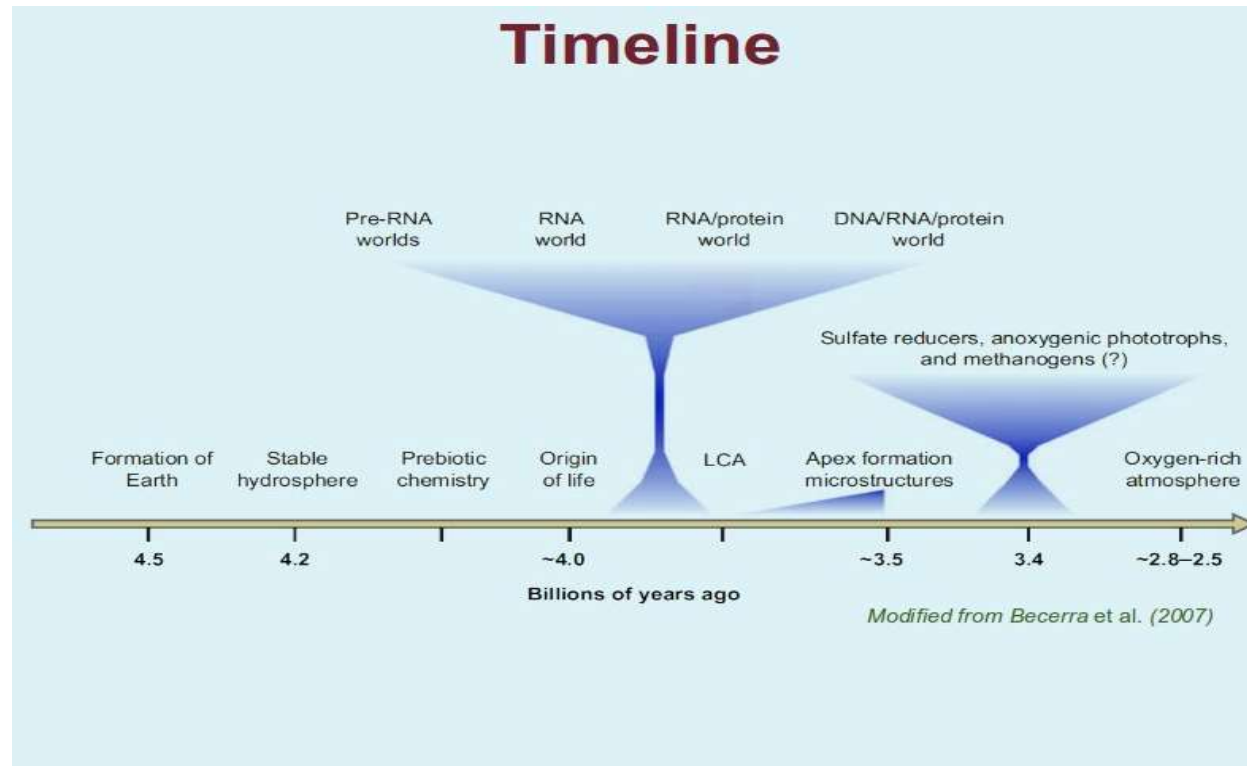
Existence d'un continuum évolutif avec des degrés divers de différenciation/spécialisation chez les procaryotes:



Cellule mère-----Spécialisation réversible-----Spécialisation irréversible : Différenciation  
Croissance « optimale »-----carence/multicellularité-----mutations sélectives-----

# I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.

## Evolution liée à l'histoire de la Terre.



## I-Quelques Rappels ....notions, définitions, ordres de grandeurs à retenir.



**La multicellularité est probablement un événement majeur ayant contribué à l'évolution des organismes vivants et à l'émergence des Eukaryotes.**

Environ 25 événements différents et indépendants ont menés à l'apparition d'agrégats cellulaires:

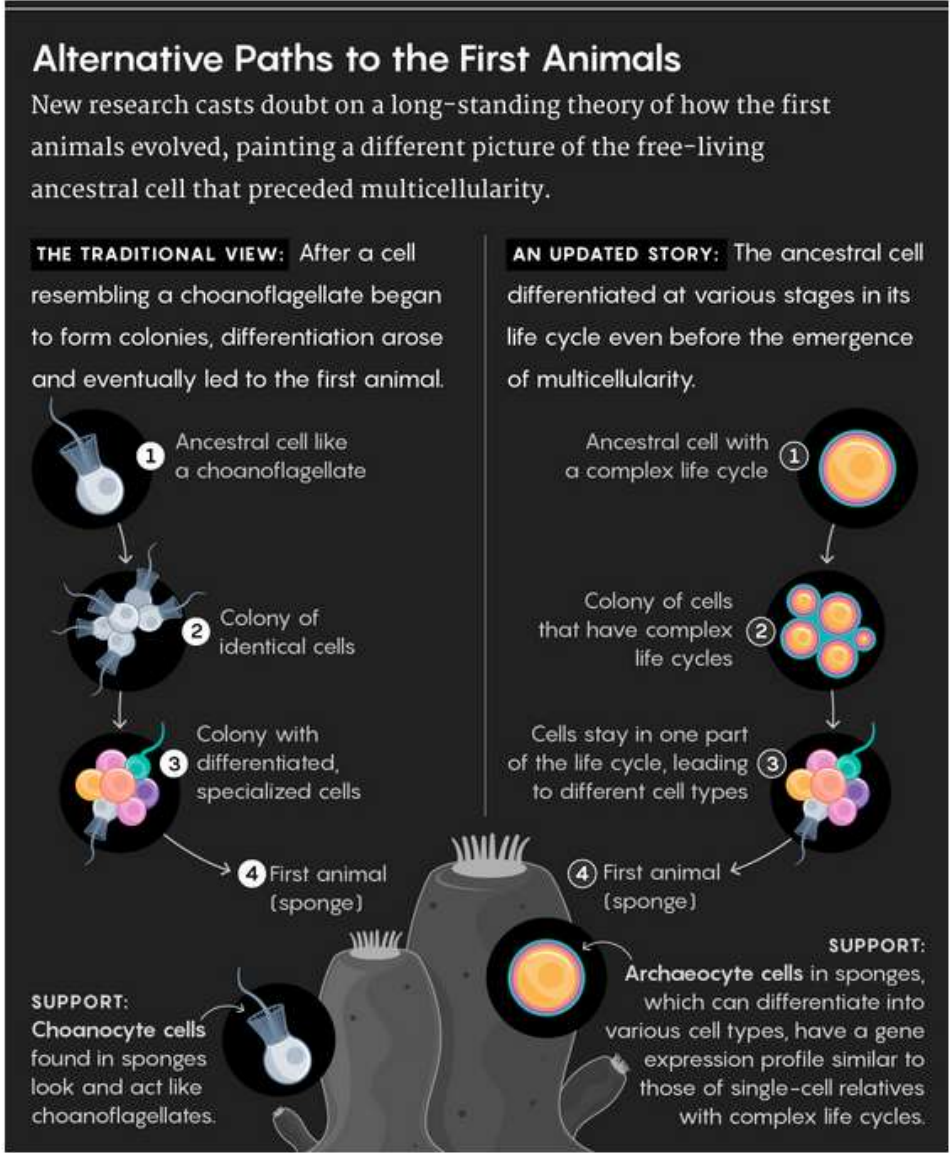
- Cluster de cellules par proximité et confinement spatiale.
- Forces physiques (flux, pression etc...) contraignantes: même localisation.
- Phénomène de coopérativité.
- Mutations empêchant le retour à la cellule unique.

2 cas possible :      -Sorocarpique : agrégation

                                 - Zygotique : clonal



# II-Exemple d'un protiste dont la différenciation et la « sexualité » est sous l'influence des bactéries.





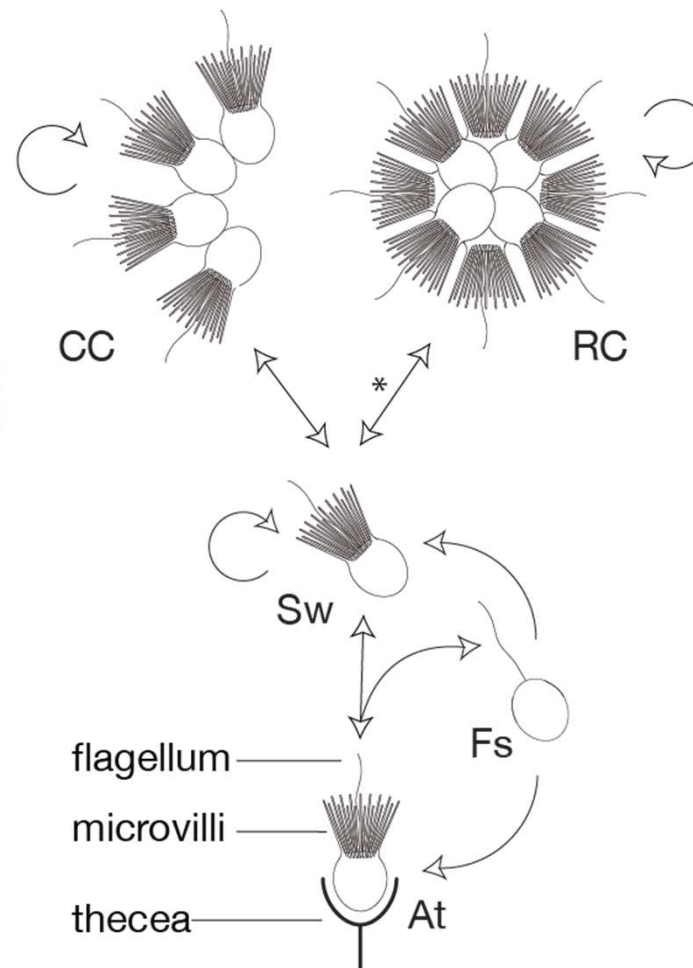
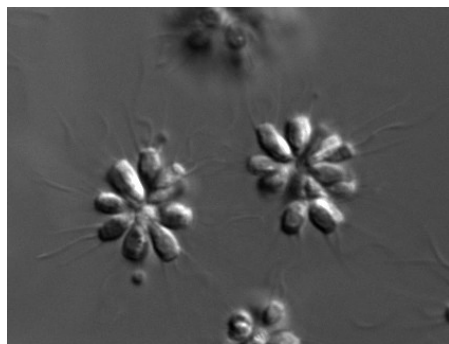
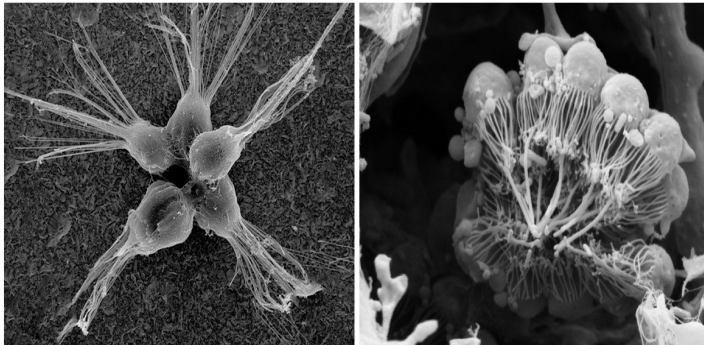
## II-Exemple d'un protiste dont la différenciation et la « sexualité » est sous l'influence des bactéries.



*Salpingoeca rosetta*, un protiste dont la multicellularité **zygotique** est sous l'influence d'une bactérie.

Eukaryota, Class: Choanoflagellata, eaux marines, se nourrit de bactéries.

En carence nutritive, les cellules haploïdes deviennent diploïdes par fusion. Cette sexualité peut être induite par la présence de bactéries



5 « formes de vie »:

At : Attachées

Fs: nage rapide

Sw : nage lente

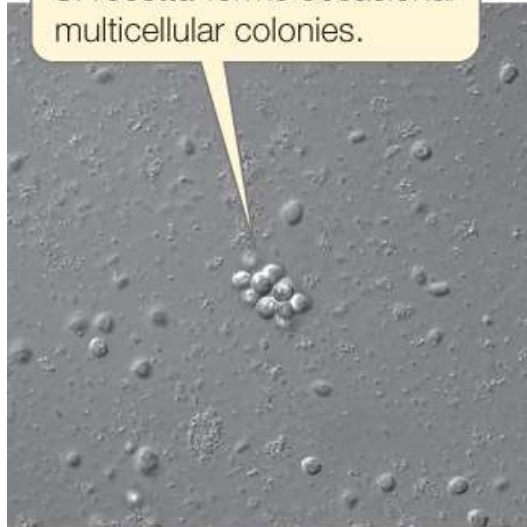
CC : chaîne linéaire

RC: association en rosette

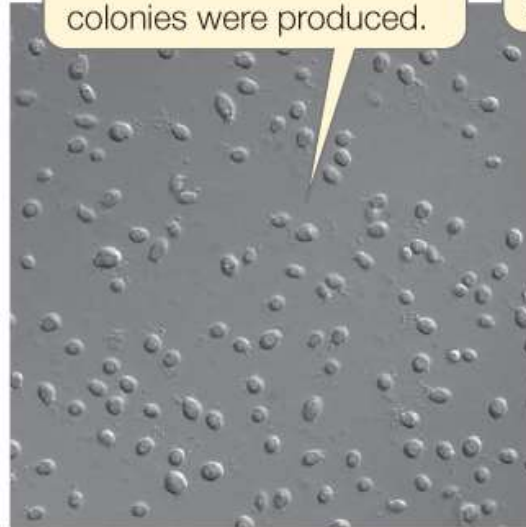


pone.0095577.s005.mov

In an environmental sample with many diverse bacteria, *S. rosetta* forms occasional multicellular colonies.



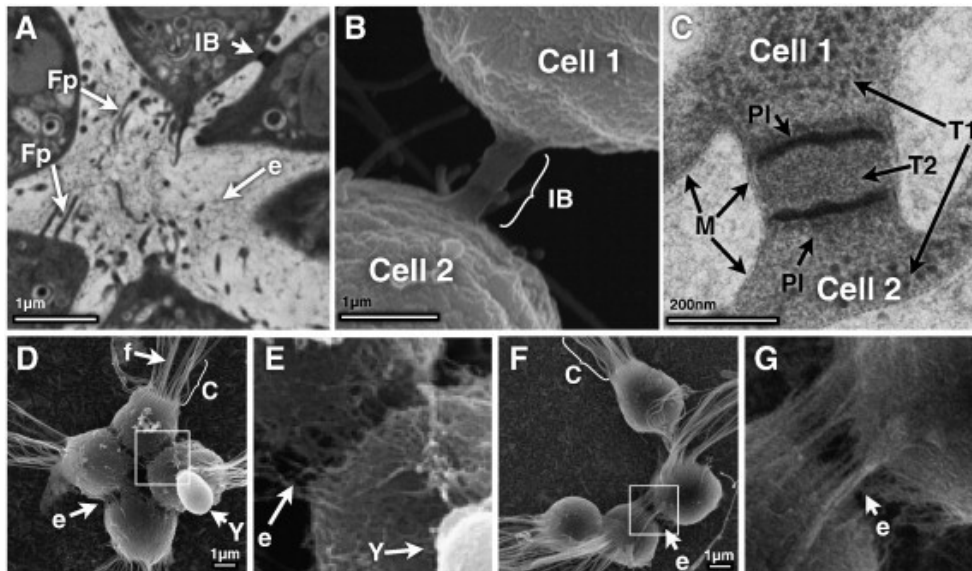
After treatment with antibiotics, no multicellular colonies were produced.



The addition of high concentrations of planktonic bacteria in the genus *Algoriphagus* induces the *S. rosetta* to form multicellular colonies.



23.3: From Alegado et al. 2012, eLife 1:e00013.



Cells within rosette colonies are attached to one another with ECM, [filopodia](#), and [intercellular bridges](#). (A) TEM of a thin section through a rosette shows filopodia extending into the central ECM and an intercellular bridge connecting neighboring cells. (B) SEM of an intercellular bridge. (C) TEM of a thin section through an intercellular bridge shows two electron-dense plates trisecting the bridge (see also Movie 5). The texture of the cytoplasm within cells (T1) differs from that within the bridge (T2). (D,E) SEM of a rosette colony shows a shared, filamentous ECM linking *S. rosetta* cell bodies. ECM is absent from co-cultured yeast cells (included as a negative control). (F,G) Cells in chain colonies share ECM filaments (e), but lack filopodia. Key: f: [flagellum](#), C: collar, IB: intercellular bridge, Fp: filopodia, E: ECM, Y: yeast, PI: bridge plate, M: [cell membrane](#). Scale bars as marked. (Dayel et al, 2011)





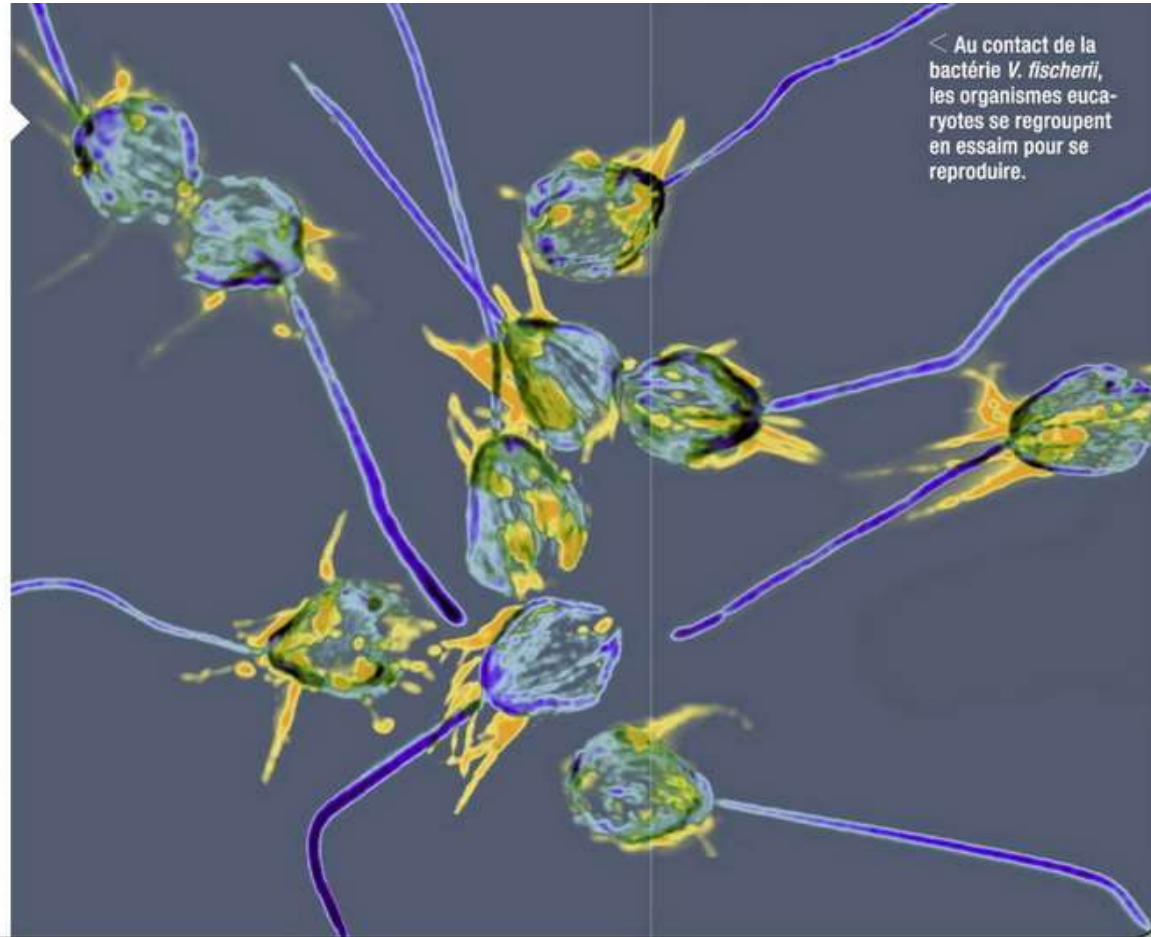
## II-Exemple d'un protiste dont la différenciation et la « sexualité » est sous l'influence des bactéries.

REPRODUCTION

### UNE BACTÉRIE A LE DON DE FAIRE S'ACCOUPLER DES UNICELLULAIRES

Une bactérie peut induire un comportement sexuel chez un organisme vivant ! Une équipe de l'université de Californie à Berkeley (Etats-Unis) était en train d'étudier l'implication de différentes bactéries sur l'évolution de *Salpingoeca rosetta*, un eucaryote unicellulaire vivant dans l'eau salée. Lorsque les chercheurs ont ajouté une de ces bactéries, *Vibrio fischerii*, aux coupelles remplies des minuscules flagellés, ces derniers se sont regroupés par essaims et ont débuté l'accouplement – qui consiste, pour ces organismes, en une fusion de

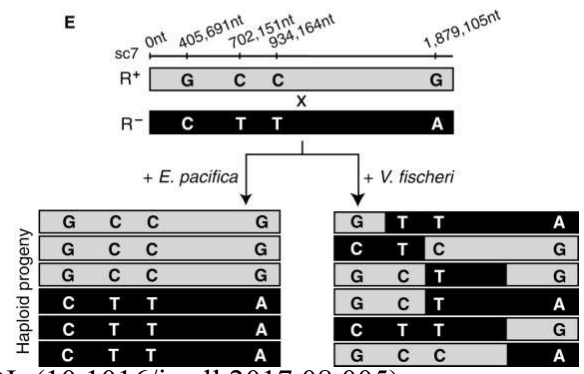
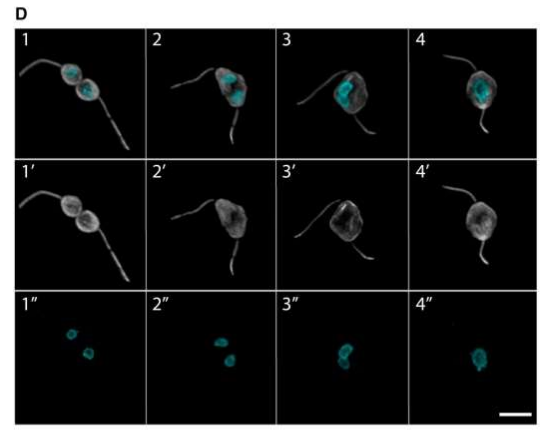
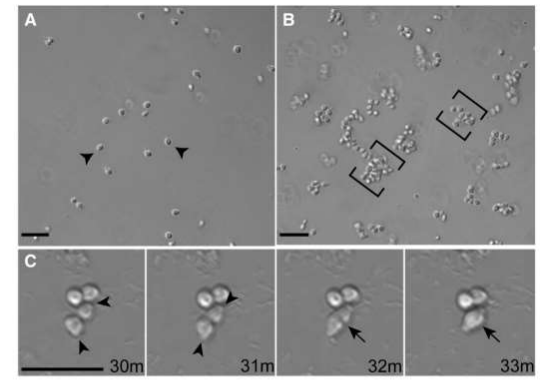
leur matériel génétique puis une division, sur le principe de la méiose. Conclusion de cette observation : *V. fischerii* sécrète une molécule à laquelle *S. rosetta* ne résiste pas. Il s'agit d'une protéine jusqu'alors inconnue, et que les chercheurs ont baptisée EroS, pour *Extracellular regulator of Sex*. Cette découverte aura certainement des implications sur notre compréhension de la sexualité, puisque *S. rosetta* est l'ancêtre le plus primitif du règne animal. De quoi obtenir de nouvelles réponses sur les symbioses entre bactéries et animaux. **A.P.**





mmc2.mp4

*V. fischeri* Bacteria Induce Swarming and Mating (sorocarpique agregation) in the Choanoflagellate, *S. rosetta*.





## II-Exemple d'un protiste dont la différenciation et la « sexualité » est sous l'influence des bactéries.

### EroS Protein Is a Chondroitinase

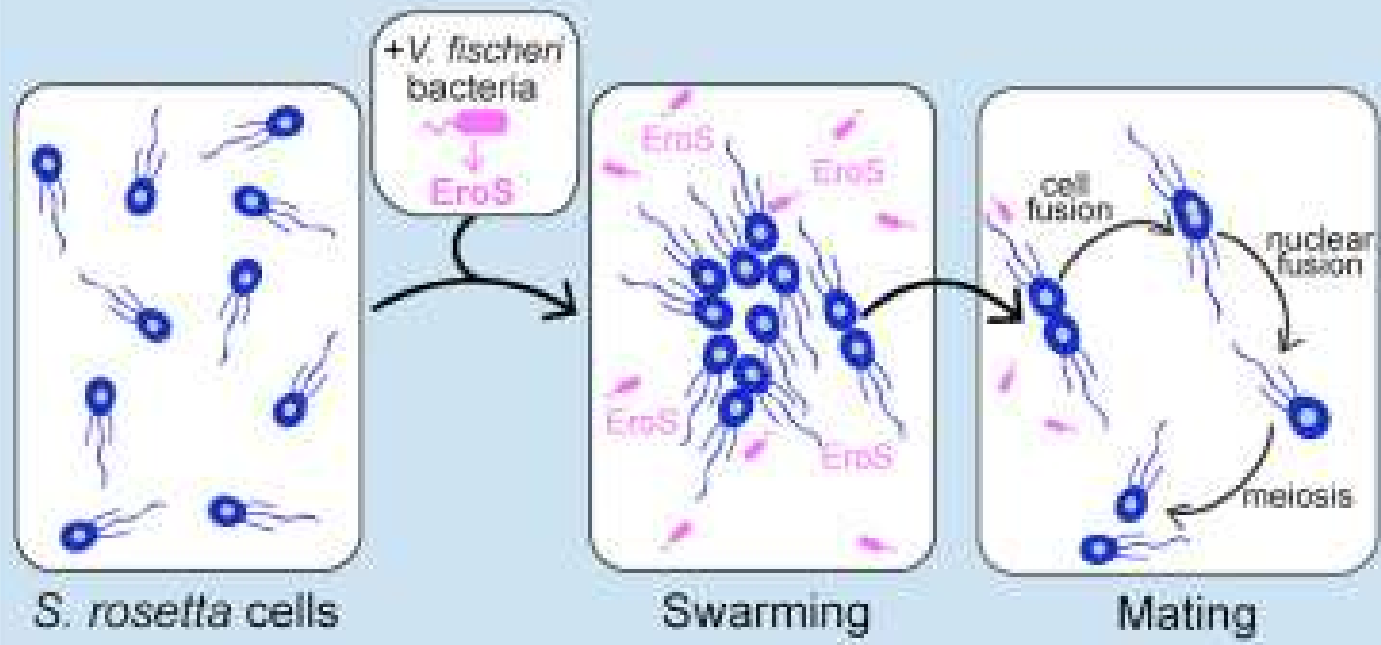
- 90 kDa uncharacterized *V. fischeri* protein VF\_A0994 : EroS = extracellular regulator of sex.
- The *eroS* gene was expressed in *E. coli* and found that the purified protein recapitulated the swarm-inducing activity of live *V. fischeri*.
- Contains a predicted glycosaminoglycan (GAG) lyase domain.
- GAGs are linear polysaccharides

EroS harbors conserved residues at sites required for catalytic activity (His-278 and Tyr-287). Alanine substitution at conserved catalytic residues (His-278 and Tyr-287) eliminated its ability to induce swarming in *S. rosetta*. Chondroitin lyases from other bacteria (ABC chondroitinase from *Proteus vulgaris* and AC chondroitinase from *Flavobacterium heparinum*) induced swarming and mating in *S. rosetta*.

A

<i>V. fischeri</i>	SOATAALPAMIEYV--SEGDDGYITDGSFLOHSDIAYNGTYGNVLLGGLGIQNAVAGSPVSTDNQTSMV 317
<i>A. aurescens</i>	NHAAALAQWQYV--TSGDGLRDGSFTQHSTTPYTGSGWLLTGLNLFSLLAGTAFEVSPTRSF 272
<i>F. heparinum</i>	SFAVIELFYPVQSV--HYEEGLQYDYSYLOHGPQLQZSYGAVFITGLNLANYRDTPYALSTEKIAIF 242
<i>S. coelicolor</i>	ALARDALPVPFYPV--TKGDGLYADGSFVQHTWVAYSGTYGQVMLDGLGRLLFTLLAGSEMIVTPGRQV 283
<i>S. agalactiae</i>	EKTSYSLKNEFTTA--TKAEGFYADGSYLDHINVAYTGAYGNVLDGLTQLPLAQETDYKLSNQEIDV 606
<i>P. vulgaris</i>	NTFSYELGALTQVPPGGKDGLRPDGIAWRHEGNLYPCYGFPAFKNASQLIYLLRDTPFSVGSQWNN 538

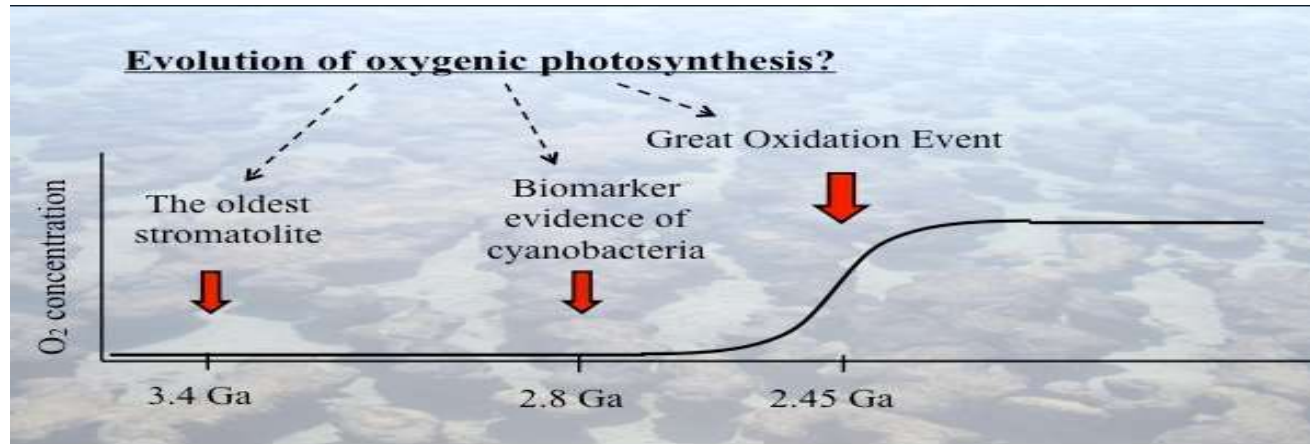






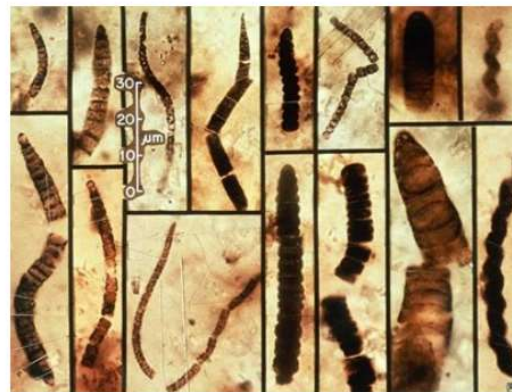
### III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

La multicellularité chez les procaryotes existait avant l'émergence des Eucaryotes



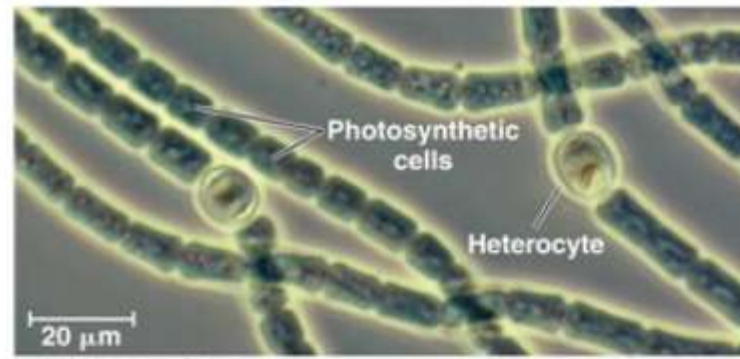
### Earliest Evidence of Life

- Oldest fossil organisms: photosynthetic cyanobacteria
- Western Australia
- 3.5 bya



### III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

## Fossil vs. Living Cyanobacteria





III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

## **Cyanobacteria: evolutionary history**

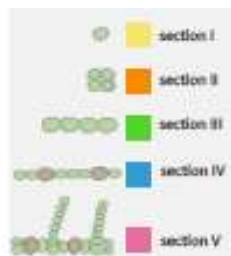
Oldest photosynthetic organisms, oldest fossil records ca. 3500 million years

Dominant form of life on Earth 1500 - 600 million years before present (BP) (e.g stromatolites)

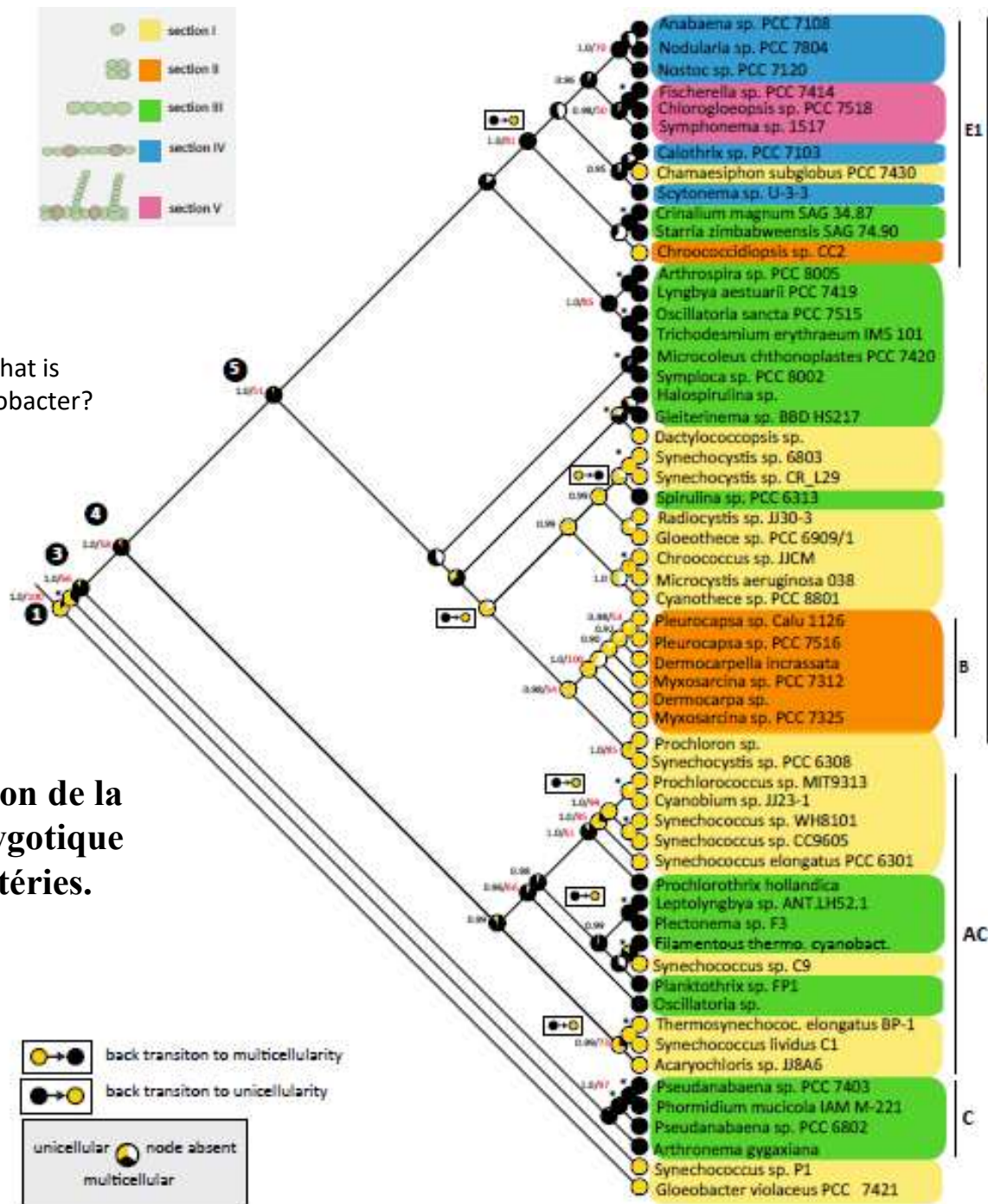
Photosynthesis resulted in a gradual increase of O<sub>2</sub> in the atmosphere

Primary endosymbiosis lead to algal chloroplasts ca. 1600 million years ago

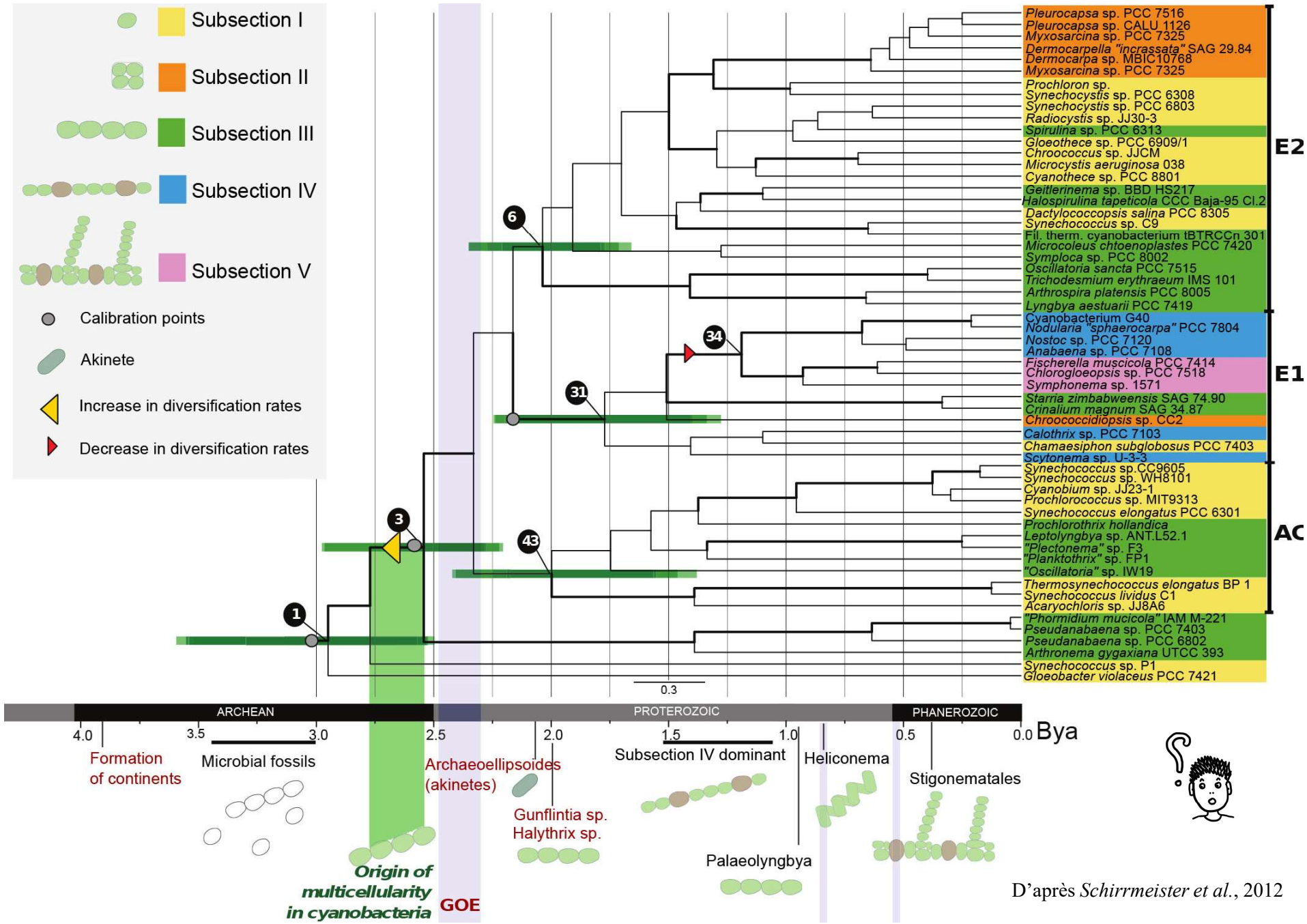
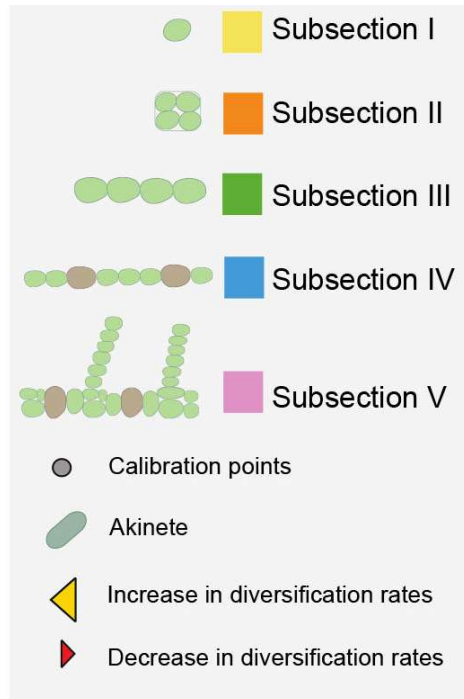




What is Gloeobacter?



**Pertes et acquisition de la multicellularité zygotique chez les cyanobactéries.**



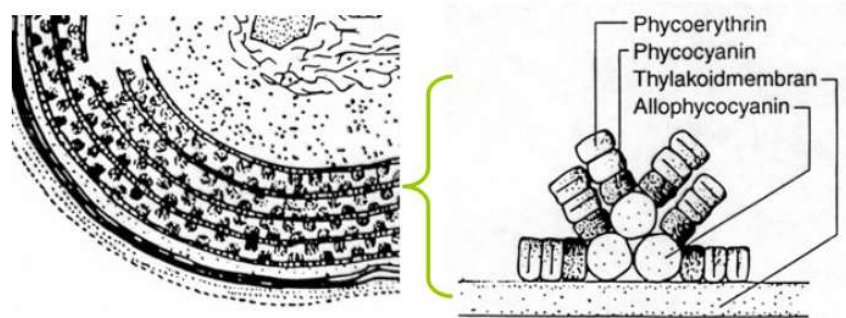
D'après Schirrmeyer et al., 2012



## Cyanobacteria: general characteristics

### Ultra structure:

Thylakoids with phycobilisomes



## Cyanobacteria: general characteristics

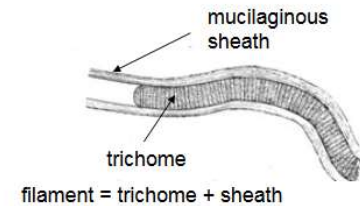


**Cell wall:** as Gram-negative bacteria

central layer: murein (peptidoglykan)

Outside the cell wall a ± thick layer of polysaccharides and polypeptides may form a sheath in some filamentous forms. The sheath may be brownish in color, due to scytonemin (UV absorbing protecting pigment)

The cell row itself is called **trichome**



## Cyanobacteria: systematic characters

### Morphology

#### Unicellular

as colonies



(Order Chroococcales)

single cells



attached (cells polar)

free living

## Cyanobacteria: systematic characters

### Morphology

#### Multicellular (filamentous)



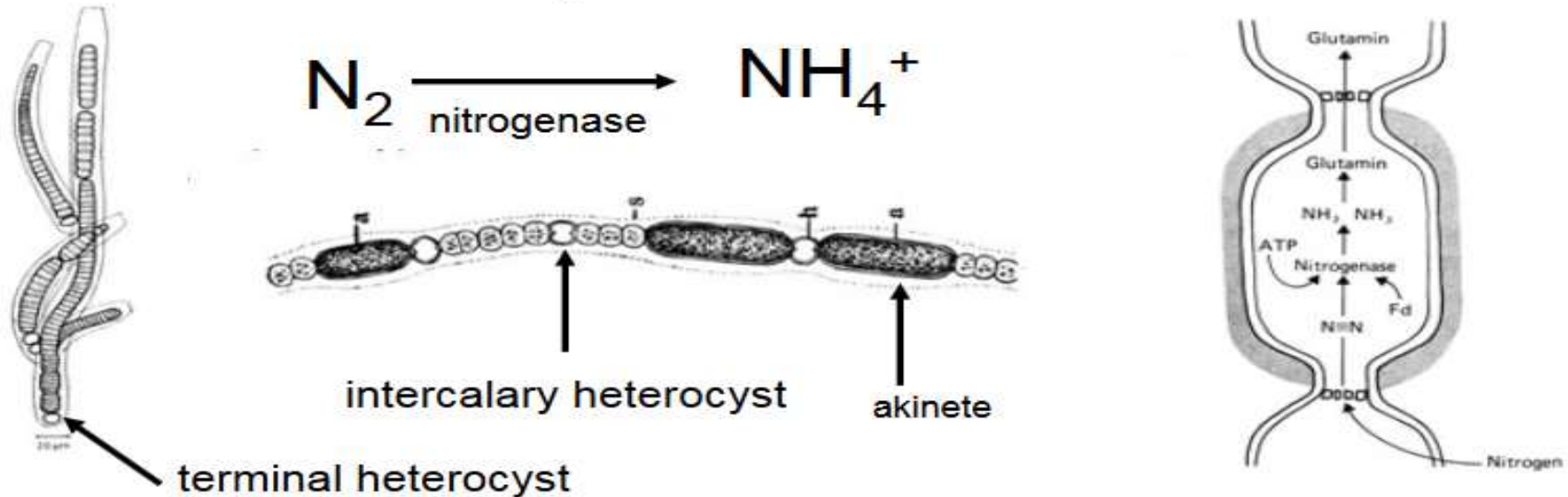
uniseriate trichome



multiseriate trichome

# Cyanobacteria: systematic characters

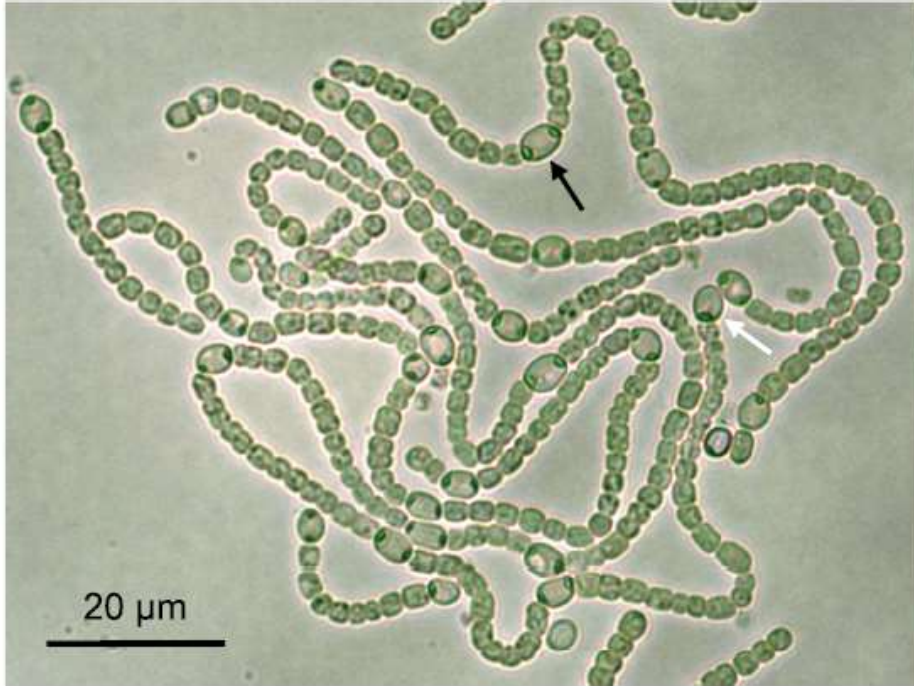
**Heterocytes (heterocysts)** are cells with nitrogen fixation as a special function. Heterocytes only present in some filamentous forms (Nostocales, Stigonematales), though N-fixation may occur also in some non-heterocysteous forms



Les nitrogénases sont sensibles à l'oxygène.

Heterocystes : environnement micro-oxique, pas de PSII, ni RubisCO ( $CO_2$ )

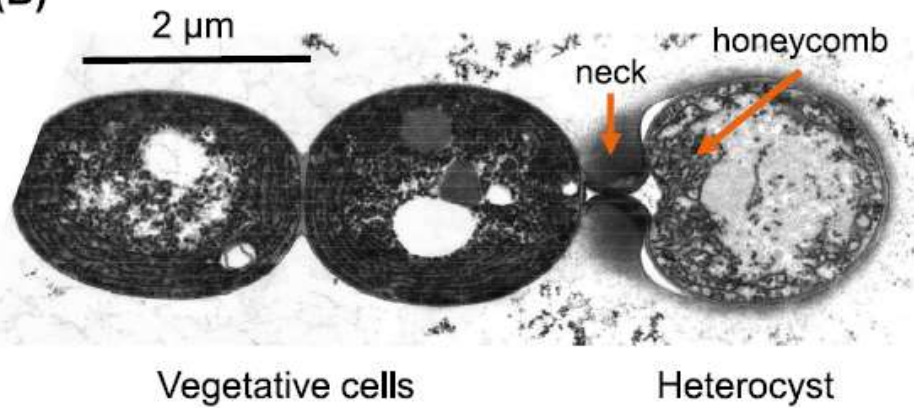
(A)



A : Filaments de *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 en microscopie optique.  
Flèche noire : hétérocyste intercalaire  
Flèche blanche : hétérocyste terminal



(B)



B: Fragment d'un filament visualisé en microscopie électronique. La jonction (neck) particulière entre cellule végétative et hétérocyste et la structure en « nid d'abeille » de l'hétérocyste y sont visibles.

(D'après Herrero et al, 2016)



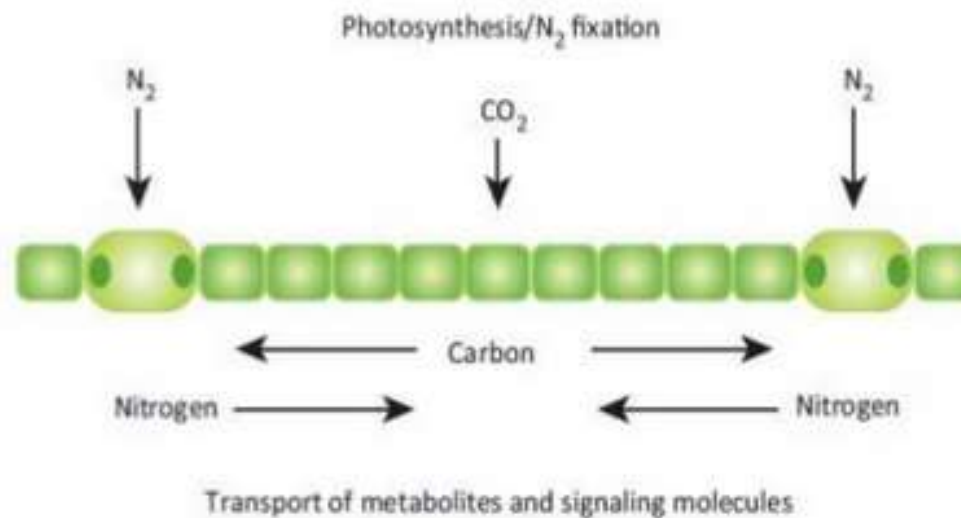


## III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

37

### Heterocyst in cyanobacteria

- In the presence of a source of combined nitrogen such as nitrate or ammonium, *Anabaena* grows as long filaments containing hundreds of photosynthetic vegetative cells.
- In the absence of combined nitrogen, it produces heterocysts every ten to twenty vegetative cells along filaments.



### III-Evolution de la multicellularité et différenciation chez les cyanobactéries : une histoire étroitement liée.

#### Régulation de la différenciation des hétérocystes:

Modèle d'étude; *Anabaena* PCC7120.

En carence azotée: la concentration intra-cellulaire du 2-oxoglutarate (intermédiaire du cycle de Krebs) augmente.

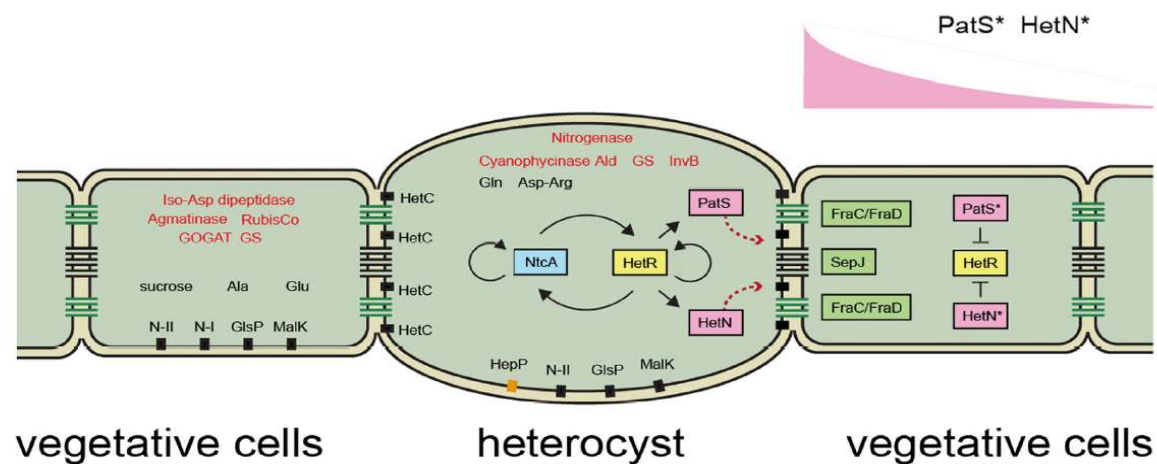
Cette augmentation est « détectée » par NtcA, régulateur transcriptionnel (famille des CRP (Uniprot:POACJ8)), indispensable à la différenciation (il contrôle l'expression des gènes nif).

HetR est également induit dès les premières heures de carence: régulateur se fixant au niveau des promoteurs de plusieurs gènes spécifiques des hétérocystes.

Étapes précoces: dans les pro-hétérocystes, HetC (ABC transporteur localisé aux pôles) augmente et inhibe la division cellulaire?

Étapes intermédiaires: induction des gènes codant les glycolipides spécifiques d'enveloppes, disparition du PSII.

Étapes finales : expression des gènes nif (réarrangement chromosomique, élimination par XisA du fragment de 11kb qui les interrompt)



## Régulation de la différenciation des hétérocystes:

### Le profil de présence des hétérocystes est contrôlé par PatS et HetN.

Dans le filament la division a lieu au « centre » car les hétérocystes terminaux ne se divisent pas.  
En carence azoté, augmentation de l'expression de *patS*.

Mutants *patS* : phénotype Mch = Multiple contiguous heterocysts.

Le produit de *patS* = peptide de 17 AA, clivé en 5, 6 ou 8 AA (morphogènes), transportés dans les cellules voisines ou ils inhibent HetR et empêchent la différenciation.

*hetN* produit une protéine contenant la même séquence que les morphogènes et renforce l'inhibition.

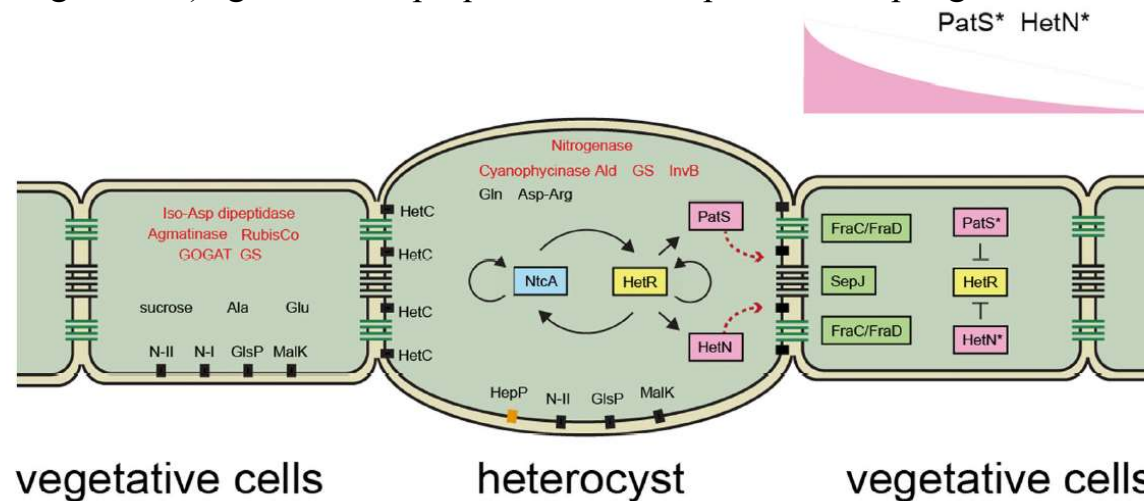
Une communication intercellulaire est nécessaire pour le maintien du profil:

De nombreux métabolites sont échangés (AA, sucrose, aspartyl-arginine)

Des enzymes sont échangés (ex : Glutamate Synthase des cellules végétatives vers hétérocystes)

HetC serait impliqué dans le transport et le clivage (domaine activité peptidase) de PatS et HetN.

SepJ (mutants qui fragmentent) également impliqué dans le transport des morphogènes entre cellules végétatives.



## IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

- $\delta$ -proteobactéries, groupe monophylétique, aérobie, large génome (>9 Mb), diverses structures multicellulaires (notamment FB= Fruiting Bodies).



-Séparation avec les autres  $\delta$ -proteobactéries, estimé entre 800 millions et 2 milliard d'années.

-Principalement trouvées dans les couches supérieures des sols mais également en milieu aquatique.

-En carence nutritive: développement menant à la formation de structure multicellaire dans laquelle des cellules différentes coexistent : myxospores, cellules périphériques, cellules programmées pour lyser.

-La position des différentes cellules est déterminée par des signaux intracellulaires.

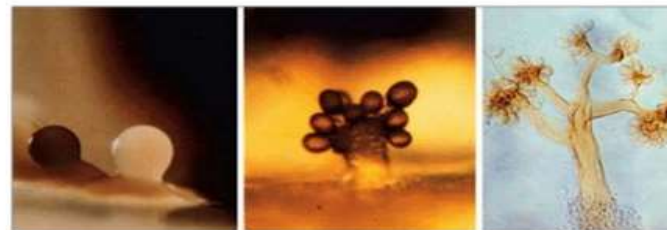
-22% des gènes impliqués dans la différenciation ont été acquis par HGT

Chez *Myxococcus xanthus* : une multicellularité sorocarpique.

### Fruiting body in Myxobacteria

47

- Myxobacteria are a group of Gram-negative bacteria that are predominantly found in soil.
- During starvation, growth is arrested and a developmental program is initiated, which culminates in the formation of spore-bearing fruiting bodies that have a well-defined shape .





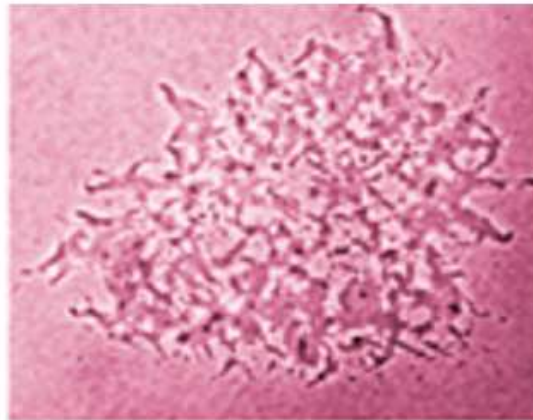
## *M. xanthus* est un prédateur



En présence de nourriture, les bactéries se déplacent sur les surfaces par glissements en « essaims » de façon coordonnée. Elles se nourrissent des nutriments présents dans les sols en décomposition.

Ce sont également des microprédateurs qui se nourrissent de bactéries et de levures.

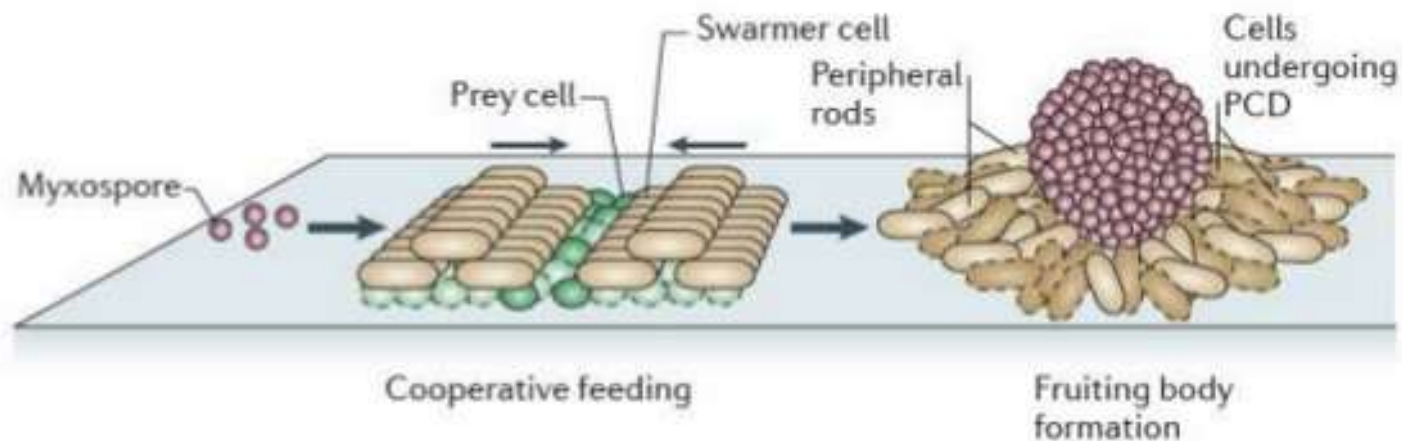
Les swarms facilitent la prédation car les cellules secrètent de manière coopérative antibiotiques et enzymes lytiques.



« essaim » de *M. xanthus*

## IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

### Fruiting body in Myxobacteria



- The first signs of fruiting body formation are evident **4–6 hours** after the exhaustion of resources.
- This is accompanied by changes in cell **motility** and the formation of **aggregation centers**.
- Within **24 hours**, the aggregation process is complete, and the nascent fruiting bodies each contain approximately  $10^5$  densely packed cells that differentiate into spores.

## IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

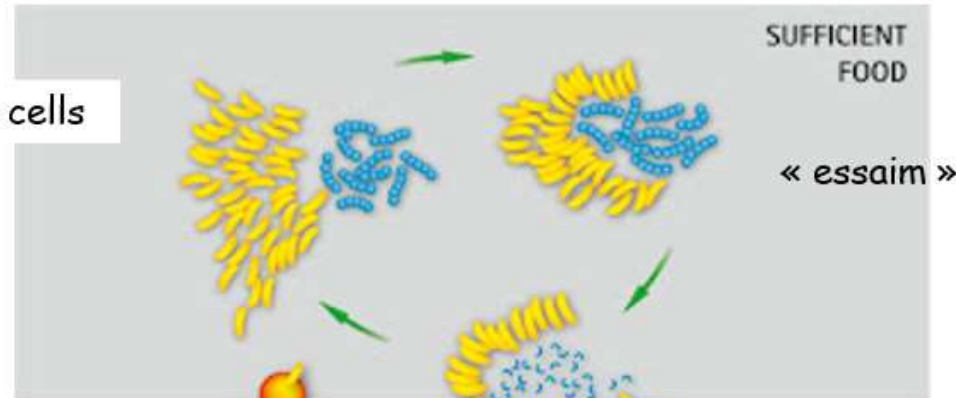
Films:

<https://www.youtube.com/watch?v=tstc6doiNCU>

# Le cycle de vie de *Myxococcus xanthus*



Vegetative cells

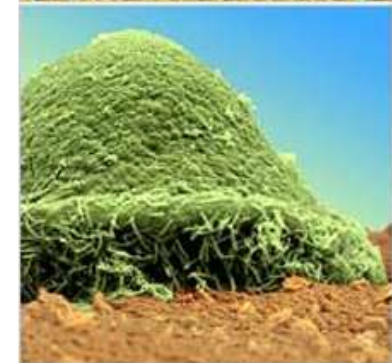


SUFFICIENT  
FOOD

« essaim »



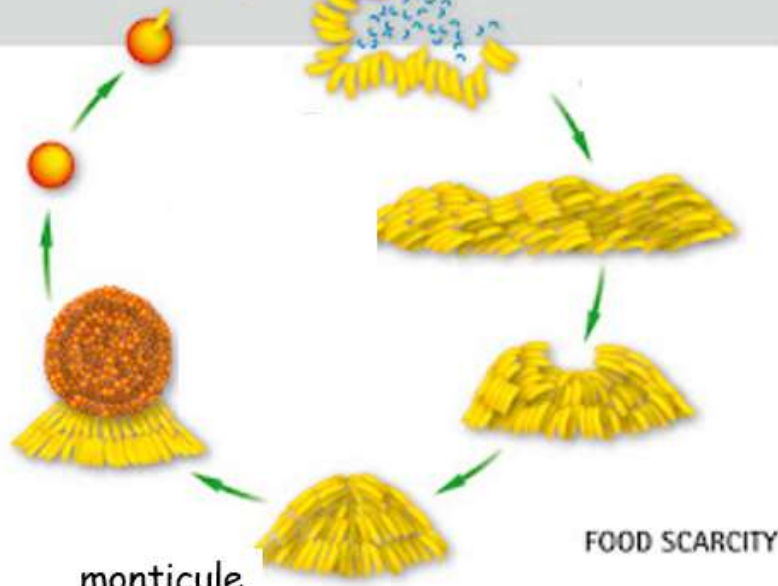
Myxospores



Fructification



monticule

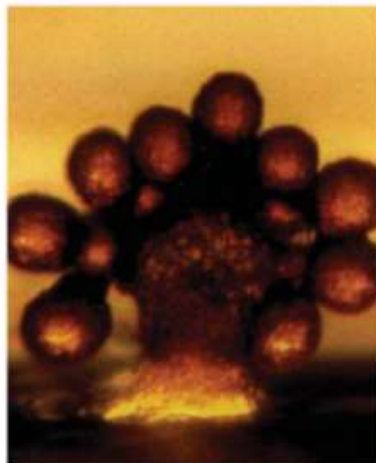
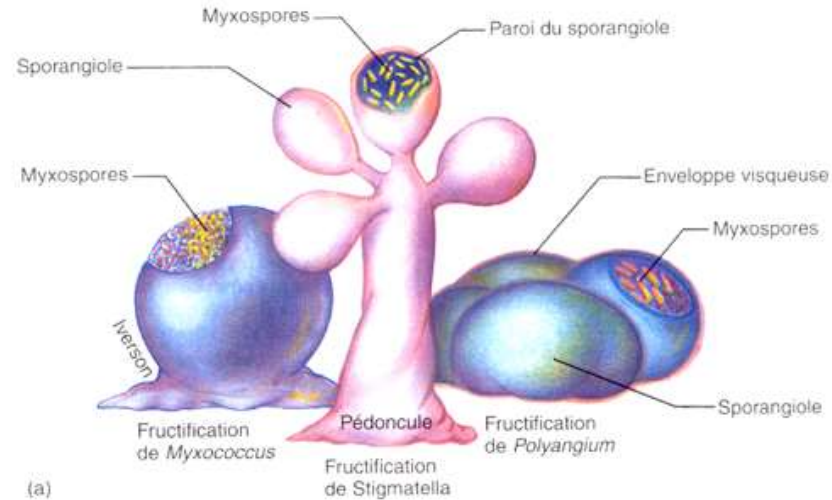


FOOD SCARCITY



les fructifications sont caractéristiques de chaque espèce de myxobactérie.

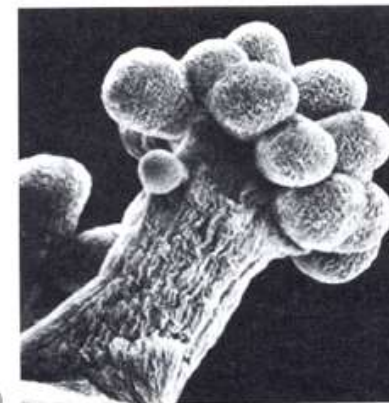
La complexité des fructifications varie le pédoncule peut atteindre 700  $\mu\text{m}$  de haut



*Stigmatella aurantiaca*



*Chondromyces crocatus*

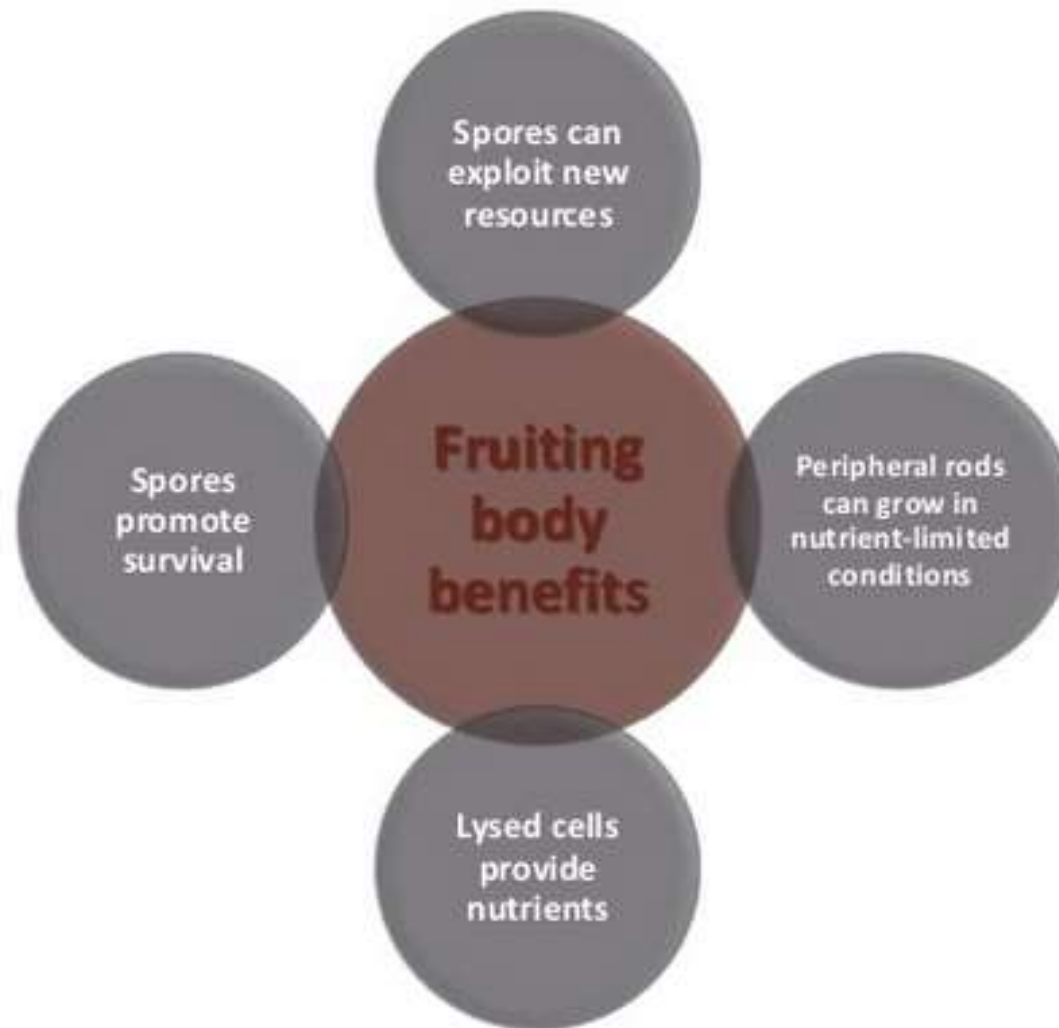


*Chondromyces crocatus*  
(microscope à balayage)

Prescott et al. Microbiologie ed. de boeck

Annu. Rev. Microbiol. 2006. 60:1-25

# Fruiting body in Myxobacteria



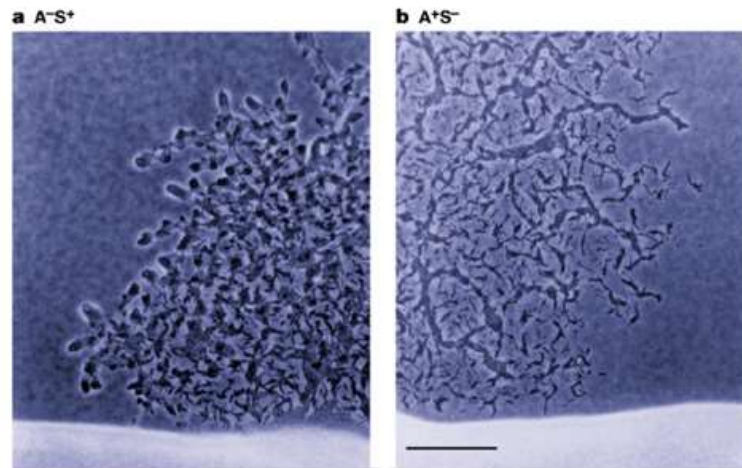


Les myxococcus n'ont pas de flagelle.



Le glissement de ces bactéries est un mouvement sans rotation dans la direction de l'axe principal de la cellule. De temps en temps la bactérie change de direction sans tourner mais en reversant sa polarité.

2 types de mutants de mobilité ont été trouvés ayant des déplacements différents : A<sup>-</sup> (A pour adventurous), S<sup>-</sup> (S pour social)



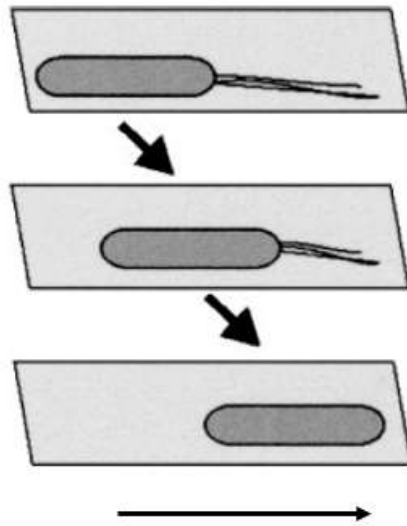
Nature Reviews | Microbiology

A<sup>-</sup>S<sup>-</sup> ne sont pas capables de se déplacer

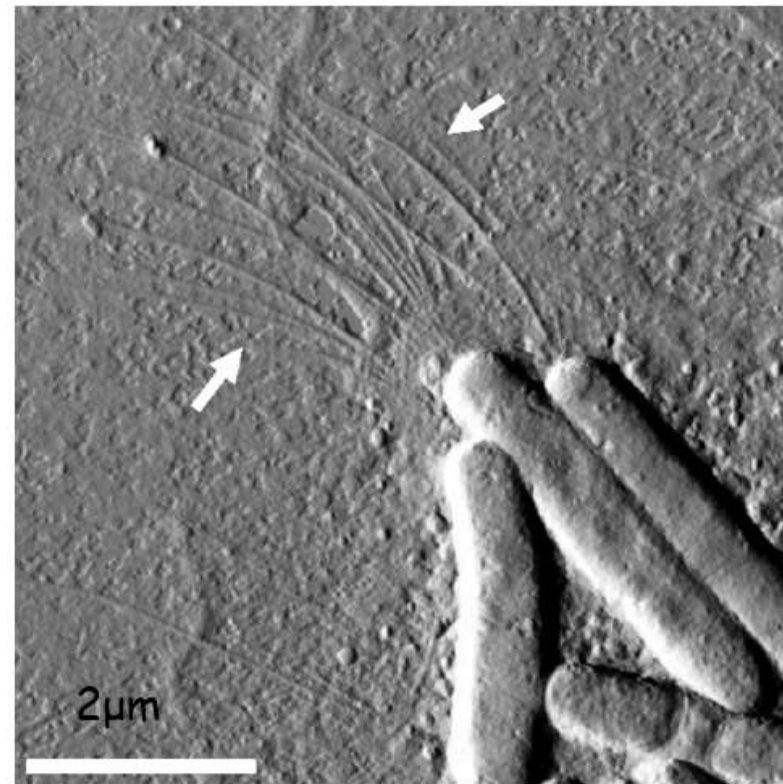


**S-motilité** : uniquement quand les cellules sont proches les unes des autres.  
Initialement découverte comme un type de déplacement coordonné d'un large groupe de cellule sur des surfaces contenant 1,5 % d'agar.

Nécessite la présence de Pili (twitching ou social gliding). Le pilus de *M. xanthus* ressemble en composition à celui de *P. aeruginosa*. Dans 95 % des cas les pili sont unipolaires.



déplacement par  
extension/rétractation

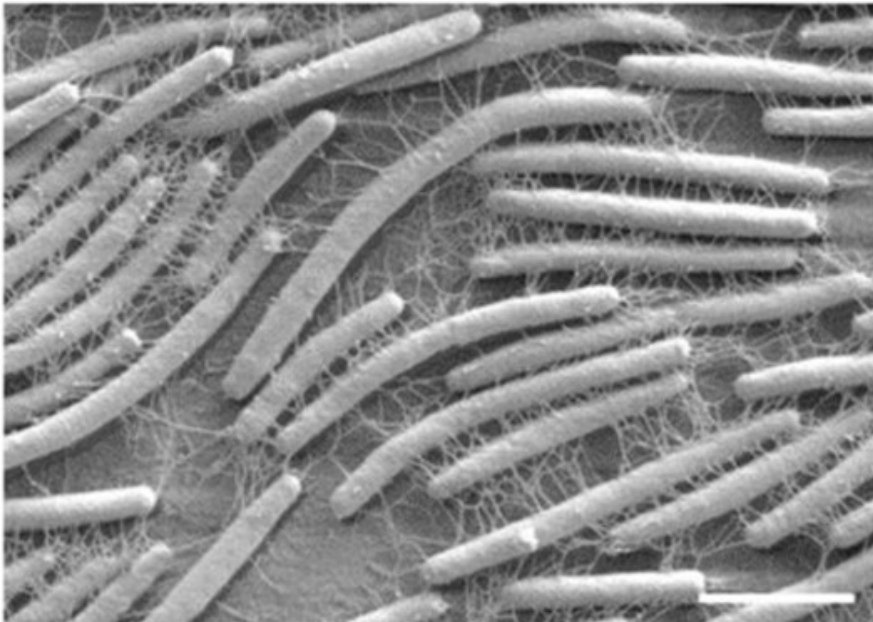


S-motilité permet aux cellules de se déplacer seulement si elles sont proches   
les unes des autres (distance approximativement d'un pilus)

Les polysaccharides de surface sont nécessaire aux déplacements en groupe (S-motilité)

Les pili sont nécessaires mais pas suffisants. Il faut

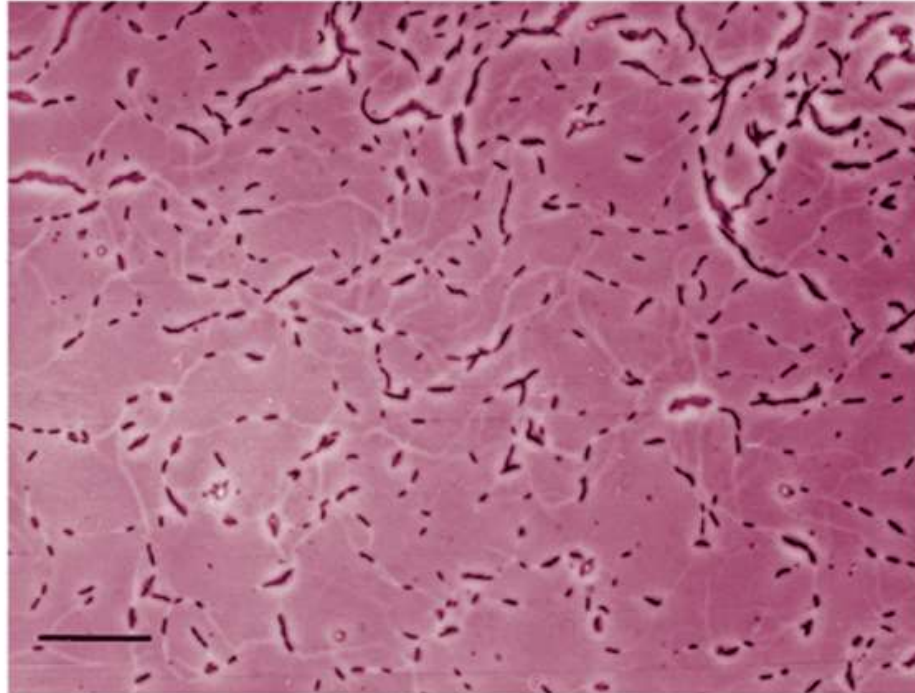
- la présence de fibrilles. Les fibrilles sont des excroissances extracellulaires formés de polysaccharides et d'une protéine. Elles forment un réseau entre bactéries.
- La capsule



Modèle : le(s) pilus s'étende(nt)  
puis adhère(nt) aux fibrilles  
et/ou à la capsule d'autres  
bactéries puis se rétracte(nt)  
tirant la bactérie. Ces 2 entités  
pourraient être le signal de  
rétractation du pili



**A-motilité** : ne nécessite pas la proximité d'autres cellules ni de pilus. ★  
Des mutants  $A^+S^-$  laissent des « trainées » (slime trails) derrière eux visibles au microscope.



Nature Reviews | **Microbiology**

Il a été montré que les bactéries tendent à suivre une trainée existante : quand une bactérie croise une trainée, elle tourne pour suivre celle-ci.



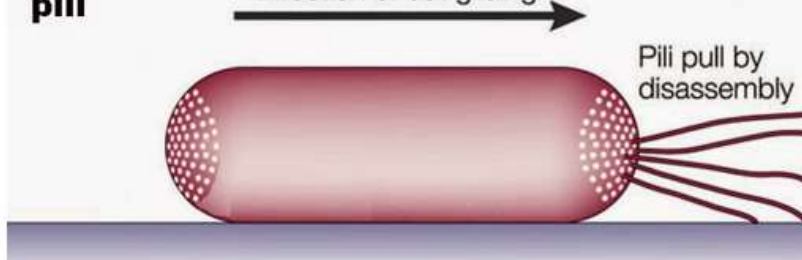
## Adventurous



## Social

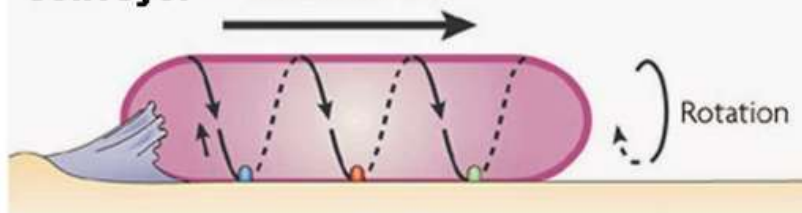
**pili**

Direction of cell gliding

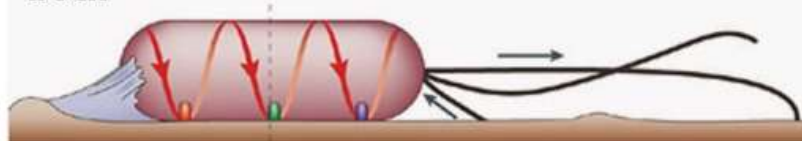


**conveyor**

Cell movement



**both**

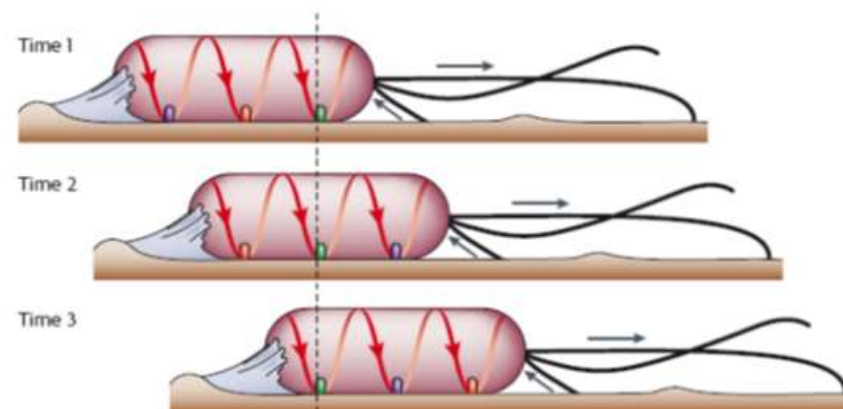


La vitesse de déplacement augmente avec le nombre de cellules ce qui indique que les cellules « s'aident » à avancer.

Impliquent 2 appareils de déplacement localisés chacun à un pôle de la bactérie. L'appareil S tire alors que le A pousse. Il y a une synergie entre les 2 appareils

La polarité de ses appareils est réversible simultanément.

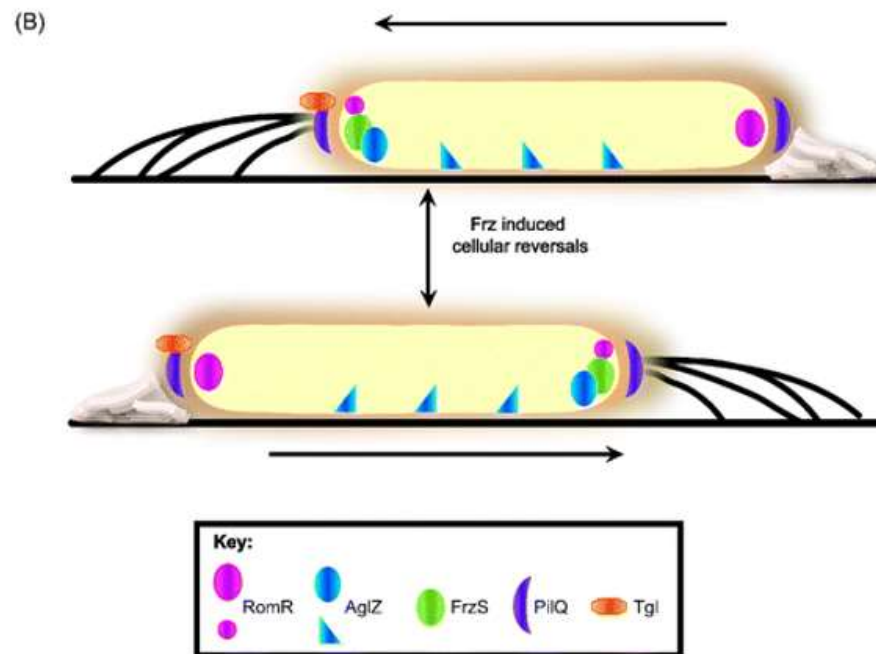
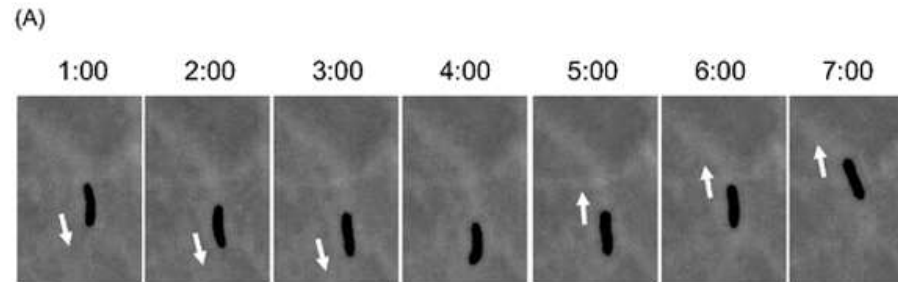
Le changement de direction des bactéries est dû au changement de pôle des 2 moteurs.



Nature reviews microbiology  
2007, 5. 862-872



Lorsque les bactéries sont dans un stade végétatif elles changent de direction en moyenne toutes les 5 à 7 minutes



Système contrôlant la fréquence de réversion (la polarité des moteurs) = système frz  
 contrôle la fréquence de réversion comme le système Che influence la réversion du sens du moteur du flagelle.

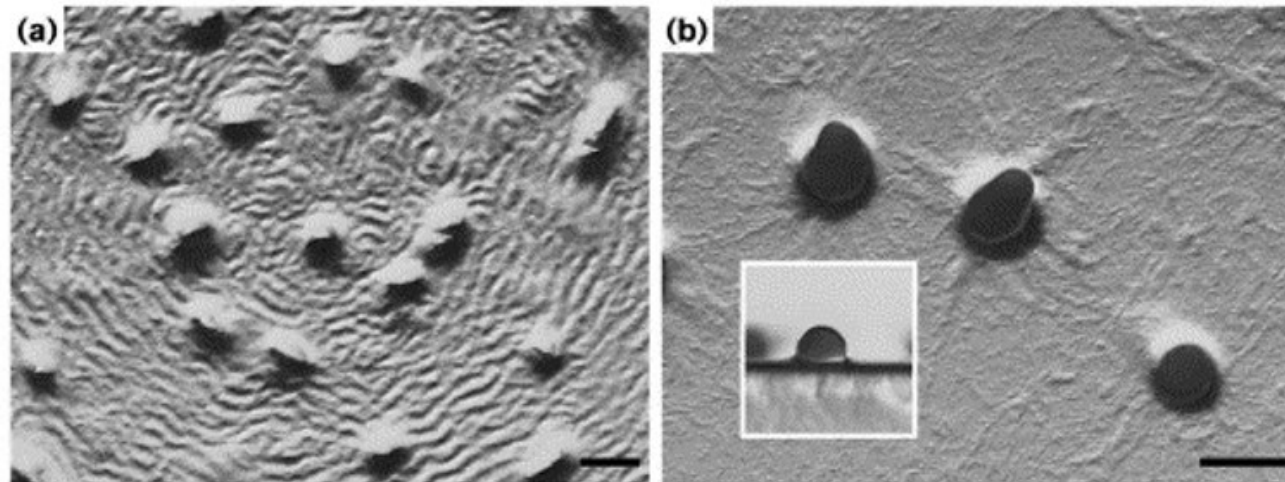
Les mutants *frz-* ne réversent plus qu'une fois par heure.  
 Les mutants *frz-* ne s'agrègent plus ni ne font de fructifications



Carence nutritionnelle : induit une morphogénèse multicellulaire impliquant une transmission de signaux de cellules à cellule et une expression spatiale et temporelle des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire.

Plusieurs étapes :

- les bactéries se concentrent et forment des vagues allant dans un sens ou dans l'autre (ondulations). Elles correspondent aux déplacements de bactéries allant majoritairement dans le même sens. Lorsque 2 vagues se rencontrent les bactéries entrent en collision et forment un petit agrégat qui les immobilisent à cause de l'encombrement créé par les autres bactéries.





Au moins 5 signaux intercellulaires interviennent dans la morphogénèse :

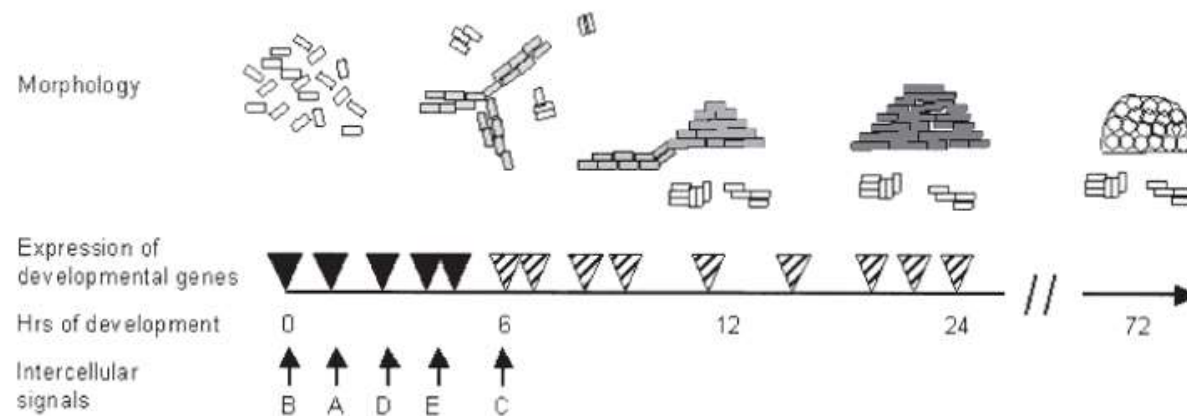
- **signal A** : type « quorum sensing » intervenant dans les étapes précoces du développement lorsque la nourriture diminue.

- **signaux B, D, E**

Ces signaux interviennent avant l'initiation de la morphogénèse, leur rôle est probablement d'évaluer la densité cellulaire mais également l'ampleur et la durée de la carence nutritionnelle

- **signal C** : intervient au bout de 6 h : induit l'agrégation puis la sporulation.

Régulation de la fréquence de réversion



Molecular microbiology (2003), 48 p1-8

l'agrégation est provoquée par la diminution progressive de la fréquence de réversion



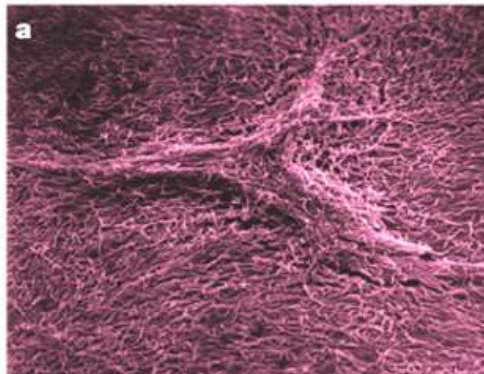


Le signal *C* est une protéine ancrée dans la membrane externe (produit du gène *CgsA*). Pour agir il doit être protéolysé.

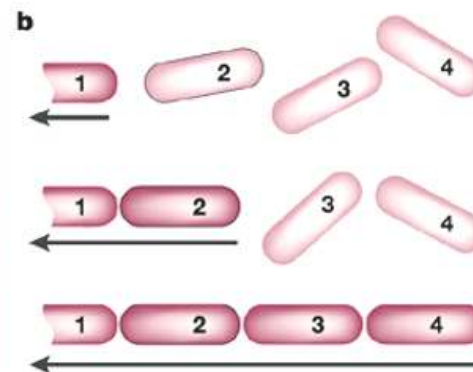
Le *C*-signal diminue la fréquence de réversion en agissant sur le système *Frz*

Comme il est non diffusible il nécessite un contact entre bactéries. Ce contact est créé dans les agrégats

Les bactéries se retrouvent tête bêche et il se créent des « chaînes » de bactéries dont la fréquence des réversions est très diminuée alors que la vitesse de déplacement augmente. C'est le contact permanent des cellules qui permet le passage du signal *C* d'une bactérie à l'autre. Dans cette structure le *C*-signal est transmis du centre de l'agrégat vers sa périphérie.



Nature reviews microbiology



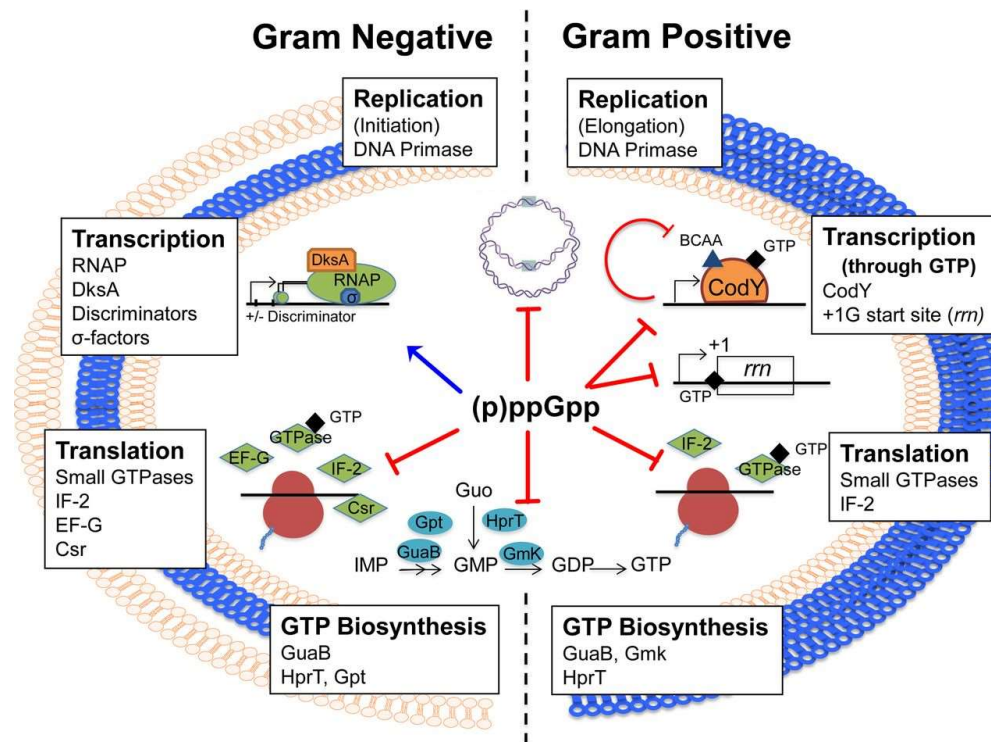
# IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

## La réponse stringente : premiers signaux déclencheurs du développement

La réponse stringente est une réponse très conservée face au stress nutritionnel.

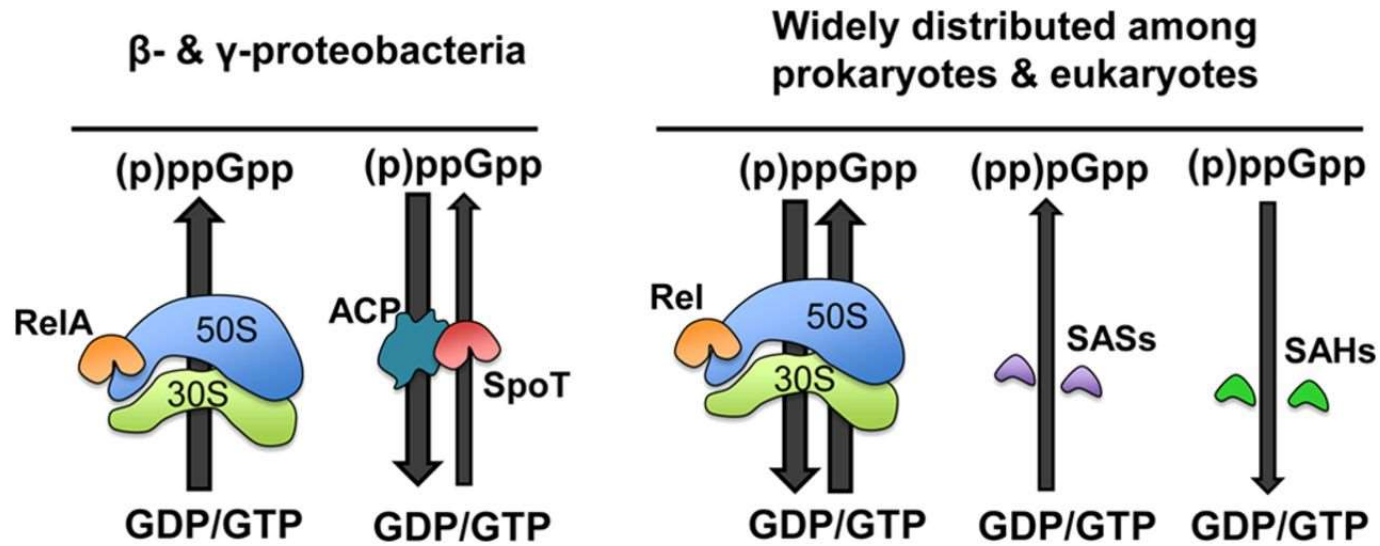
Les « alarmones » sont des dérivés hyperphosphorylés de la guanosine : ppGpp, pppGpp

Accumulation de (p)ppGpp entraîne répression des gènes nécessaires à une croissance rapide, et activation des gènes nécessaires à la survie + inhibition de l'activité de certaines enzymes (ex:DNA primase, facteurs de traduction).



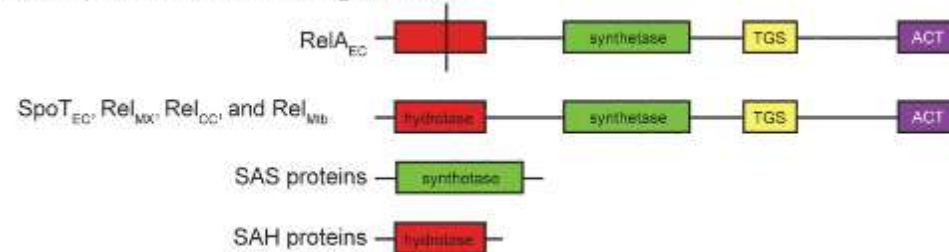
D'après Gaca et al, 2015.





D'après Gaca et al, 2015.

#### RSH protein domain organization



#### Figure 1. Domain structure of RSH proteins

All RSH proteins contain – from N to C terminus – (p)ppGpp hydrolase, (p)ppGpp synthetase, TGS (conserved in Threonyl-tRNA synthetases, GTPases and SpoT ) and ACT domains (conserved in many proteins involved in small molecule metabolism; the ACT domain usually binds an amino acid or small molecule that allosterically regulates enzyme activity) [80]. The hydrolase domain of RelA<sub>EC</sub> contains sequence polymorphisms (indicated by vertical black line) that render it enzymatically inactive. We note there are several sites of sequence variation that distinguish RelA<sub>EC</sub>, SpoT<sub>EC</sub> and bifunctional Rel proteins besides the active sites of the catalytic domains; these are discussed in reference

D'après Boutte et al, 2013

Chez *M. xanthus*

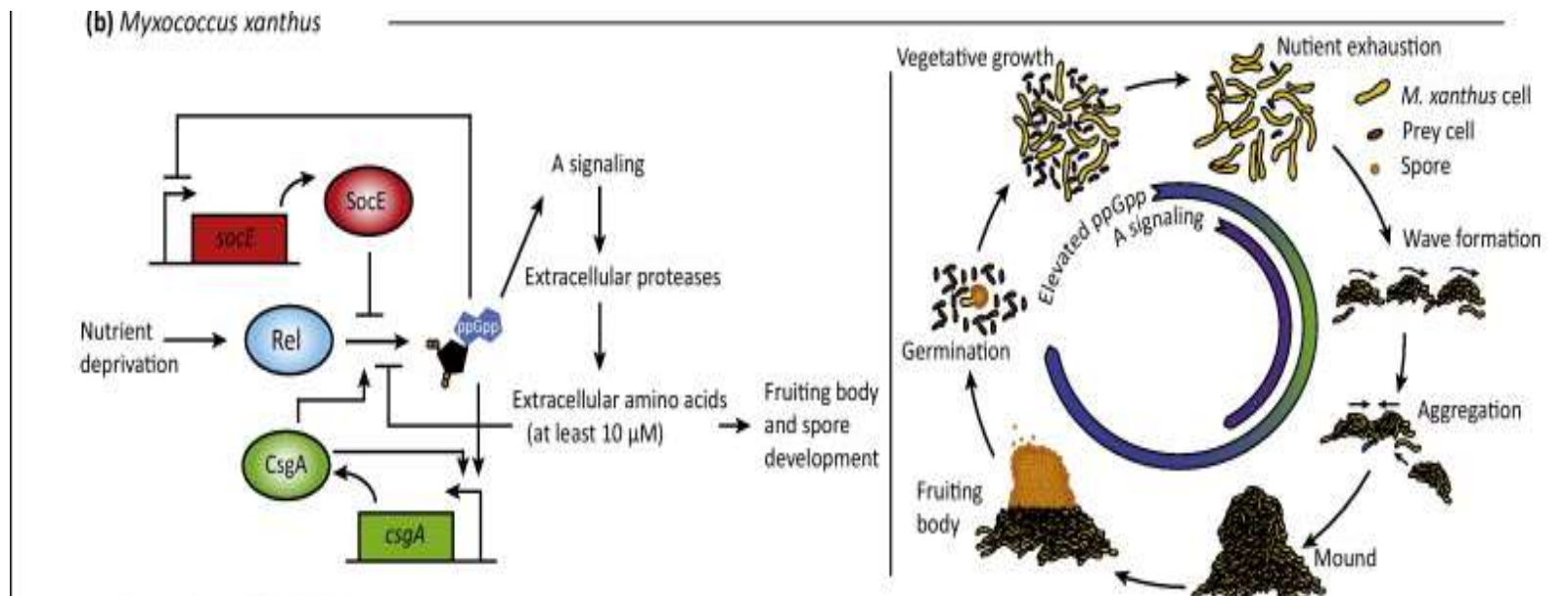


Mutants *rel-* sont incapables d'agréger et de former des corps fructifères.

*Rel* détecte les carences en AA, en azote en carbone et en phosphate.

(p)ppGpp active les gènes *asg* (A-signal generating genes) qui contrôlent l'expression et l'export des protéases qui dégradent des protéines formant le signal-A (AA + peptides). Le signal-A peut inhiber la synthèse de (p)ppGpp car servant de source de nourriture.

*SocE* et *CsgA* permettent d'outrepasser le rôle négatif du signal-A pendant le développement.



D'après Boutte et al,  
2013

## IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

Un second signal est nécessaire: le signal de contact (Signal C).

-Permet l'agrégation.

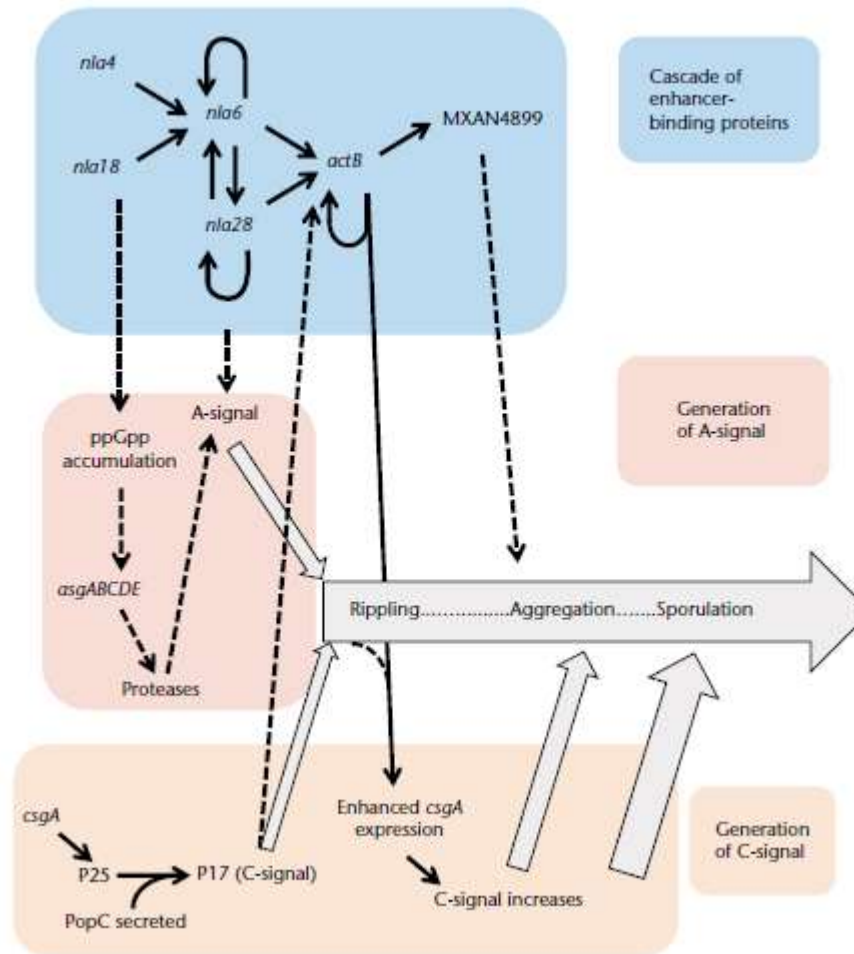
-La motilité au sein des agrégats, en favorisant la motilité par glissement (s-motility) plutôt que la motilité par « twitching » (A-motility).

-La sporulation.

-Signal-C = protéine de 17 Kda codée par *csgA* membranaire exposée à la surface cellulaire, transmise par contact d'une cellule à une autre. CsgA est maturée par PopC (protéase sécrétée) et *csgA* est activé par le signal A.

- Signal-C active l'opéron *act* qui active *csgA*.

-Amplification du signal encore renforcé par les EBP (Enhancer binding proteins : *nla*)





## IV-Multicellularité et différenciation chez les Myxobactéries

### Co-option : un modèle d'évolution des myxobactéries.

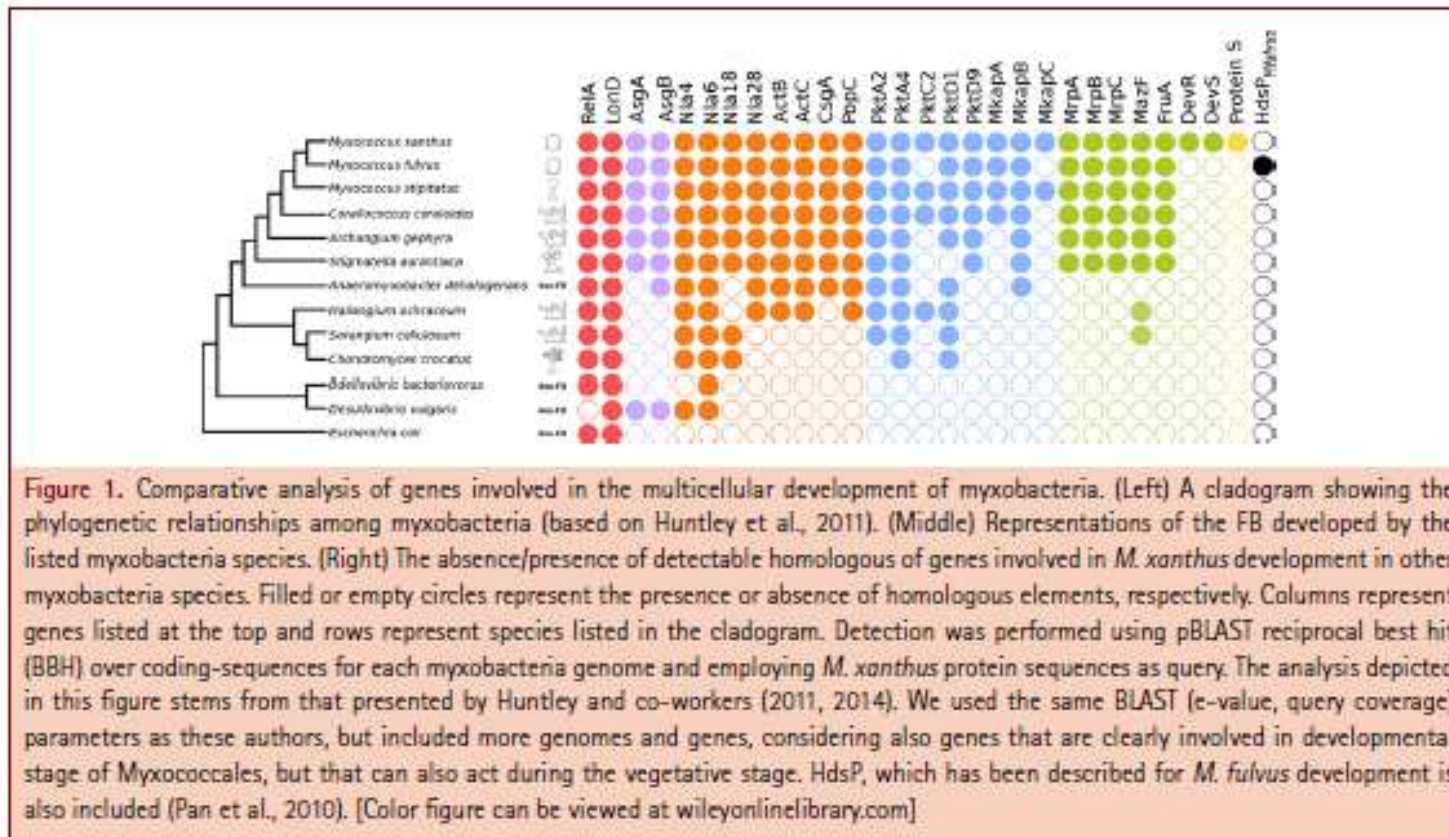
La réponse stringente est très conservée.

Des systèmes de développement différents parmi les myxobactéries.

Supporte l'idée que l'ancêtre commun unicellulaire était capable de différenciation.

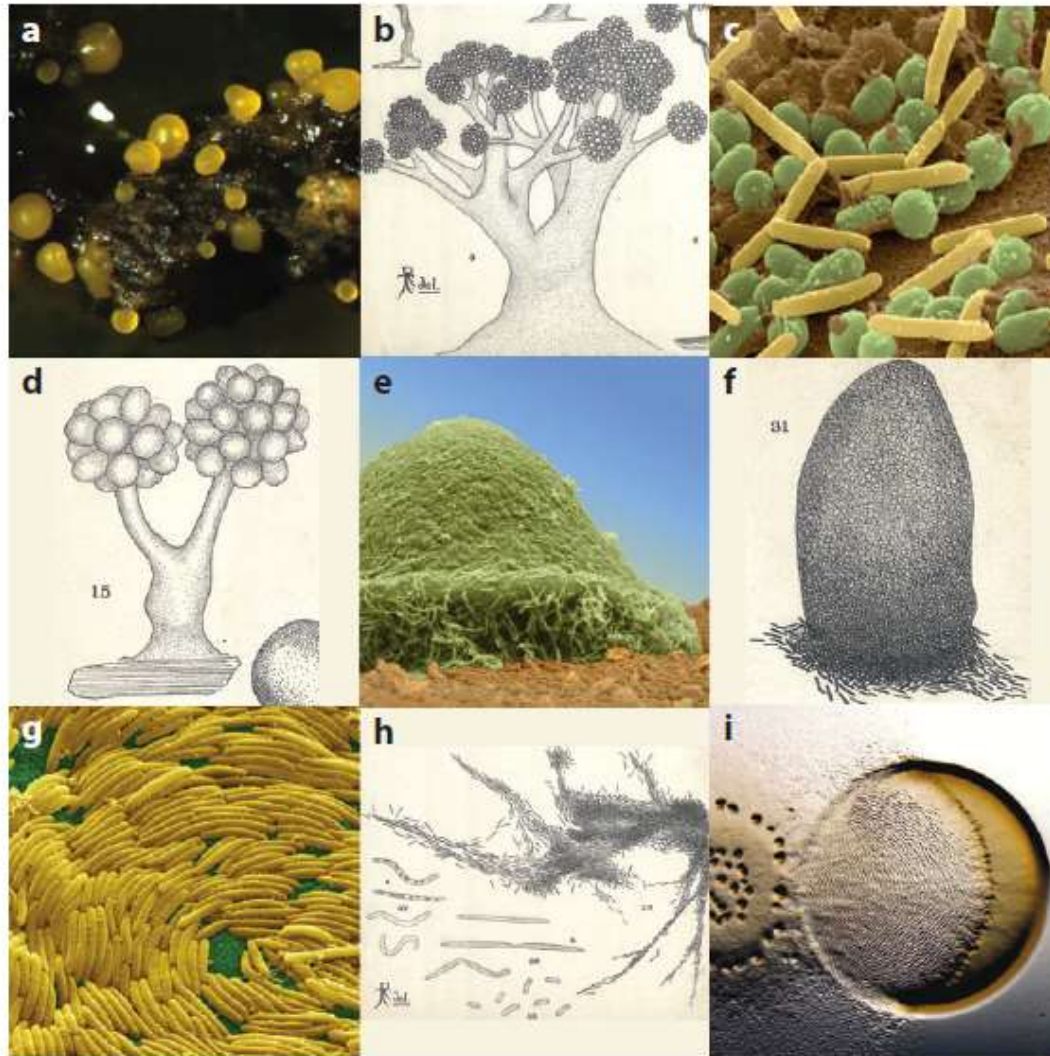
L'émergence de la multicellularité est donc probablement liée à la coexistence spatiotemporelle des différents types cellulaires.

Par contre, concernant , les systèmes de communications cellulaire et d'adhésion la co-option est moins évidente:



D'après Arias del angel et al, 2017)





**Figure 1**

Myxobacterial social phenotypes. (a) *Myxococcus xanthus* fruiting bodies emerging from a soil particle. (b) Sketch of a *Chondromyces crocatus* fruiting body. (c) Spherical spore and vegetative rod forms of *M. xanthus* cells. (d) Sketch of a *Chondromyces aurantiacus* (reclassified as *Stigmatella aurantiaca*) fruiting body. (e) An *M. xanthus* fruiting body. (f) Sketch of a *Myxococcus coralloides* fruiting body. (g) *M. xanthus* cells engaging in coordinated motility. (h) Sketch of swarming and individual cells of *C. aurantiacus*. (i) An *M. xanthus* swarm (movement left to right) consuming a colony of *Escherichia coli* (image by J. Berleman and J. Kirby). All sketches are by Roland Thaxter, 1892 (105), (used with permission of Harvard University, Cambridge, MA). Electron microscopy images are by J. Berger and S. Kadam.

Les différentes formes de corps fructifères sont des adaptations sous l'influence de facteurs écologiques et de facteurs physicochimiques.

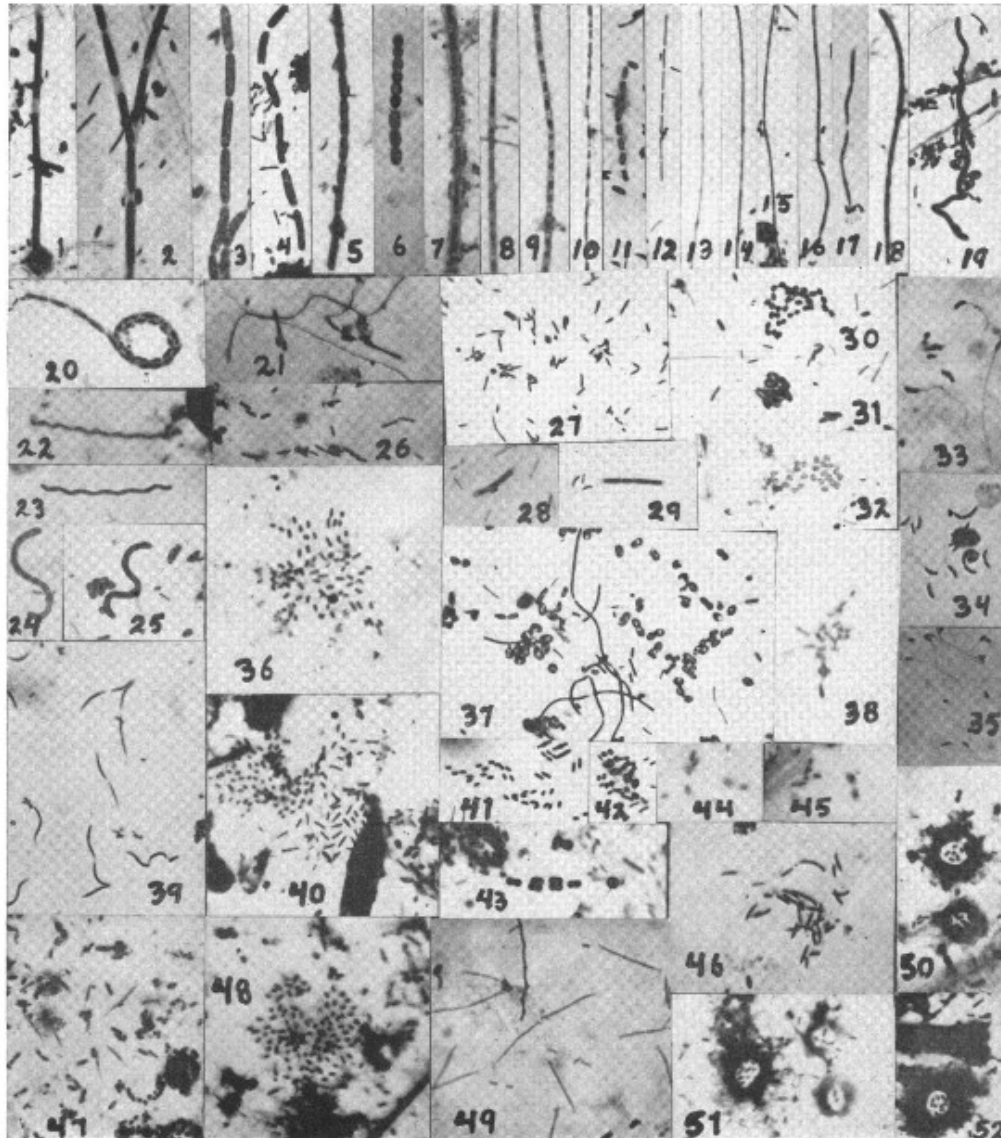
Films





# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

## Les Biofilms : une multicellularité sorocarpique?



This collection of photomicrographs is presented to illustrate the wide variety of morphologic types of bacteria which have been encountered. The magnification is 800 times.

Figures 1 to 21 inclusive are filamentous types which the author would classify as trichobacteria; the remainder are haplobacteria. Figures 1 and 2 show the holdfast and the "false" branching, respectively, of *Cladothrix dichotoma*. Articulation or its absence, sheaths or their absence, are illustrated in the other filamentous forms.

Figures 22 to 25 show spiral types. The large spirillum shown in 24 and 25 is probably *S. volutans*.

Figures 33, 34 and 35 show peculiar vibrio types with long attached filaments. These are probably not flagella, as no mordant was used. It is the author's opinion that they are *stalks* by which the bacteria are attached to the glass, similar to the stalks of some diatoms.

Figures 28 and 29 show rod forms with peculiar faintly stained areas at the poles, probably a plasmolytic phenomenon.

Figure 37 shows large vacuolated oval cells somewhat resembling *Azotobacter*.

Figures 44 and 45 are encapsulated forms.

Figure 47 shows, among others, spindle-shaped types which in form and staining reactions resemble fusiform bacilli of the human mouth.

Figures 50, 51, and 52 show minute colonies of *Siderocapsa major* Moliach. The bacteria are contained within a mucoid capsule, about which ferric hydroxide is deposited in a ring.

# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

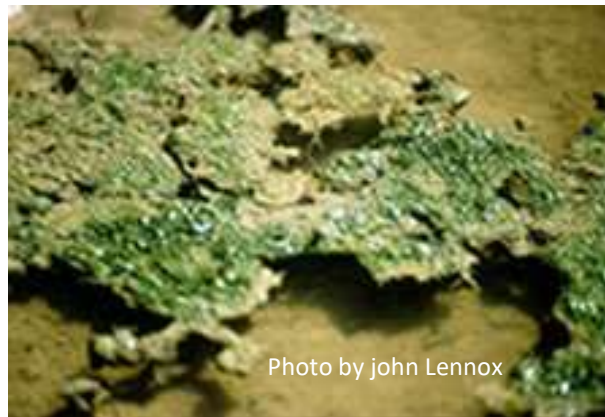


Les microorganismes vivent sur terre sous forme de biofilms.

Il suffit d'une surface, de micro-organismes, d'un peu d'eau et des nutriments nécessaires à une croissance. Aucune surface non protégée ne peut échapper aux biofilms.

Environnement (biofilm mixte): surface de l'eau

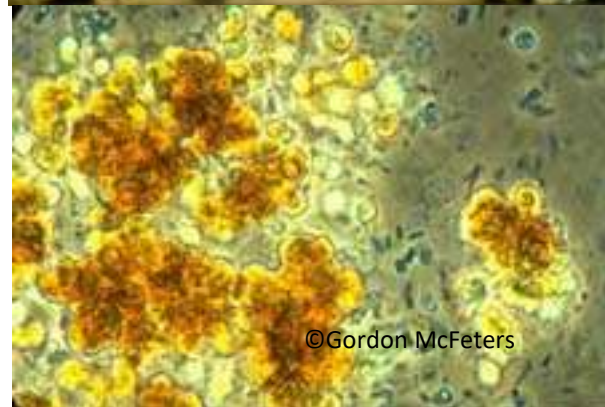
Biofilm dans une flaque d'eau



Biofilm à la surface d'une source



Biofilm dans un écosystème aquatique alpin



Biofilm sur vase (Port d'Auray)







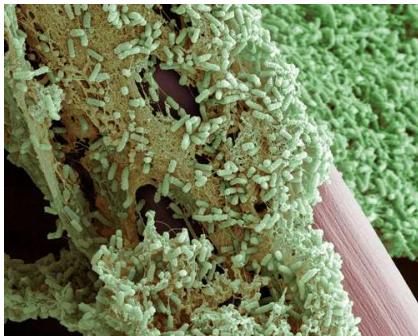
Environnement (biofilm mixte): surface de plante



Chez l'animal\l'homme: la microflore commensale



# Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

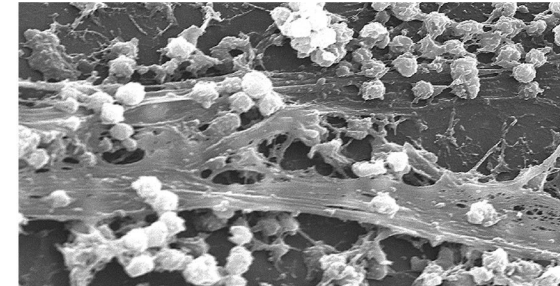


Accroché à des fibres (tissus)

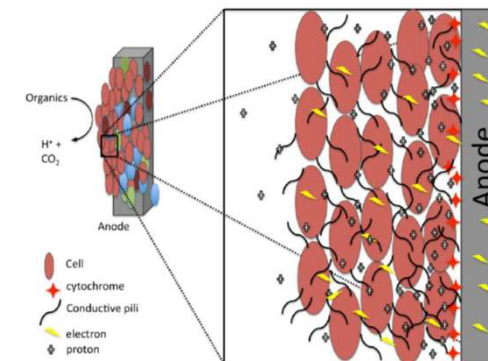


Canalisation d'eaux usées

Staph Infection (*Staphylococcus aureus* biofilm) of the surface of a catheter (CDC)



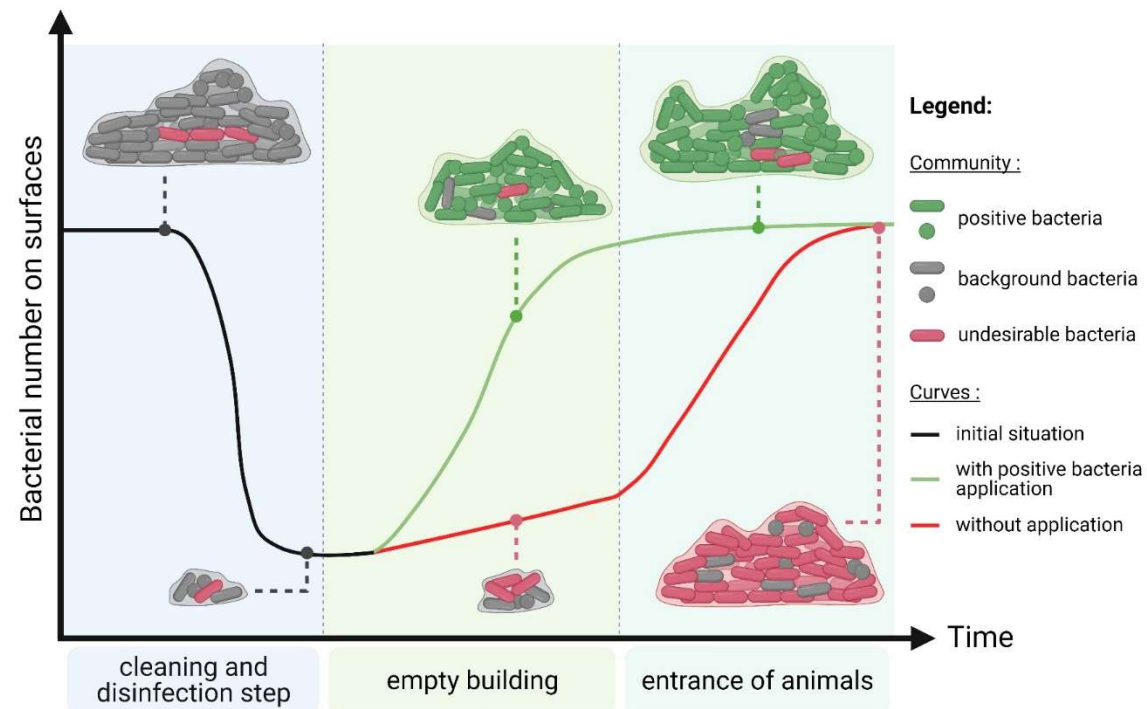
Integral to the ability of biofilm reactors to produce vitamin K are specially designed internal plastic composite supports that microorganisms adhere to and on which they build intertwined colonies – called biofilms – that can withstand ... more





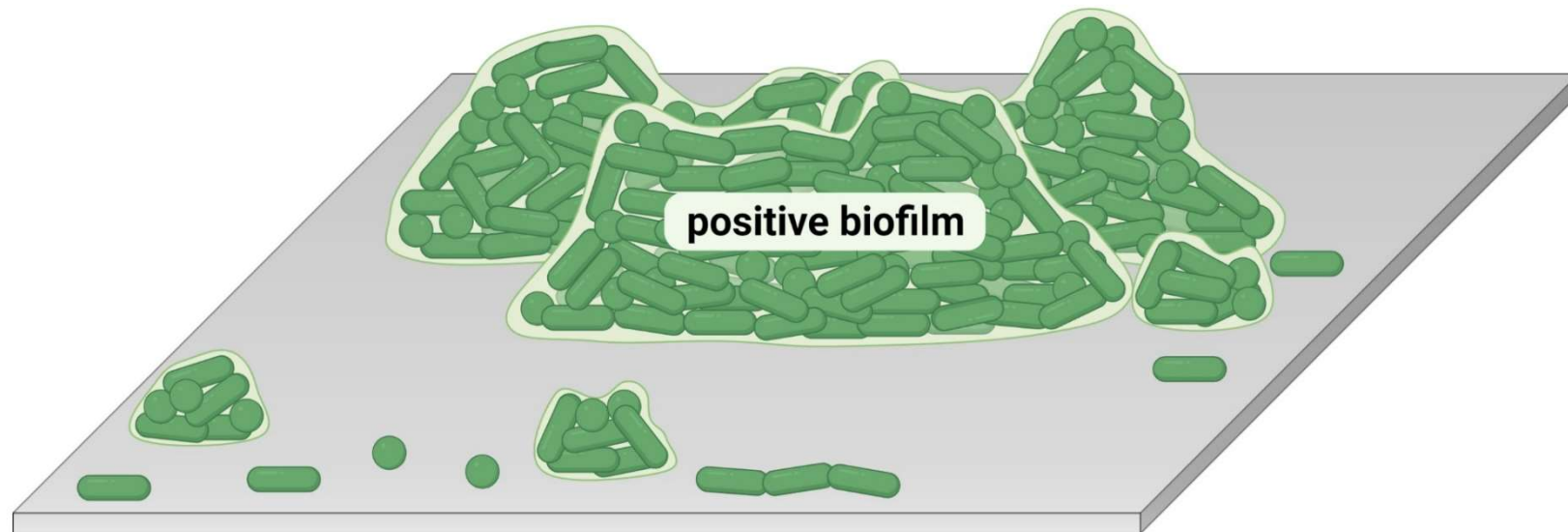
## Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

# Positive biofilms as a solution to limit microbial pathogens settlement in livestock building



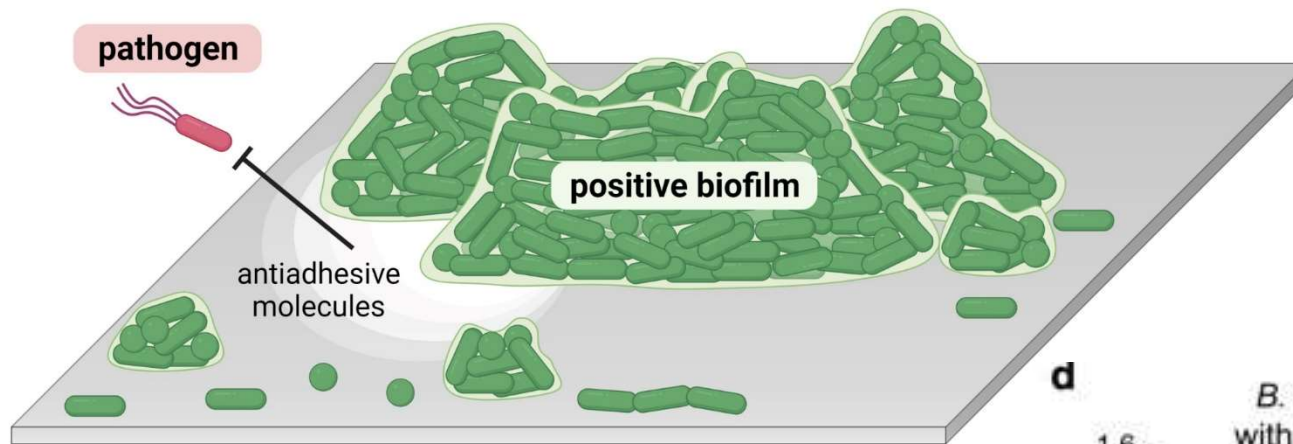
## Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

Mechanisms involved in the exclusion of undesirable bacteria

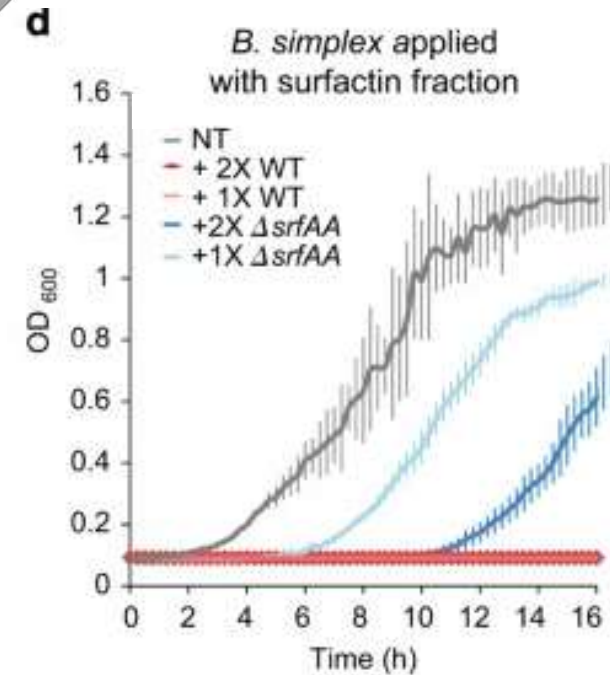


## Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

### Mechanisms involved in the exclusion of undesirable bacteria

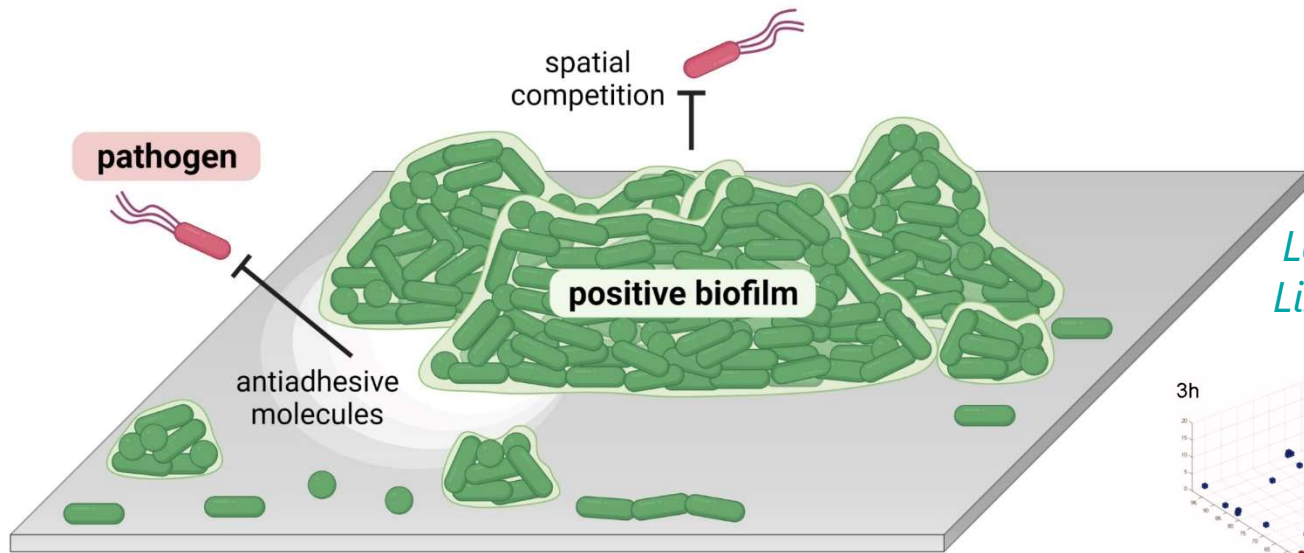


### Bio-surfactant production affects colonisation



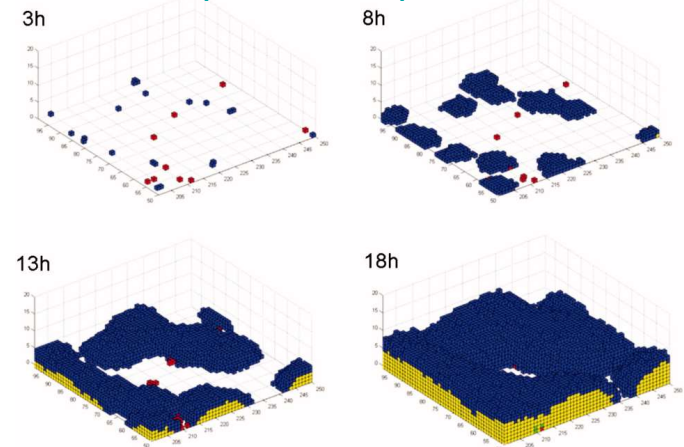
# Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

## Mechanisms involved in the exclusion of undesirable bacteria



*Lactococcus lactis* inhibits *Listeria monocytogenes* by spatial competition

- *L. lactis*
- *L. monocytogenes*

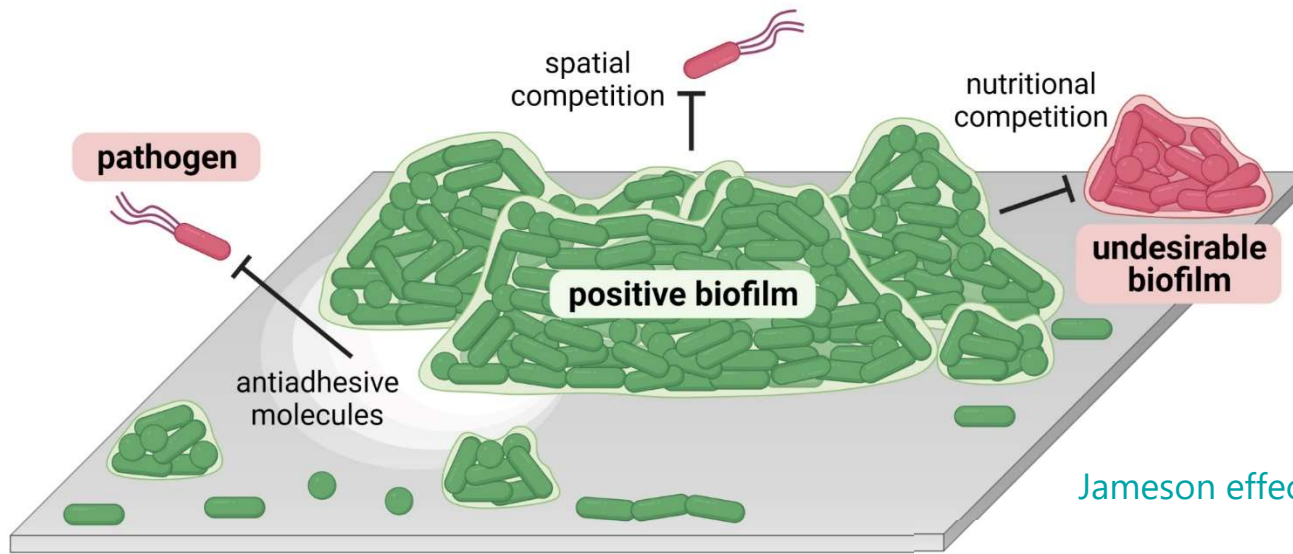


individual based model

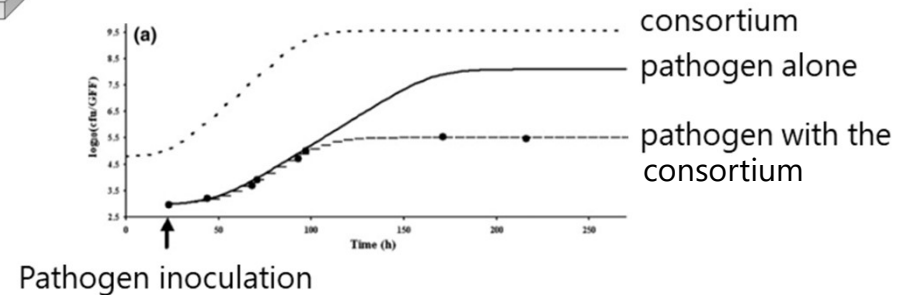


# Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

## Mechanisms involved in the exclusion of undesirable bacteria

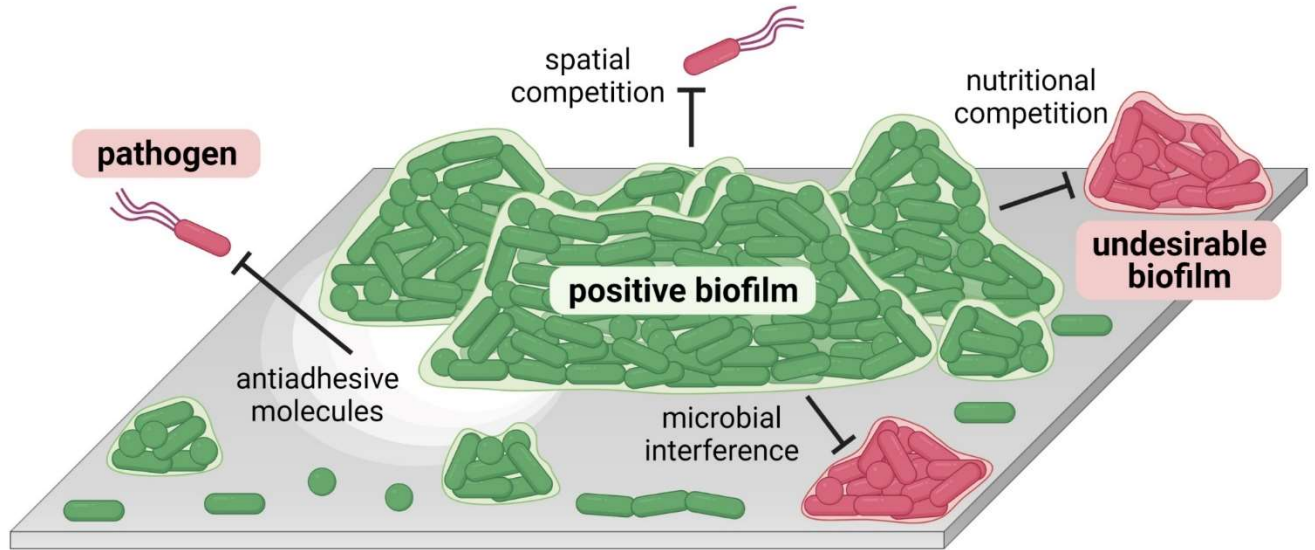


Jameson effect with *Listeria monocytogenes*

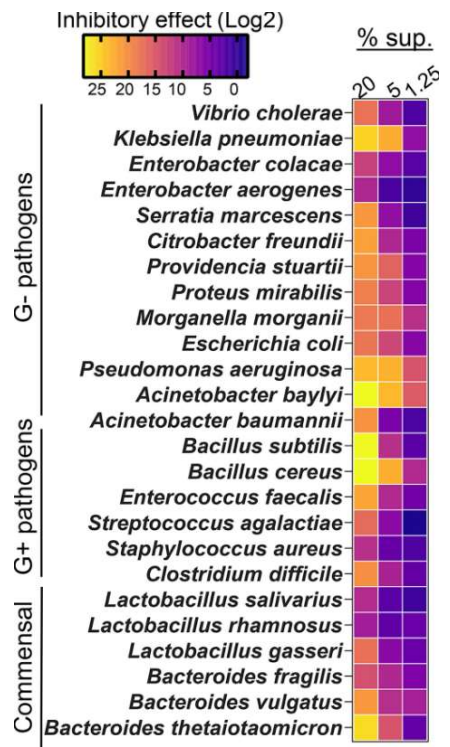


# Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

## Mechanisms involved in the exclusion of undesirable bacteria



Peptide secreted by *B. velezensis*



# Biofilms « néfastes »/ Biofilms « utiles »

## Products are already on the market

### Main characteristics:

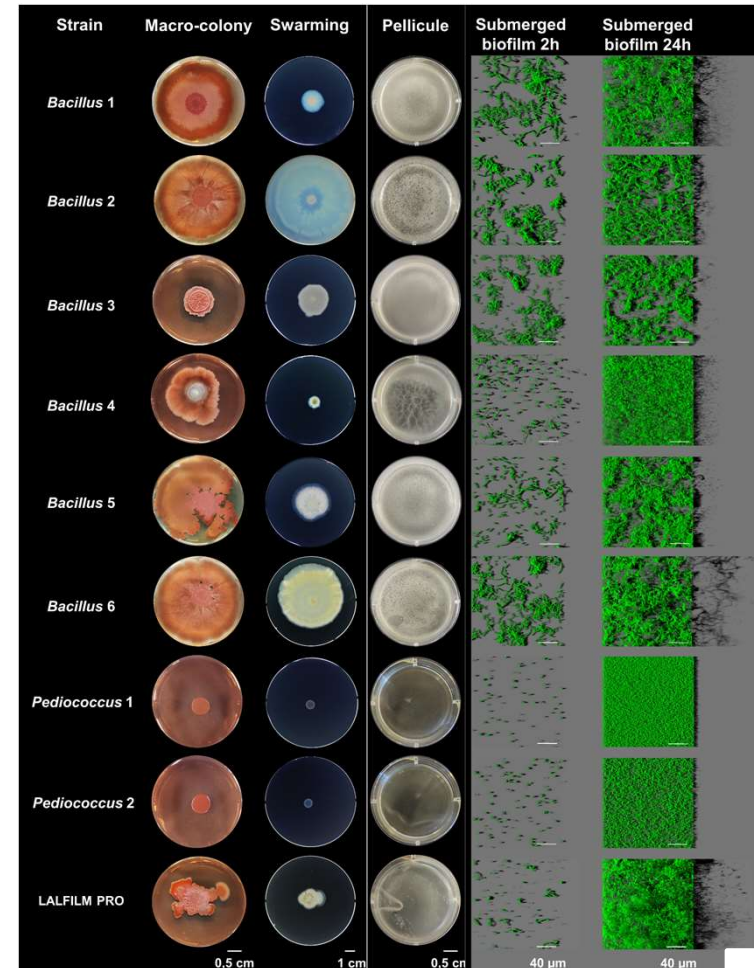
- exclude pathogens
- surface colonization
- industrial-scale production
- safety compliance

### Composed of:

- 6 *Bacillus* spp.
- 2 *Pediococcus* spp.

### Limits:

- Field studies?
- Rational of assembly and formulation very rarely specified
- Studies conducted in planktonic form



## Biofilms : Définitions:



- Microbial aggregates at interfaces: solid–liquid, solid–gas, liquid–liquid and liquid–gas
- Genetic response to surface adhesion
- Extracellular polymeric substances matrix, mainly consisting of polysaccharides, proteins and extracellular DNA (eDNA), which forms a 'house for biofilm cells' and provides mechanical stability
- Gradients resulting in heterogeneous microenvironments in biofilms
- Wide variety of habitats supporting biodiversity
- Retention of extracellular enzymes in a matrix, for example, providing an external digestion system
- Matrix-stabilized microconsortia that enable synergistic use of nutrients
- Water retention and protection against dehydration
- Nutrient acquisition by sorption and retention
- Recycling of nutrients
- Enhanced tolerance to disinfectants, biocides and other stressors
- Enhanced intercellular communication (signalling), regulation of matrix synthesis, detachment and virulence factors, among others
- Access to extracellular genetic information (eDNA)
- Facilitated horizontal gene transfer by conjugation, transduction and transformation
- Collective, coordinated behaviour (regulated by signalling molecules)



## Les biofilms sur terre:



Habitat	Estimated total (bacterial and archaeal) cell number <sup>a</sup>	Estimated cell number in biofilms <sup>b</sup>
Total Earth	$1.2 \times 10^{30}$	On surface of Earth: $3.5 \times 10^{29}$ ; deep subsurface: large but as yet unknown, ranging from $4.9 \times 10^{29}$ to $9.1 \times 10^{29}$
Deep oceanic subsurface <sup>c</sup>	$4 \times 10^{29}$	Most cells attached, either single or in clusters; 20–80% in biofilms based on microscopic and biogeochemical evidence
Deep continental subsurface <sup>d</sup>	$3 \times 10^{29}$	Most cells attached, single and microclusters; 20–80% in biofilms based on microscopic and biogeochemical evidence
Top 10–50 cm of oceanic sediment <sup>e</sup>	$5 \times 10^{28}$	$5 \times 10^{28}$
Soil	$3 \times 10^{29}$	$3 \times 10^{29}$
Open ocean	$1 \times 10^{29}$	Large planktonic fraction, unknown numbers in marine snow, transparent exopolymer particles, gels, on mineral and debris particles, microplastics, plants and animals
Groundwater	$5 \times 10^{27}$	Unattached
Atmosphere <sup>f</sup>	$5 \times 10^{22}$	Unknown but unlikely
Neuston in sea-surface microlayer <sup>g</sup>	$2 \times 10^{23}$	Mostly biofilms, $2 \times 10^{23}$
Human colon <sup>h</sup>	$4 \times 10^{23}$	$4 \times 10^{23}$
Human dental plaque	$8 \times 10^{21}$	$8 \times 10^{21}$
Human skin	$1 \times 10^{21}$	$1 \times 10^{21}$
Total human <sup>f</sup>	$4 \times 10^{23}$	$4 \times 10^{23}$
Cattle <sup>f</sup>	$4 \times 10^{24}$	$4 \times 10^{24}$
Pigs <sup>f</sup>	$7 \times 10^{23}$	$7 \times 10^{23}$
Chickens <sup>f</sup>	$5 \times 10^{18}$	$5 \times 10^{18}$
Domestic birds <sup>f</sup>	$6 \times 10^{20}$	$6 \times 10^{20}$
Termites	$6 \times 10^{23}$	$6 \times 10^{23}$

## Les biofilms sur terre:

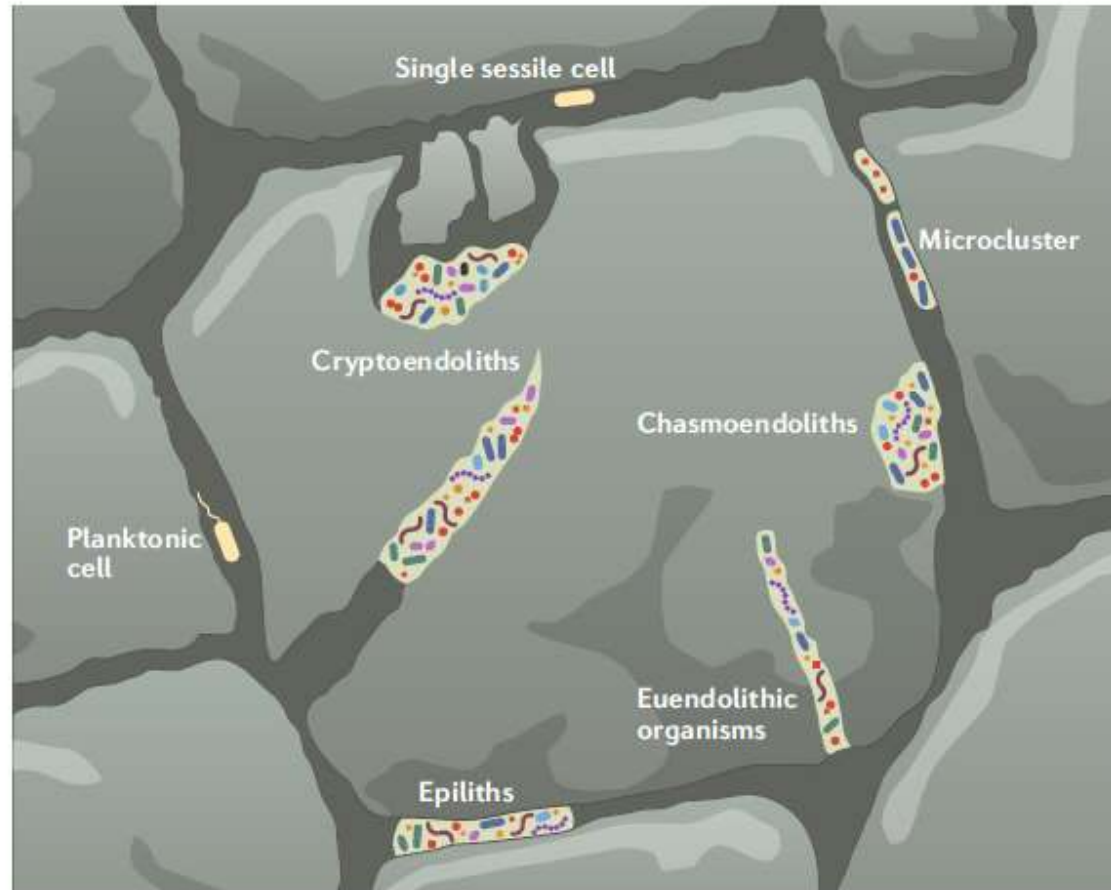


Fig. 2 | Microbial habitats in fractured suboceanic and continental basaltic rock. Microbial cells usually grow in microclusters as epiliths on the surface of rocks, as chasmoendoliths in rock fissures, as cryptoendoliths in porous rock or as euendoliths by actively penetrating rock, apart from the few that occur as planktonic cells<sup>33</sup>; in glassic basalts, microbial activity by euendolithic organisms was demonstrated<sup>202</sup>.

## Les biofilms sur terre:

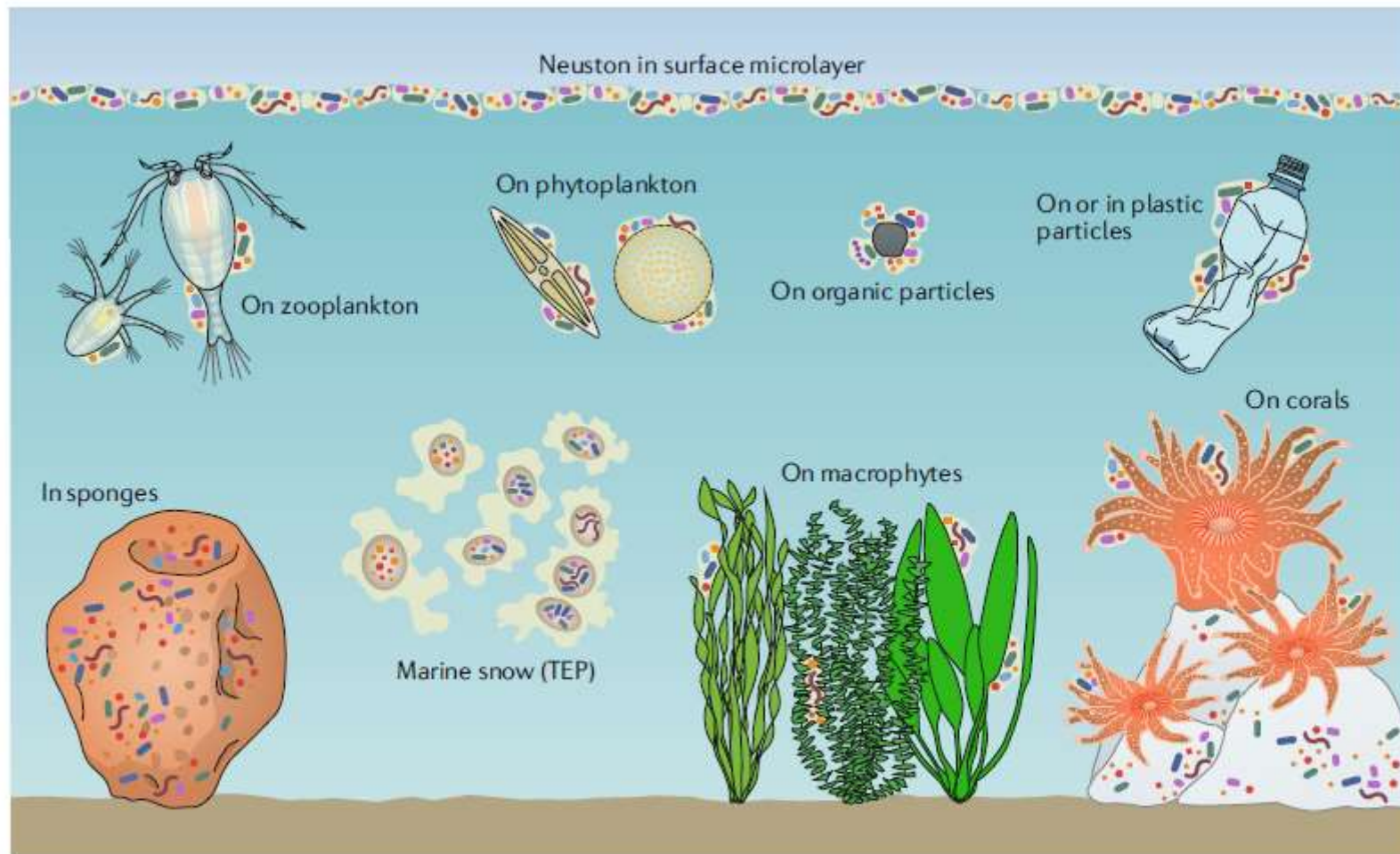


Fig. 3 | **Interfaces colonized by biofilms in the oceans.** Although oceans are considered to host mostly planktonic microbial cells, zooplankton and phytoplankton, abiotic minerals (not shown), organic and synthetic (plastic) particles, macrophytes, corals and sponges provide huge surface areas for microbial biofilms. TEP, transparent exopolymer particles.



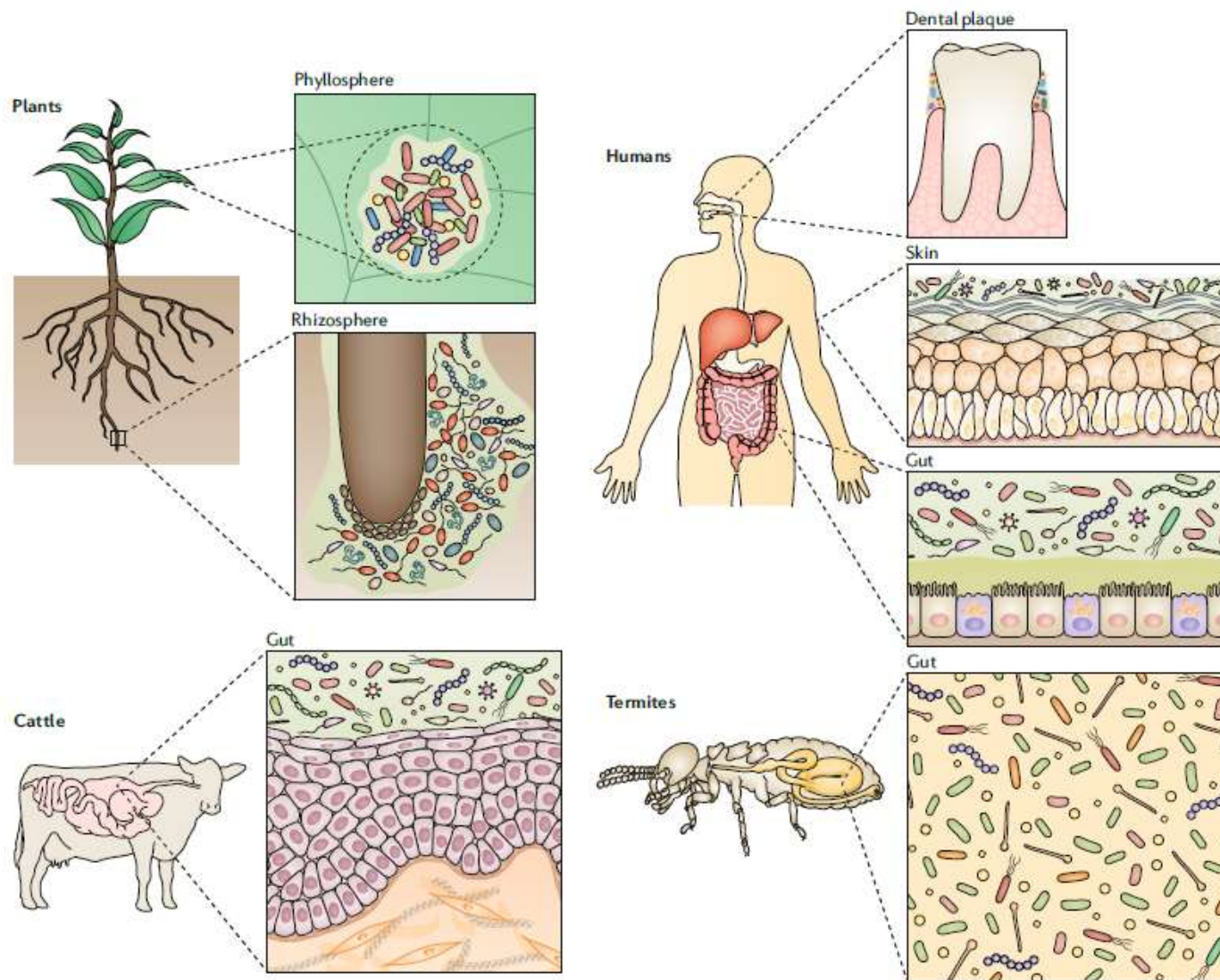


Fig. 4 | **Biofilms in eukaryotic habitats.** Plant leaves, humans, cattle and termites are colonized by microorganisms. These host-associated communities, ranging from the phyllosphere and rhizosphere to the gut microbiota, exhibit many of the key biofilm characteristics (BOX 2).

(d'après Flemming et Wuertz 2019)

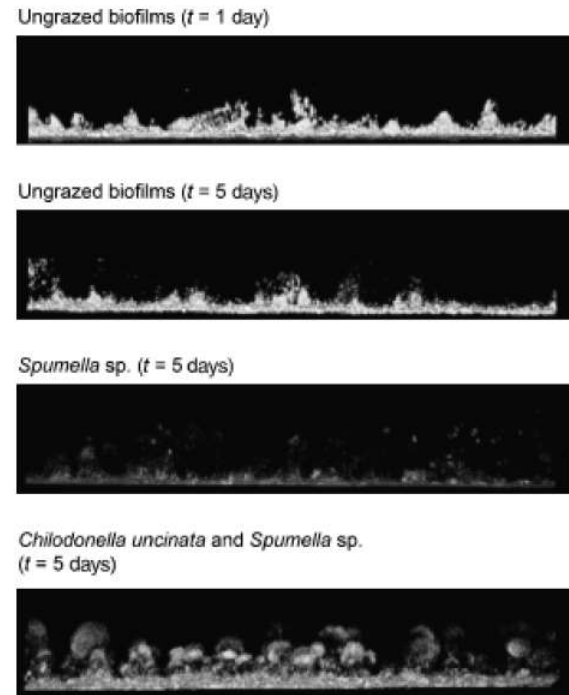


Les biofilms bactériens servent de source de nourriture pour les protistes.



Dictyostelids can penetrate biofilms and eat the bacteria within.

Film

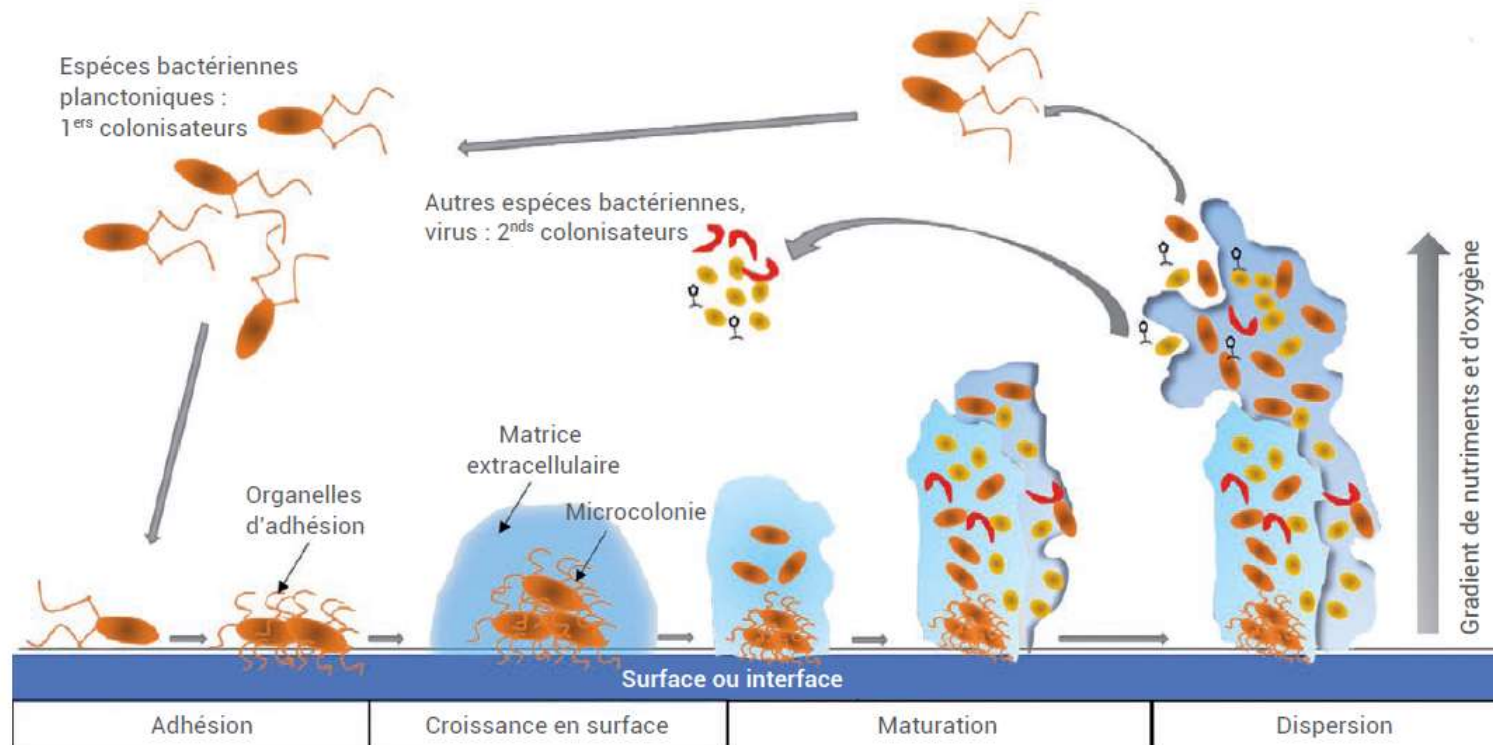


**Fig. 5.** CLSM images (xz axis) of the VYE medium bacterial biofilms grazed by the raptorial-feeding ciliate *Chilodonella uncinata* and the interception-feeding flagellate *Spumella* sp. (a) ungrazed biofilms at  $t = 1$  day, (b) ungrazed biofilms at  $t = 5$  days, (c) biofilms grazed by *Spumella* sp., and (d) biofilms grazed by *C. uncinata* and *Spumella* sp. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

D'après Böhme et al, 2009

# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

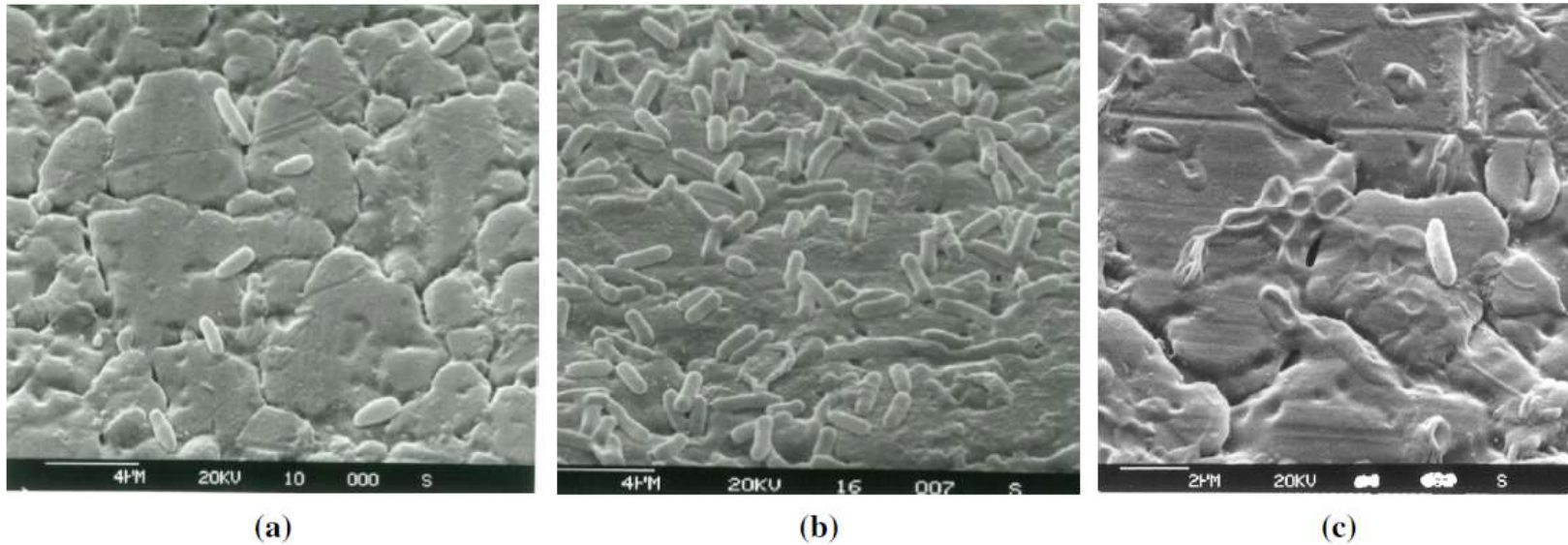
Les biofilms : une multicellularité sorocarpique? Exemple des biofilms de *B. subtilis*.



**1. Les différentes étapes de formation d'un biofilm.** Un biofilm peut être défini comme une communauté multicellulaire colonisant une surface ou une interface et dans laquelle les cellules (notamment les bactéries) sécrètent de la matrice extracellulaire polymérique. Sa formation est généralement décrite comme une succession d'étapes : adhésion, croissance en surface, maturation puis dispersion.

Voir : la mécanique des biofilms à la surface des liquides. C. Douarche, V. Bailleux, C. Even, JM. Alain, C. Regeard et E. Raspaud. Reflets de la physique N 56.

## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.



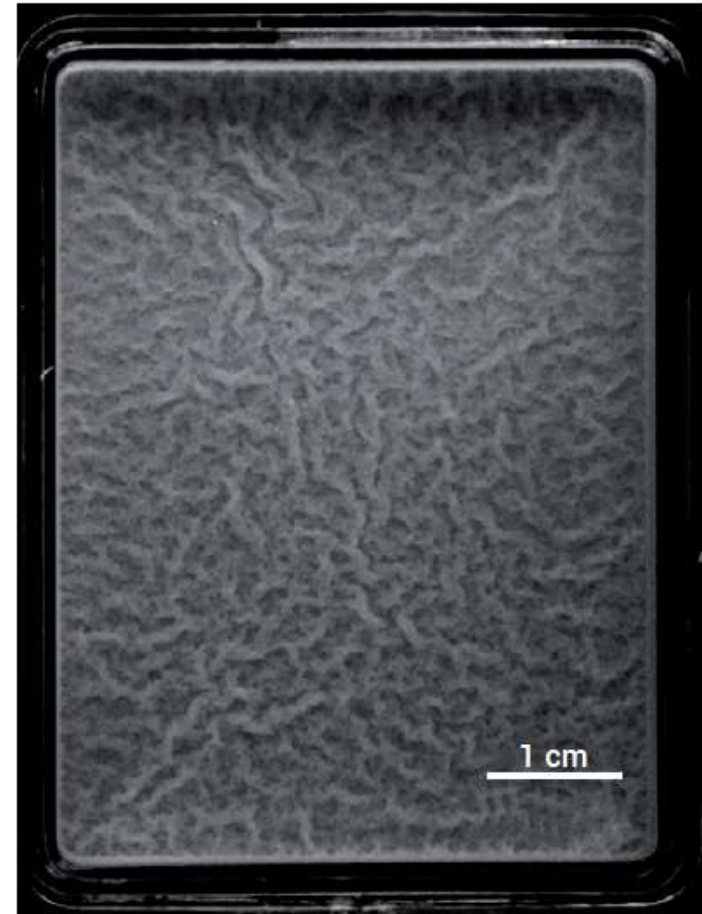
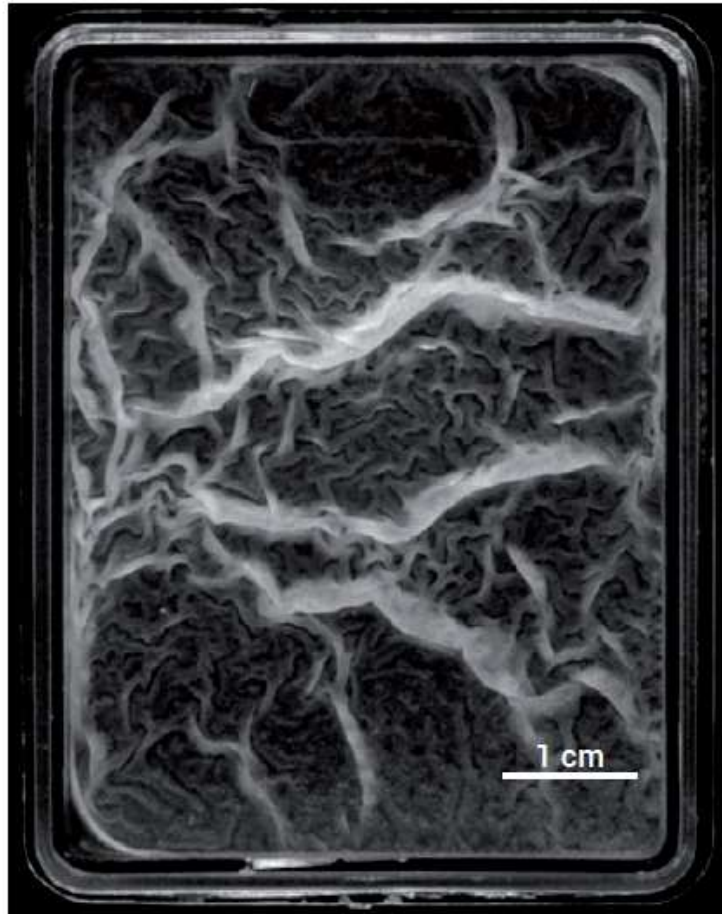
**Figure 1.** Three stages of monolayer biofilm formation on a SS surface by *A. flavithermus* strain B12 isolated from a milk powder sample. (a) Attachment of only a few cells and grain boundaries are clearly visible; (b) good coverage of cells on a SS surface with EPS production; (c) dispersal of single cells from the biofilm leaving "footprints" or depressions indicating the area that cells had previously occupied.



Actuel modèle basé sur l'adhésion d'une cellule unique, récemment controversé par des études montrant que des agrégats peuvent adhérer.

D'après Sadiq et al, 2017

## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.



**3. Formation de rides dans des biofilms en compression.** Vue de dessus de deux biofilms de *Bacillus subtilis* de type sauvage flottant sur le milieu de culture liquide après environ 67 heures d'incubation à 23 °C [4].

À gauche : la souche sauvage DV1. À droite : la souche sauvage NCIB 3610.

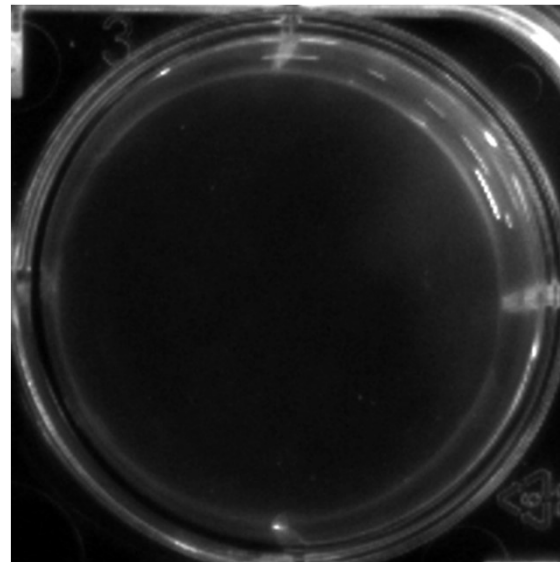


# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

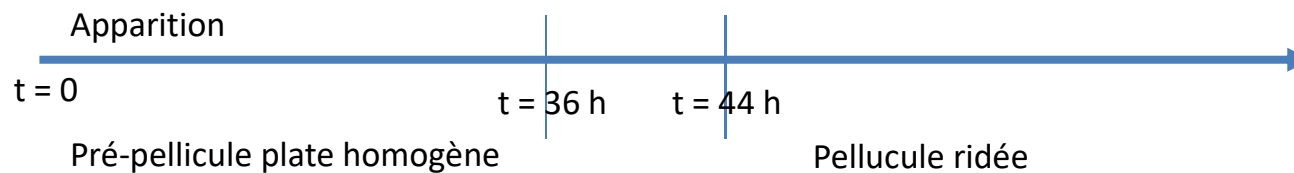


NCIB3610 Souche sauvage

23°C, environ 100 heures  
1 image/15 min.



DÉVELOPPEMENT DE LA PELLICULE?

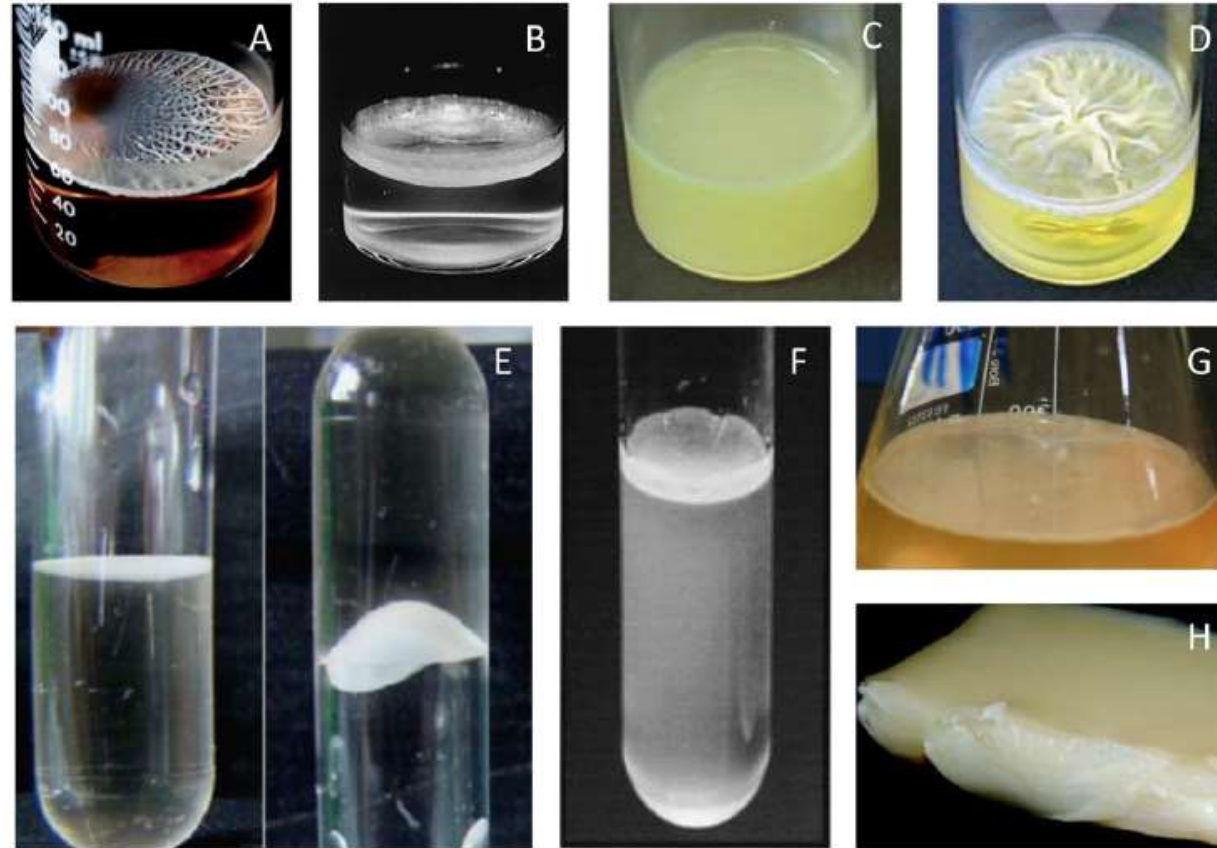


# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

## Gram-negative bacteria can also form pellicles



The air–liquid interface (ALI): an attractive but underestimated niche.



**Fig. 1.** Pellicle morphologies of various bacteria.

A. Pellicle formed by *Bacillus subtilis* after 5 days at RT in MSgg medium (Branda *et al.*, 2001).

B. Pellicle formed by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader variant after 7 days at 28°C in KB medium (Rainey and Travisano, 1998).

C and D. Pellicles formed by different *Pseudomonas* species after 3 days at 18–22°C in KB medium (Ude *et al.*, 2006).

E. Pellicle formed by *Acinetobacter baumannii* after 5 days at 25°C in MHB medium. The picture of the tube hanging upside down is shown to illustrate the strength and cohesiveness of the pellicle (Martí *et al.*, 2011).

F. Pellicle formed by *Salmonella enteritidis* after 4 days at room temperature in LB medium (Solano *et al.*, 2002).

G. Pellicle formed by *Shewanella oneidensis* after 3 days at room temperature in LB medium.

H. Gel-like pellicle formed by *Gluconacetobacter xylinus* after 2 weeks at 30°C in HS medium (Koizumi *et al.*, 2008).



# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

Les biofilms sont étudiés « en pellicules ou en colonies »



Biofilm\_1280wide\_LR.gif



Figure 1. Architectural differences between biofilms from distinct *B. subtilis* species  
Strains were grown in MSgg agar for 72 h at 30 °C. *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* 3610 was isolated from Marburg (Germany). *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* 168 is a laboratory strain. *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* RO-NN-1 was isolated from the Mohave dessert (USA). *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* AUS198 was isolated from Salzburg (Austria). *Bacillus subtilis* subspecies *vallismortis* DV1-F3 was isolated from the Death Valley (USA). *Bacillus subtilis* subspecies *mohavensis* RO-H-1 was isolated from the Mohave dessert (USA). *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii* DIV-B-1 was isolated from

## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

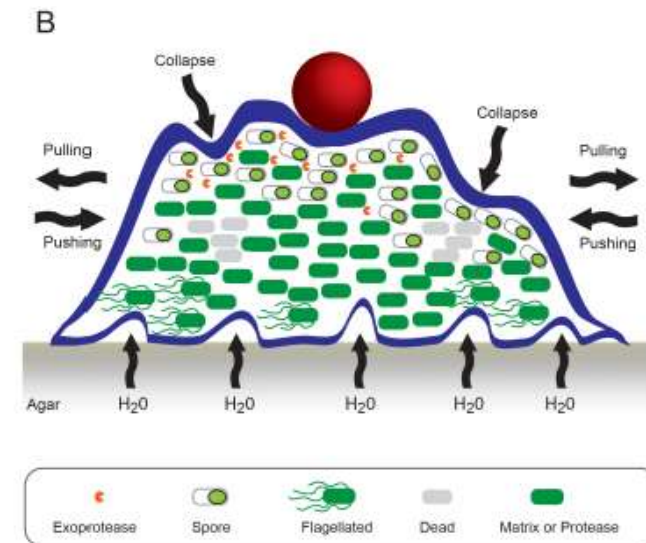


Chez *B. subtilis* les biofilms sont étudiés sous différentes formes.

= communauté coopérative qui dérive d'une population isogénique, par différenciation en cellules spécialisées et, par le partage de macromolécules constituant la matrice extracellulaire.



**Fig. 1. *Bacillus subtilis* biofilm formation.**  
A. The mature biofilm exhibits a complex network of intertwined wrinkles and ridges and is highly hydrophobic. A 7  $\mu$ l water droplet stained with red food colouring was placed on the biofilm.  
B. The mature biofilm is generated as a consequence of many converging factors. This is represented schematically in cross-section in this figure. Contributing to biofilm formation is the differentiation of cell fate in the population, the death of cells at the base of wrinkles, the mechanical forces imparted by the biofilm matrix that both push or pull the community and the production of the extracellular matrix. The BslA coat is shown as a dark blue layer and the EPS and TasA fibres encased within this boundary but are not depicted. The red ball represents a water droplet and shows the hydrophobicity exhibited by the structure. Channels that allow fluids to flow into the biofilm are shown at the base of the structure.



La matrice extra-cellulaire est constituée de protéines (TasA et TapA, BslA), et d'exopolysaccharides de haut poids moléculaire.





## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

### Spo0A : Protéine Clef de la transition Planctonique-Biofilm

Activée par phosphorylation. (Phospho-relais avec Spo0B – Spo0F).

Phosphorylation activée par 5 différentes kinases (KinA-E).

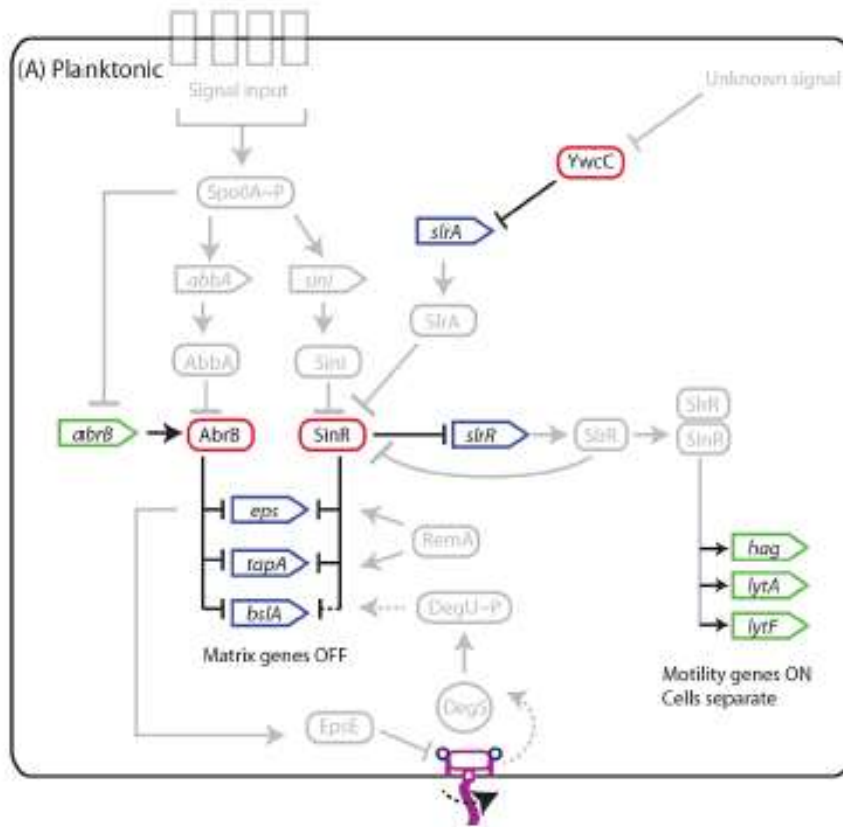
Certains des signaux permettant l'activation des kinases ont été identifiés:

KinC: évacuation d'ions K<sup>+</sup>, stimulée par la surfactine grâce à l'opéron *mstX-yugO* (*yugO* = canal à K<sup>+</sup>)

KinD : senseur de la présence de glycerol, de manganèse, de L-acide malique (produits libérés des racines de plantes).

KinB : stimulée quand la respiration est affectée (stress en basse concentration d'oxygène).

KinA : senseur de l'état énergétique de la cellule par liaison au NAD<sup>+</sup>.



Propriétés élastiques du biofilm : apparition de rides.

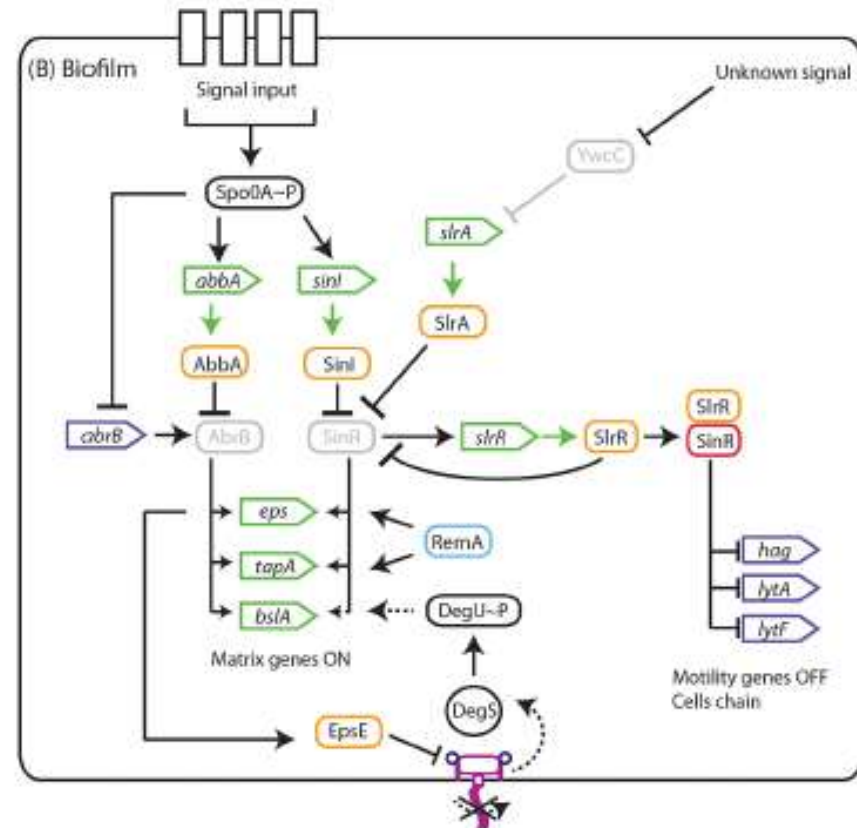
Présence de canaux induit par mort cellulaire.



La composition des eps dépend du milieu de culture.

TasA : export dépend de SipW, forme des « fibres » amyloïdes dont l'assemblage dépend de TapA.

BsIA (hydrophobine) : forme une couche hydrophobique entourant le biofilm.



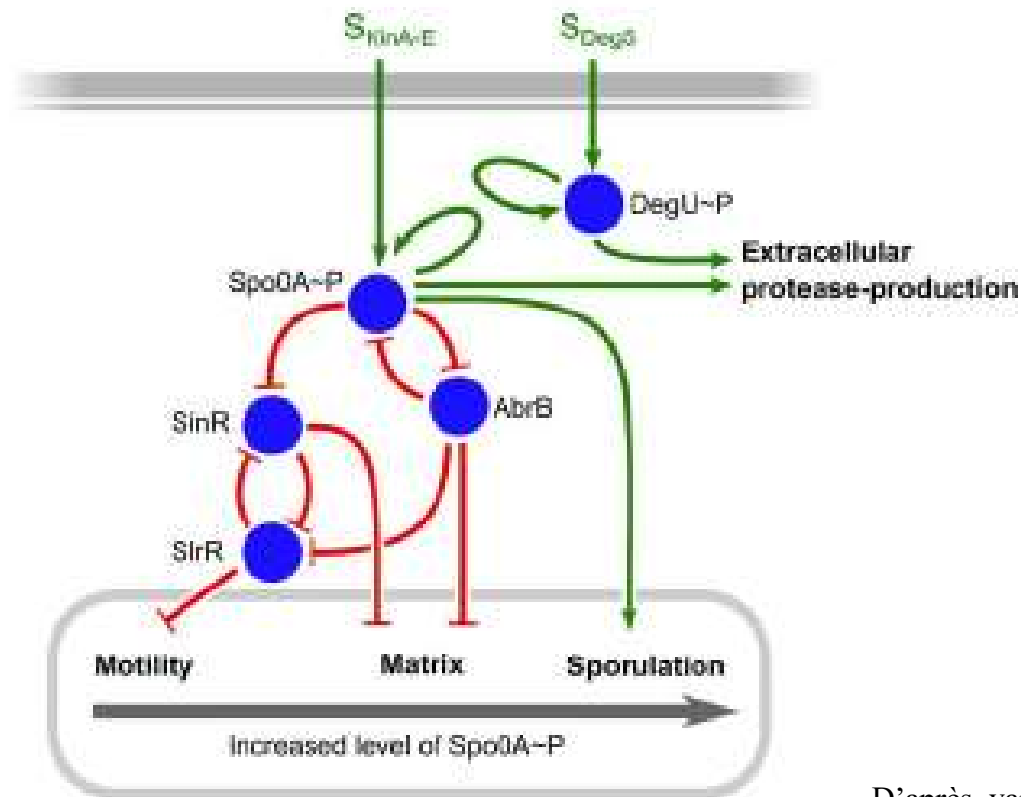
D'après Cairns et al, 2014

# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

Les différents niveaux de phosphorylation de Spo0A entraînent des spécialisations cellulaires différentes.



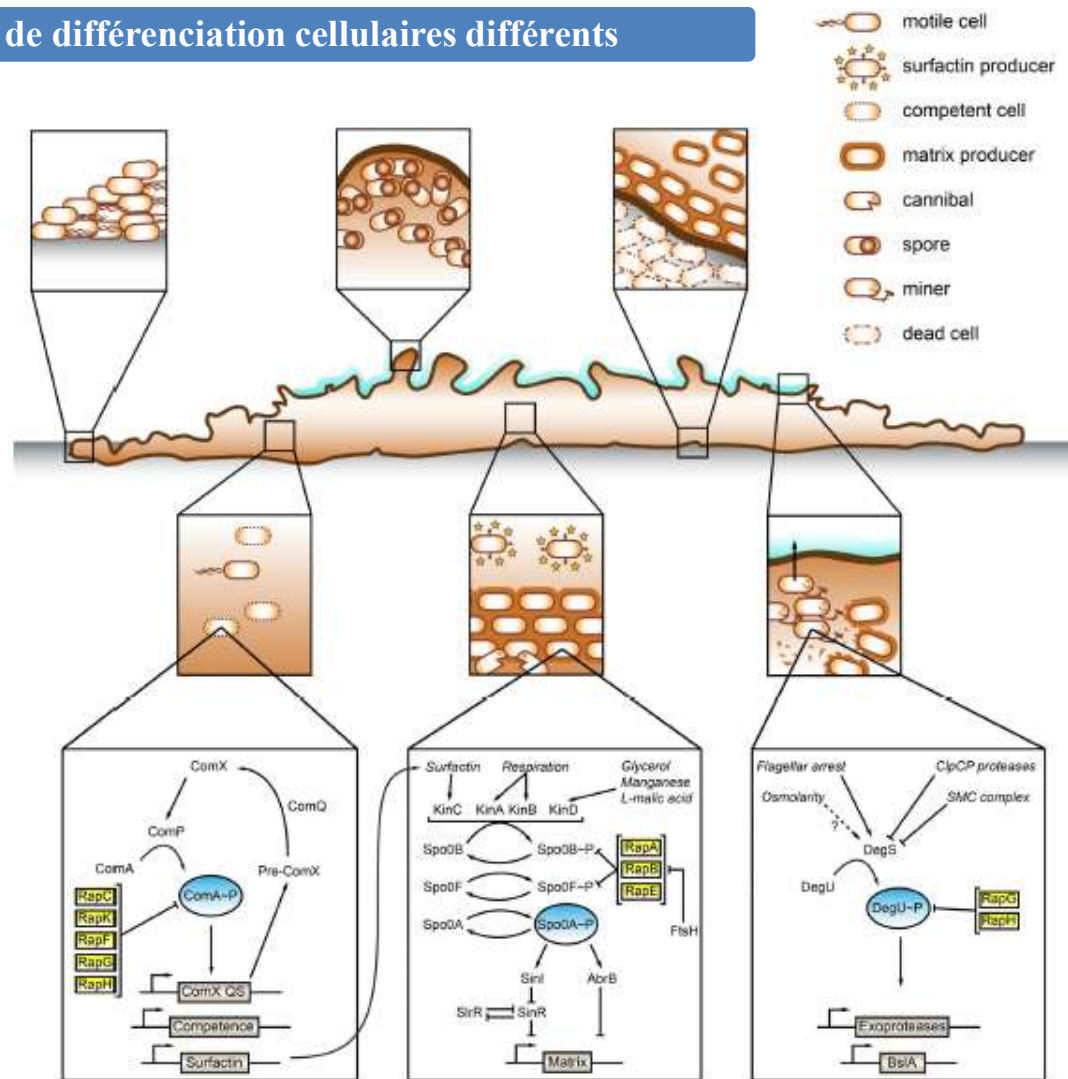
## (A) Signal-response regulation



D'après van Gestel et al, 2015

En fonction de la localisation dans le biofilm:

des programmes de différenciation cellulaires différents



**Figure 2. Different cell differentiation programs coexist in *B. subtilis* biofilms**  
 Schematic representation of a thin-sectioned mature biofilm, in which distinct subpopulations of cell types coexist and exhibit different spatio-temporal distribution patterns. The different genetics programs related to cell differentiation are detailed, and the genes related specifically for each differentiation process are located within the specific frame.

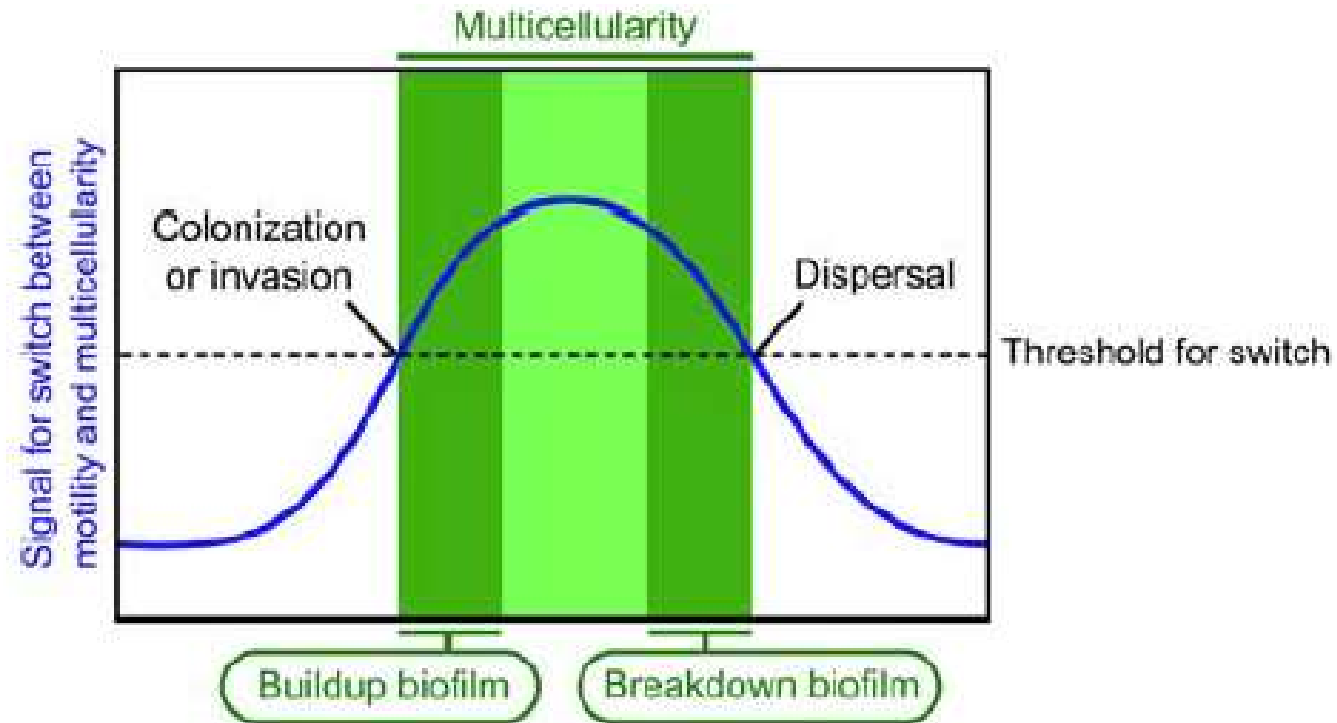
D'après Mielich-Süss et al, 2015





## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

Le cycle de vie des bactéries revisité par l'écologie de la différenciation cellulaire:



Cycle biphase (alternance planctonique/biofilm)

## V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.



Les biofilms ont émergé en plusieurs étapes évolutives:

- 1) Multicellularité sorocarpique.
- 2) « Partage du travail » (the division of labor).

Notion qui nécessite une interaction coopérative entre cellule spécialisée.

La coopération est définie par l'expression d'un phénotype coûteux individuellement mais bénéfique lorsque partagé.

Les cellules spécialisées d'un biofilm fonctionnent ensemble mais ont différents rôles.

Hétérogénéité phénotypique.

Cette hétérogénéité peut résulter de différents mécanismes :

Réponses à des microenvironnements.

Différentiel d'expression de gènes.

Variations épigénétiques ou génétiques.

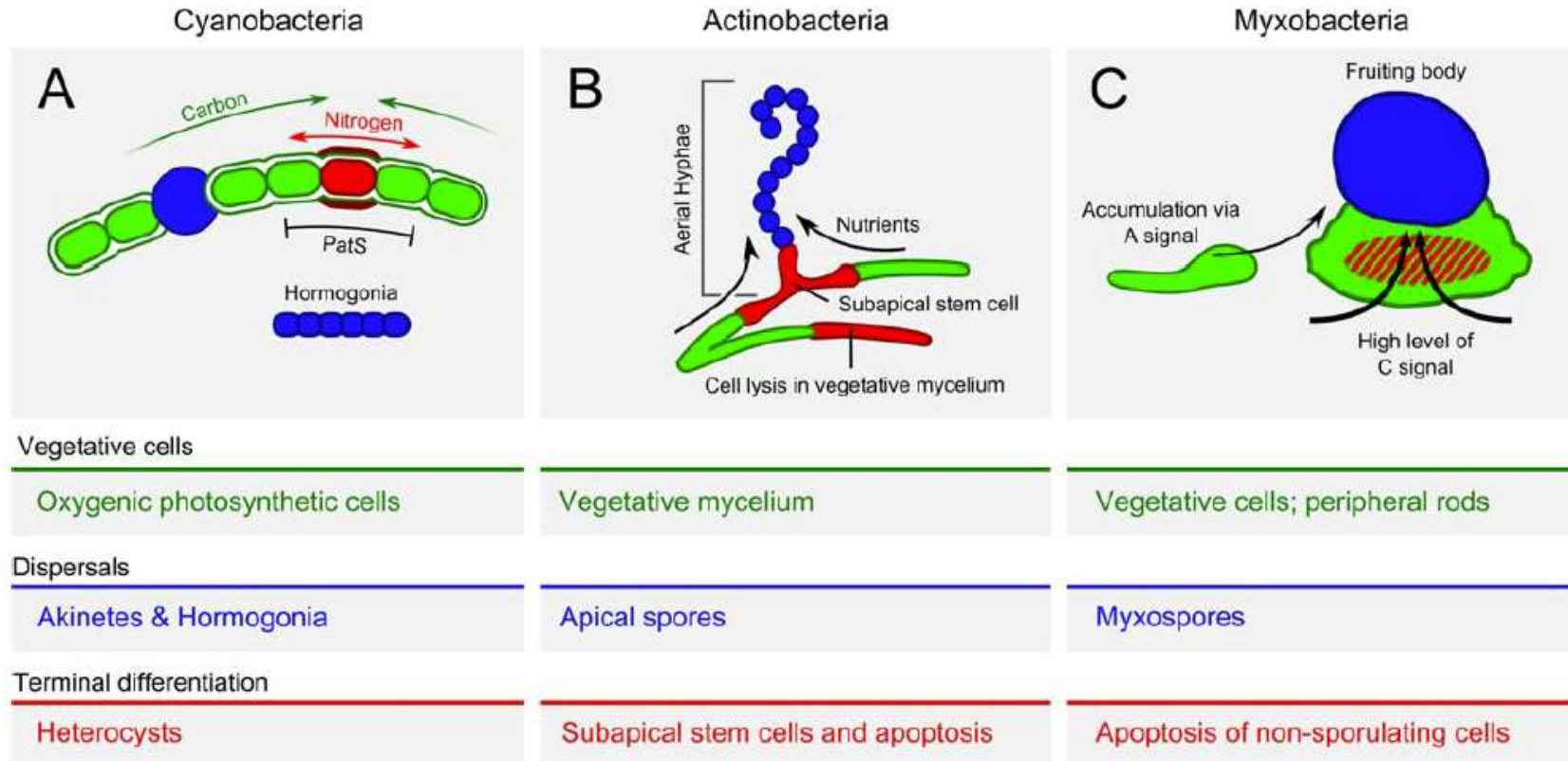
Les différents état phénotypiques sont mutuellement exclusifs.

Au niveau cellulaire : différenciation; Au niveau de la colonie : partage du travail.

# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.



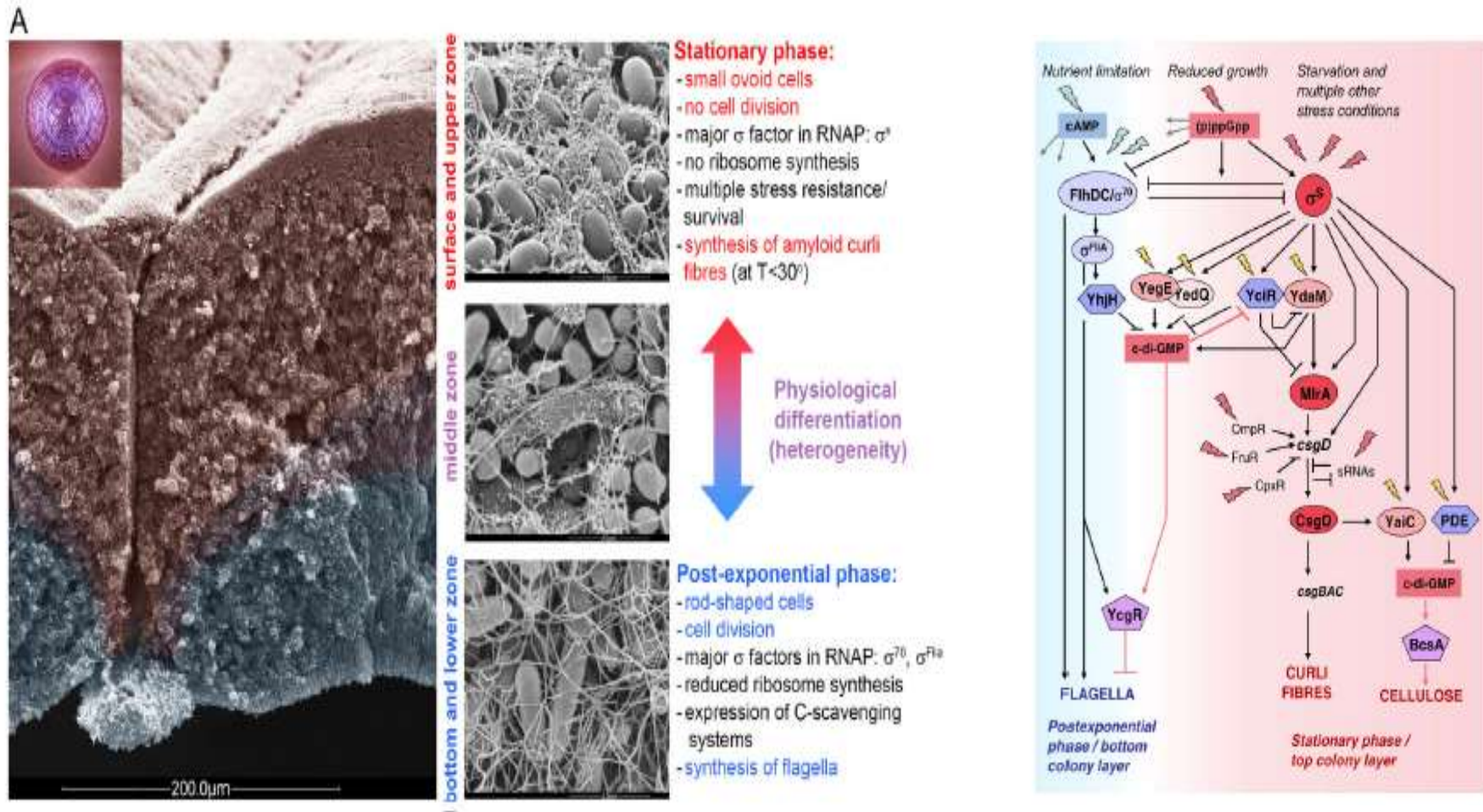
## Le partage du travail dans d'autres espèces



D'après van Gestel et al, 2015

# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

Chez d'autres espèces bactériennes : des biofilms également structurés

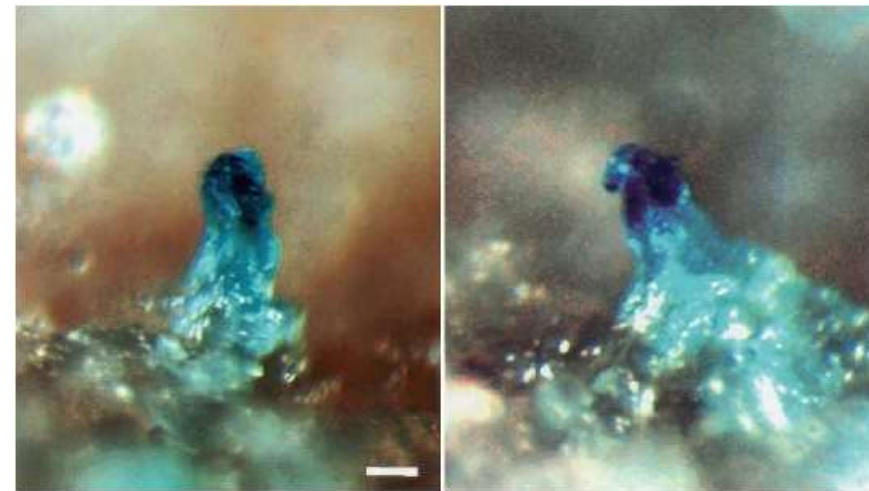
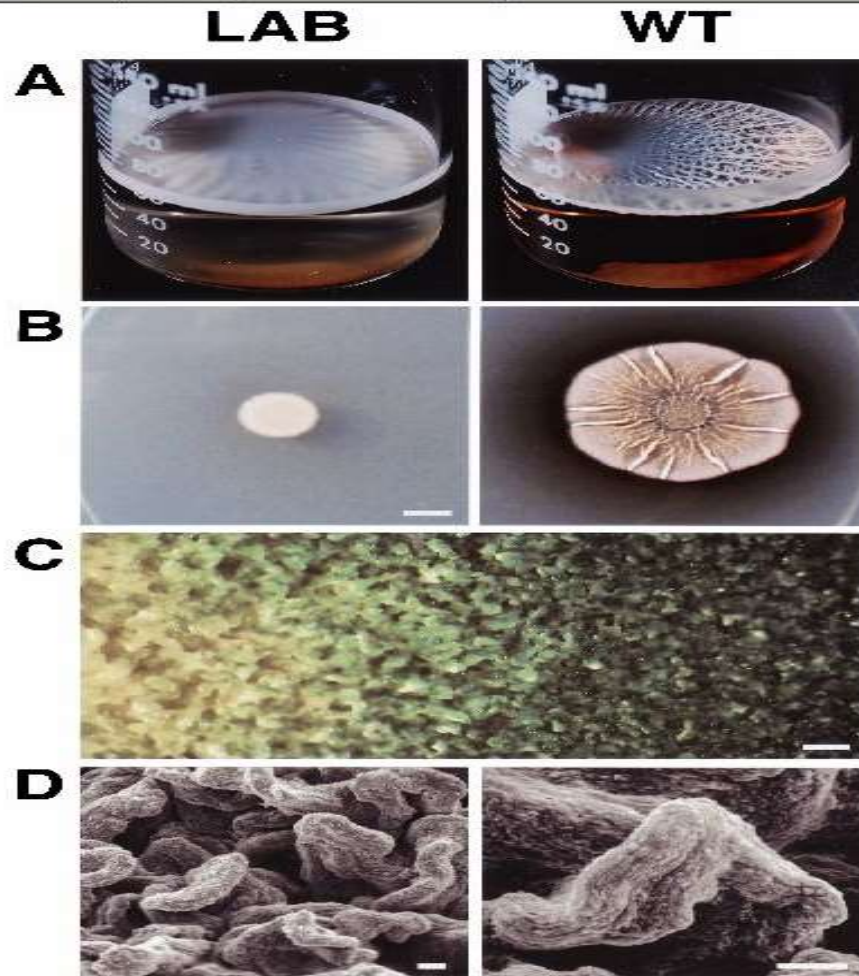


Biofilm en colonie de *E. coli*. (Serra et al, 2014)



# V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

Une différenciation terminale : formation de « corps fructifères » dans les biofilms de *B. Subtilis*



**Fig. 1.** Architecture of *B. subtilis* pellicles and colonies. (A) LAB and WT pellicles. Overnight cultures were diluted 1,000-fold into M5gg medium, and 60 ml was transferred to 150-ml Pyrex beakers. These cultures were incubated at 25°C without agitation for 5 days and then photographed. (B) LAB and WT colonies. Five microliters from overnight cultures were spotted onto a dry minimal agar plate. The plate was incubated at 25°C for 5 days and then photographed. (Bar = 5 mm.) (C) Close-up of the edge of a WT colony. A colony was grown at 25°C for 2 days and then photographed at 16× magnification with a dissection microscope equipped with a charge-coupled device video camera. (Bar = 100 μm.) (D) Scanning electron micrographs of a WT colony. A colony similar to that shown in C was photographed at 600× magnification (Left) and 1,000× magnification (Right). (Bars = 10 μm.)



D'après Branda et al, 2001

## La formation des endospores chez *Bacillus subtilis*.



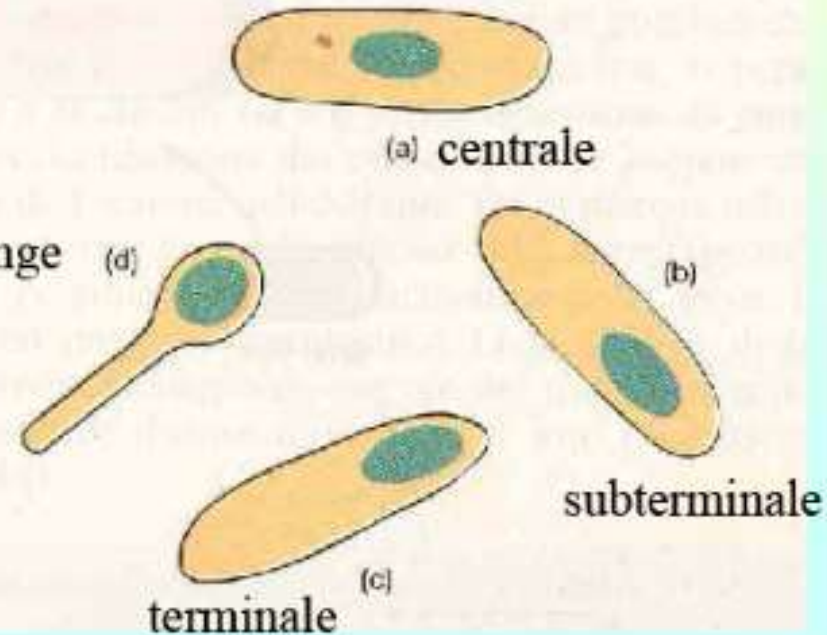
- 1) Stratégie de survie extrême.
- 2) Les spores sont résistantes à la chaleur, au froid, aux radiations, et à d'autres environnements ou facteurs extrêmes.
- 3) La fonction primaire des spores : Survie et Dissémination.
- 4) Les spores peuvent se « réactiver » (germer), quand les conditions de croissances sont possibles, et se re-transforment en cellules végétatives.
- 5) Ce processus de différenciation a été intensivement étudié chez *B. subtilis* mais de nombreuses autres espèces bactériennes en sont capables.
- 6) Il faut noter que la spore ne peut pas respirer car la paroi sporale ne contient pas de cytochromes.
- 7) Elle a un aspect rond sphérique ou ovale. Cet aspect est net, car elle est réfringente.
- 8) La spore est thermorésistante car sa teneur en eau est très faible.

## Morphologie des spores



- Position de la spore

Spore terminale avec sporange gonflé



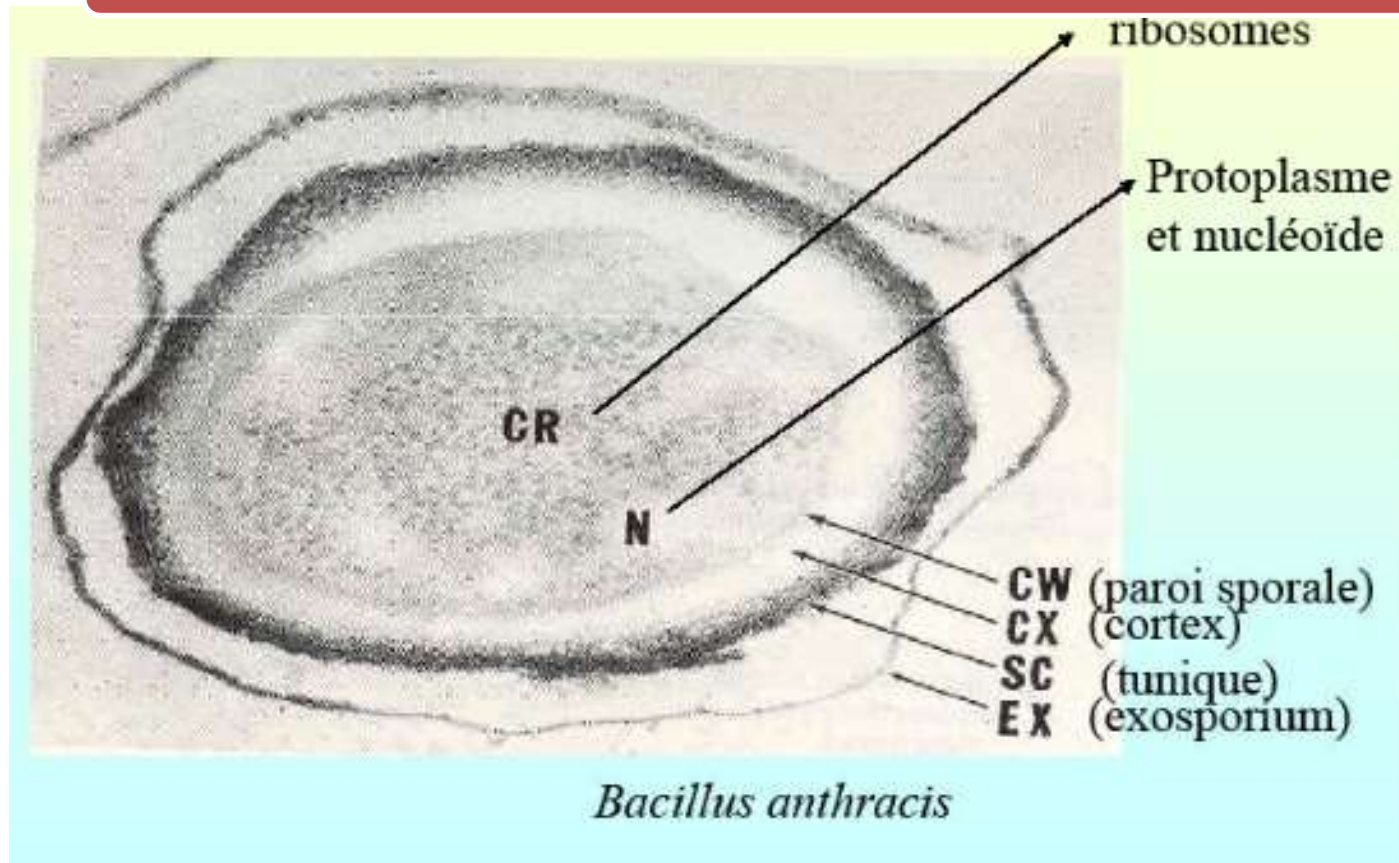
La spore apparaît comme un corps sphérique ou ovoïde d'un diamètre variant de 0,2 à 2 mm.

La grosseur et la position ne sont pas les mêmes pour toutes les espèces.

Si le diamètre est supérieur à celui de la cellule végétative la spore est qualifiée de déformante, dans le cas contraire elle est non déformante.

Sa situation à l'intérieur de la cellule permet de reconnaître des spores centrales, subterminales, terminales, des spores subterminales ou terminales.

## Morphologie des spores



La membrane cytoplasmique, analogue à celle de la cellule végétative, est entourée de la paroi sporale, elle contient un peptidoglycane qui deviendra la paroi de la cellule végétative.

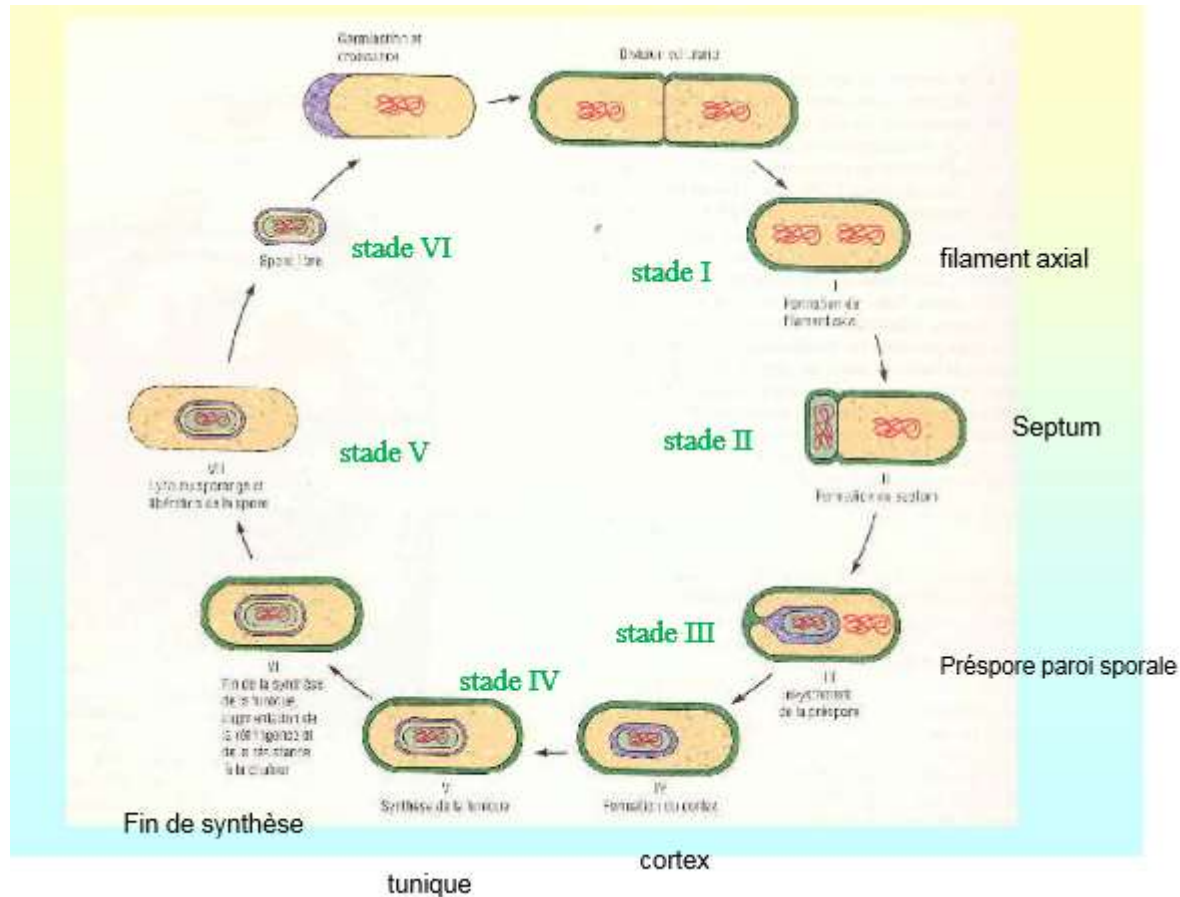
Le cortex constitue une couche épaisse formée de peptidoglycane mais de type inhabituel très sensible aux lysozymes.

La tunique est composée d'une protéine de type kératine riche en ponts disulfure . Cette couche imperméable est responsable de la grande résistance de la spore aux agents chimique.

L'exosporium, tégument le plus externe est une membrane lipoprotéique contenant 20% de sucres n'est pas essentiel la survie de la spore et sa fonction est mal connue



## Les différentes étapes :



**Le stade I :** se caractérise par la présence d'un matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond à 2 génomes.

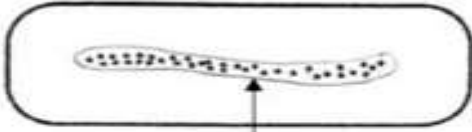
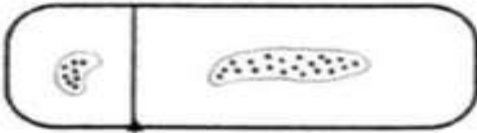
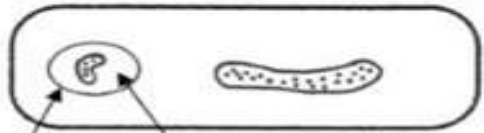
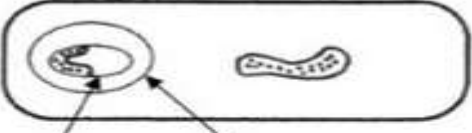
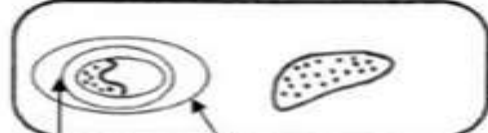
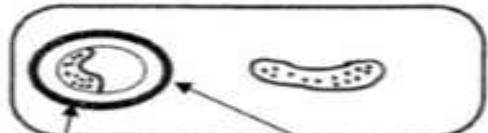
**Stade II :** les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales.

**Stade III :** Ce septum de sporulation va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une pré-spore.

**Stade IV :** Entre les deux membranes limitant la pré-spore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex.

Aux **stades V et VI :** les tuniques sont élaborées et, après maturation, la cellule mère se lyse et libère la spore mature (Autolyse).

## LES STADES MORPHOLOGIQUES DE LA SPORULATION

 <p style="text-align: center;">bactérie filament chromatique axial (ADN)</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arrêt de la synthèse d'ADN, d'ARN et donc de protéines</li> <li>• Présence d'un filament chromatique axial qui s'étend sur presque toute la cellule (résultant de la dernière réplication du génome, donc contenant 2 génomes)</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">septum de sporulation</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Séparation des 2 génomes et création du septum de sporulation situé près de l'un des pôles de la bactérie (= cloisonnement membranaire formé par invagination de la membrane plasmique)</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">préspore cytoplasme présporal</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Détachement du septum de la membrane pour envelopper le cytoplasme présporal</li> <li>• Formation d'une préspore ovoïde</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">paroi sporale cortex</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 4</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de la paroi sporale qui correspond à l'ébauche de la paroi de la future bactérie</li> <li>• Apparition d'une enveloppe : le cortex</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">cortex tunique interne</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 5</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de la tunique interne, à l'extérieur du cortex (nature essentiellement protéique)</li> </ul>
 <p style="text-align: center;">enveloppes sporales spore intracellulaire (endospore)</p>	<p style="text-align: center;"><b>Stade 6</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de la tunique externe et de l'exosporium</li> <li>• Lyse de la cellule mère et libération de la spore (spore extracellulaire)</li> </ul>

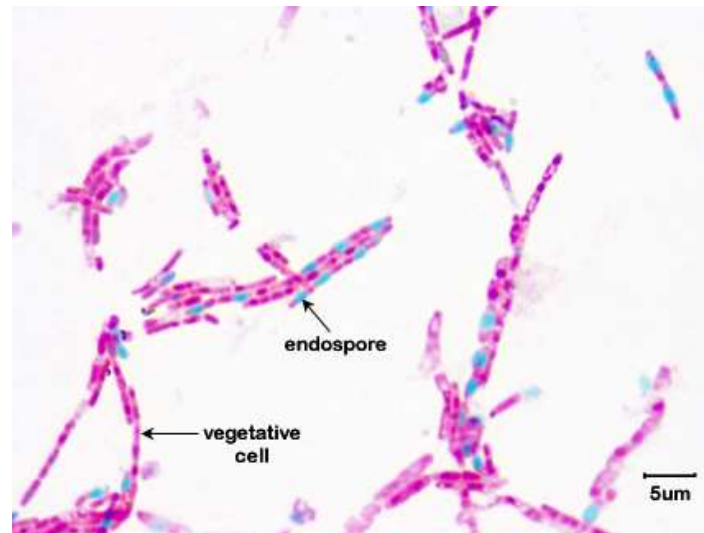
**Table 4.3** Differences between endospores and vegetative cells

<i>Characteristic</i>	<i>Vegetative cell</i>	<i>Endospore</i>
Structure	Typical gram-positive cell; a few gram-negative cells	Thick spore cortex; Spore coat; exosporium
Microscopic appearance	Nonrefractile	Refractile
Calcium content	Low	High
Dipicolinic acid	Absent	Present
Enzymatic activity	High	Low
Metabolism (O <sub>2</sub> uptake)	High	Low or absent
Macromolecular synthesis	Present	Absent
mRNA	Present	Low or absent
DNA and ribosomes	Present	Present
Heat resistance	Low	High
Radiations resistance	Low	High
Resistance to chemicals (for example, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) and acids	Low	High
Stainability by dyes	Stainable	Stainable only with special methods
Action of lysozyme	Sensitive	Resistant
Water content	High, 80–90%	Low, 10–25% in core
Small acid-soluble proteins (product of <i>ssp</i> genes)	Absent	Present
Cytoplasmic pH	About pH 7	About pH 5.5–6.0 (in core)

Certaines bactéries sporulantes sont pathogènes:



- *Clostridium botulinum* – botulism
- *Clostridium perfringens* – gas gangrene
- *Clostridium tetani* – tetanus
- *Bacillus anthracis* – Woolsorter's Disease and wound infections
- The Schaeffer-Fulton Stain Procedure is used to differentiate between endospores and vegetative cells





V-Biofilm et sporulation chez *Bacillus subtilis* : le partage du travail.

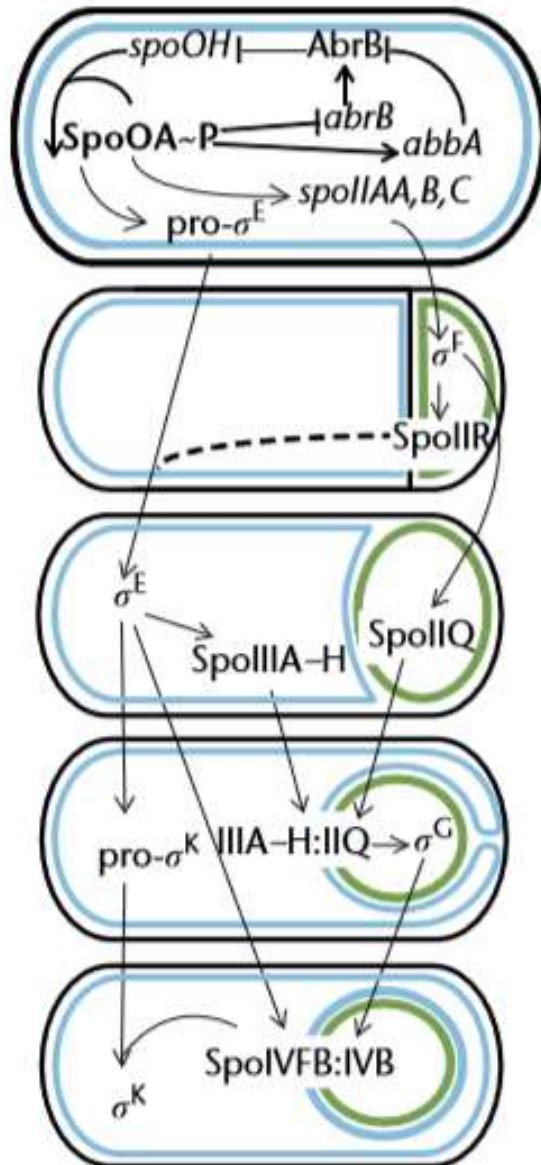
## Régulation de la sporulation chez *B. subtilis*

Film R. Losick

<https://www.youtube.com/watch?v=EHdXWqeXZY0>



## Régulation de la sporulation chez *B. subtilis*



Feed-forward activation of sporulation. The product of *spoOH*,  $\sigma^H$ , accelerates *spo0A* expression, leading to the production of  $\text{pro-}\sigma^E$  and the SpoIIA proteins (AC is  $\sigma^E$ , and AB is an anti- $\sigma^E$  protein).

Asymmetric septation. SpoIIA in the forespore membrane dephosphorylates SpoIIAB, turning AB into an anti-IIAB protein, which releases  $\sigma^F$  in the forespore.

Passage of SpoIIR from the forespore into the space between compartments activates processing of  $\text{pro-}\sigma^E$  to  $\sigma^E$  in the mother cell.

As engulfment nears completion, the SpoIIA-H complex (mother cell) interacts with SpoIIQ (forespore) to signal the expression of the gene for  $\sigma^G$  (forespore).

As engulfment is complete, SpoIVB (forespore) contacts the BofA/SpoIVFA/SpoIVFB complex (mother cell membrane), permitting SpoIVFB to activate  $\text{pro-}\sigma^K$  (mother cell).



## VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

### *Caulobacter crescentus* : une multicellularité zygotique

6

## *Caulobacter crescentus* life cycle

- *Caulobacter crescentus* is the best studied of the so-called stalked bacteria.
- Two very different cells are formed:
  - *Swarmers cells*: motile and incapable of replicating its DNA
  - *Stalked cells*: nonmotile but capable of DNA replication



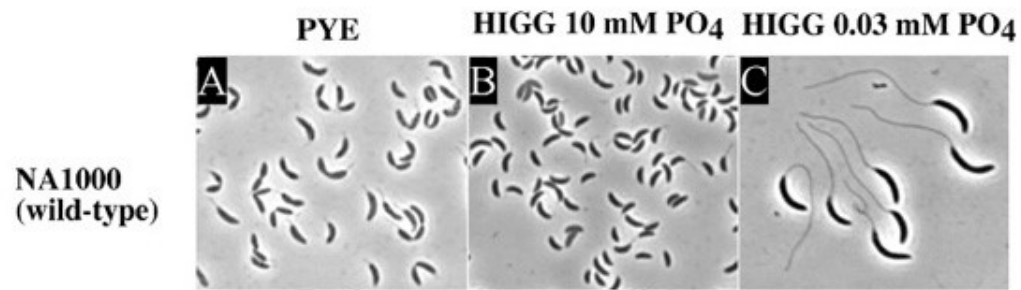
## VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

### *Caulobacter crescentus* : une multicellularité zygotique

Bacteria;  $\alpha$ -Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae

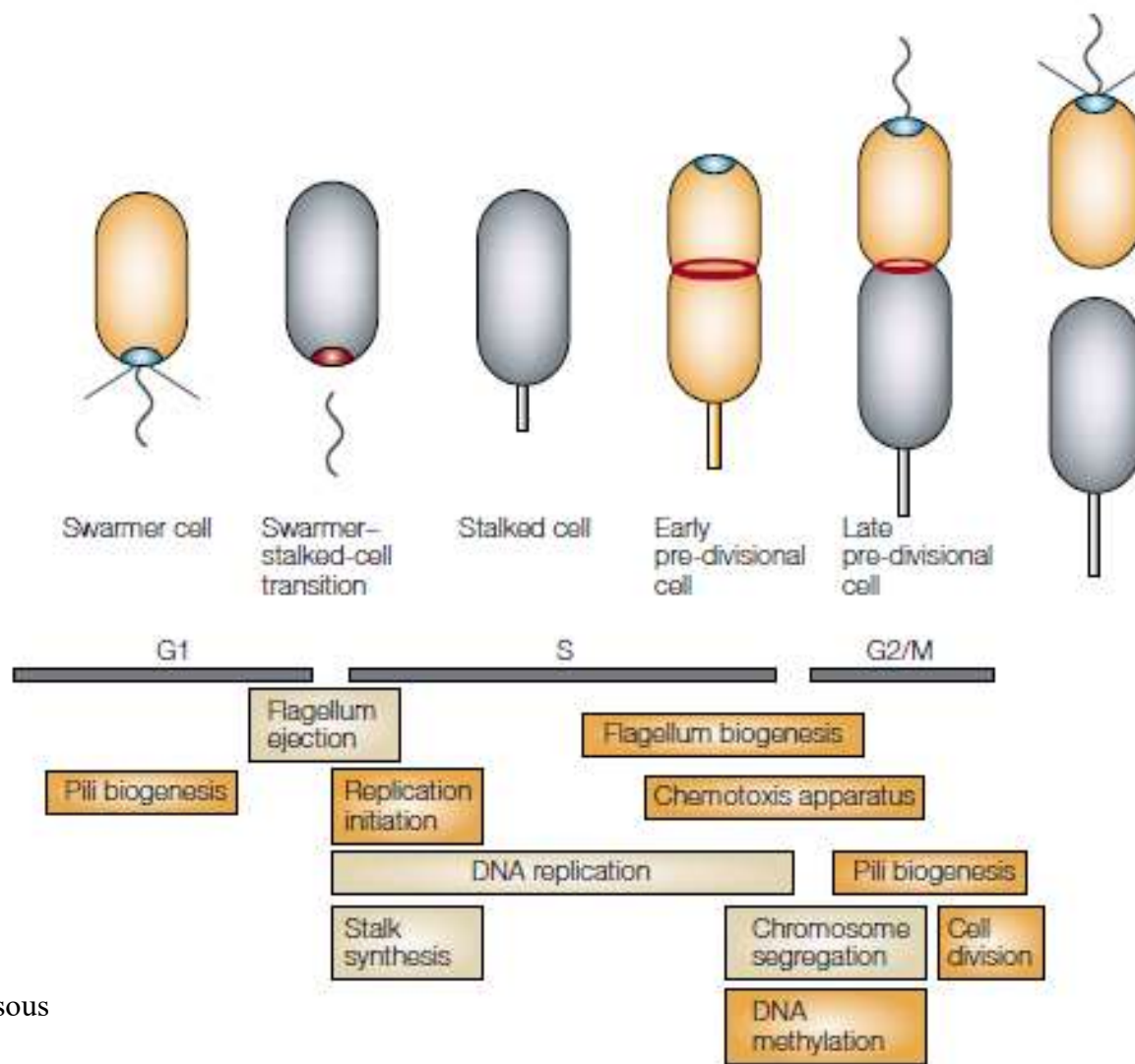
*Caulobacter crescentus* is a single-celled, small bacterium that divides asymmetrically producing cells that differ in structure and function - it is an ideal model system for the mechanisms of asymmetric cell division and has been studied thoroughly.

*Caulobacter* generally live in a dilute aquatic environment where the most common limiting nutrient is phosphorus, an essential element for healthy growth. Lack of this nutrient induce *Caulobacter* to dramatically elongate its stalk up to 30 times longer than those in phosphate-rich medium (Brun et al. 2000).





## VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.



D'après Jenssen et al,  
2012

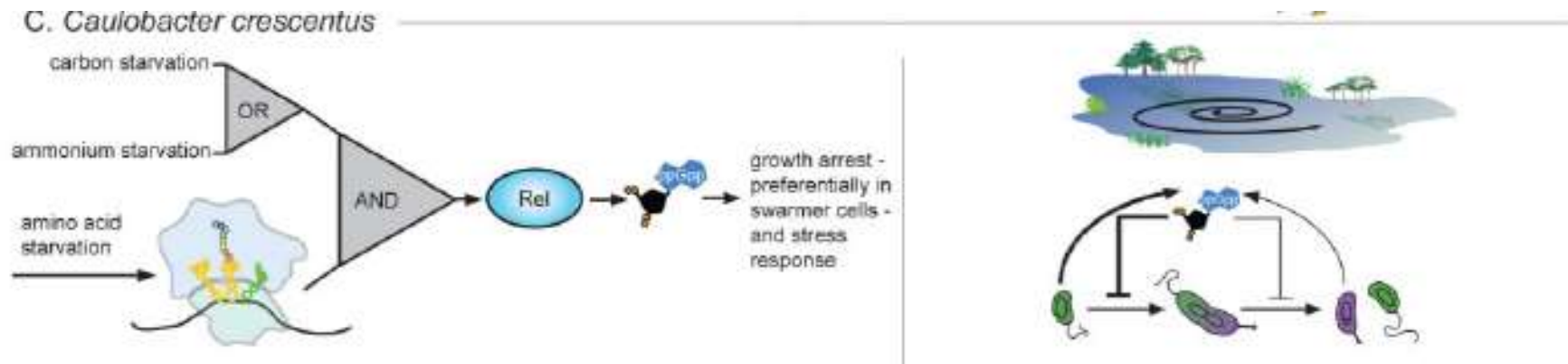
## VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

La réponse stringente permet une adaptation à l'oligotrophie et module le cycle de vie dimorphique de *C. crescentus*.

Adaptation à l'oligotrophie : séparation des rôles. Recherche de nourriture = cellule nageuse; Division = cellule attachée.

(p)ppGpp s'accumule dans les cellules nageuses.

L'activation de Rel nécessite deux signaux.



D'après Boutte et al.



## VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

### Contrôle de la progression du cycle cellulaire:

Au niveau de la transcription:

Expériences de transcriptome (abondance des ARNm (90%)).

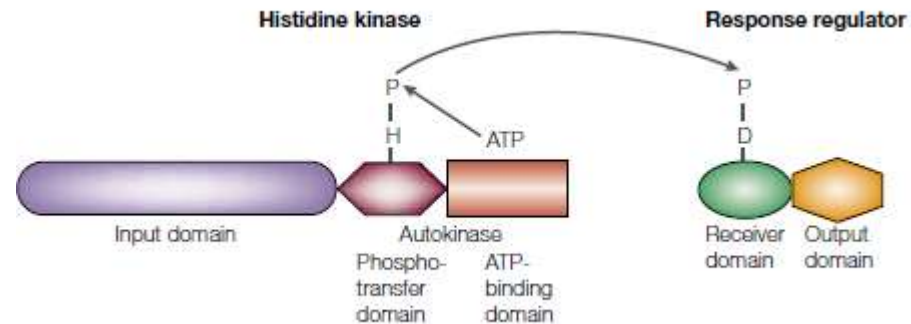
553 gènes (19%) différemment transcrit durant la différenciation.

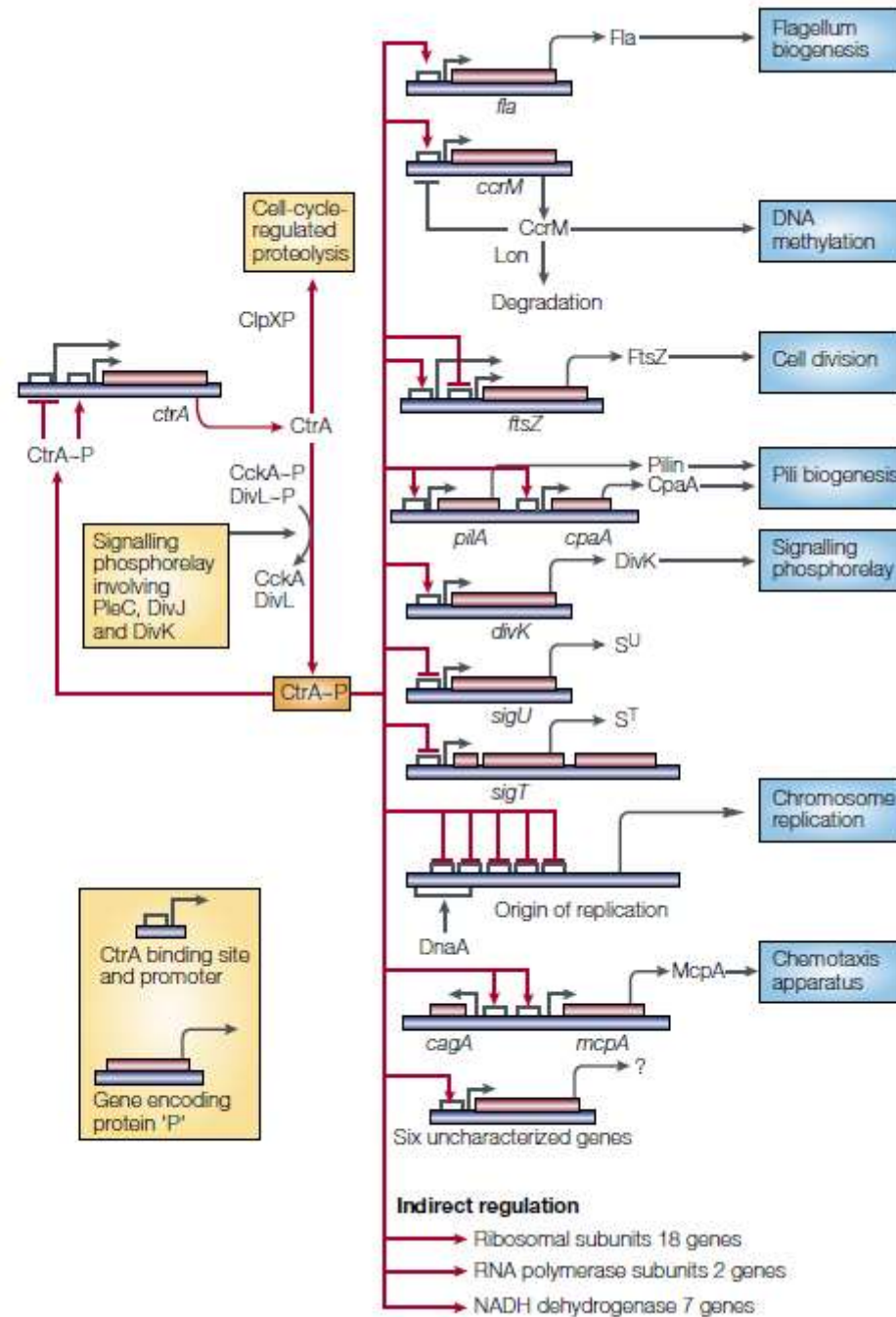
Ex: DnaA : exprimé dans les cellules nageuses tardives.

25% des 553 gènes sont contrôlés par CtrA régulateur-réponses d'un système à deux composants.

Au niveau post traduction par protéolyse spécifique.

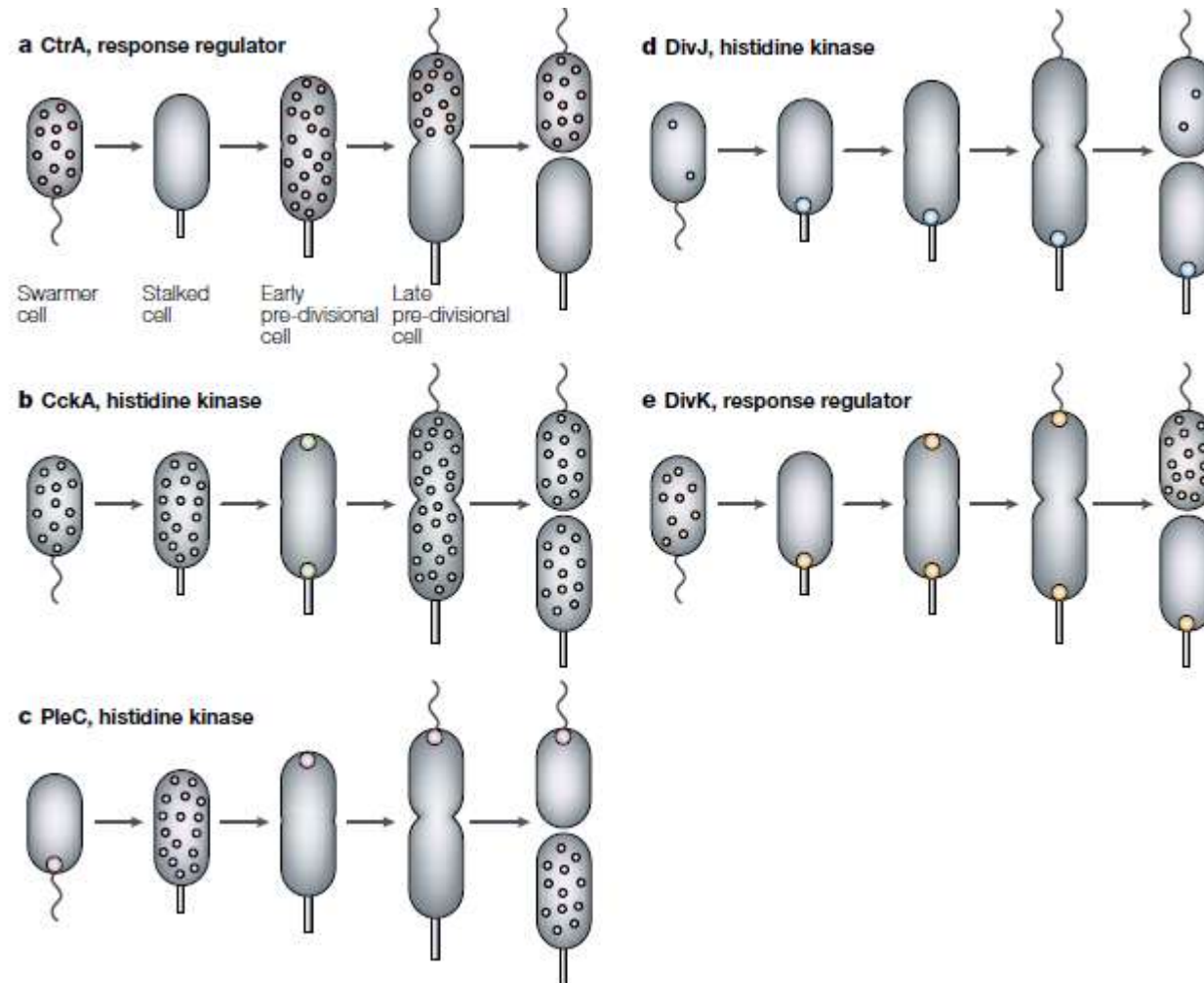
Au niveau de la localisation dynamique de protéines structurales et régulatrices.



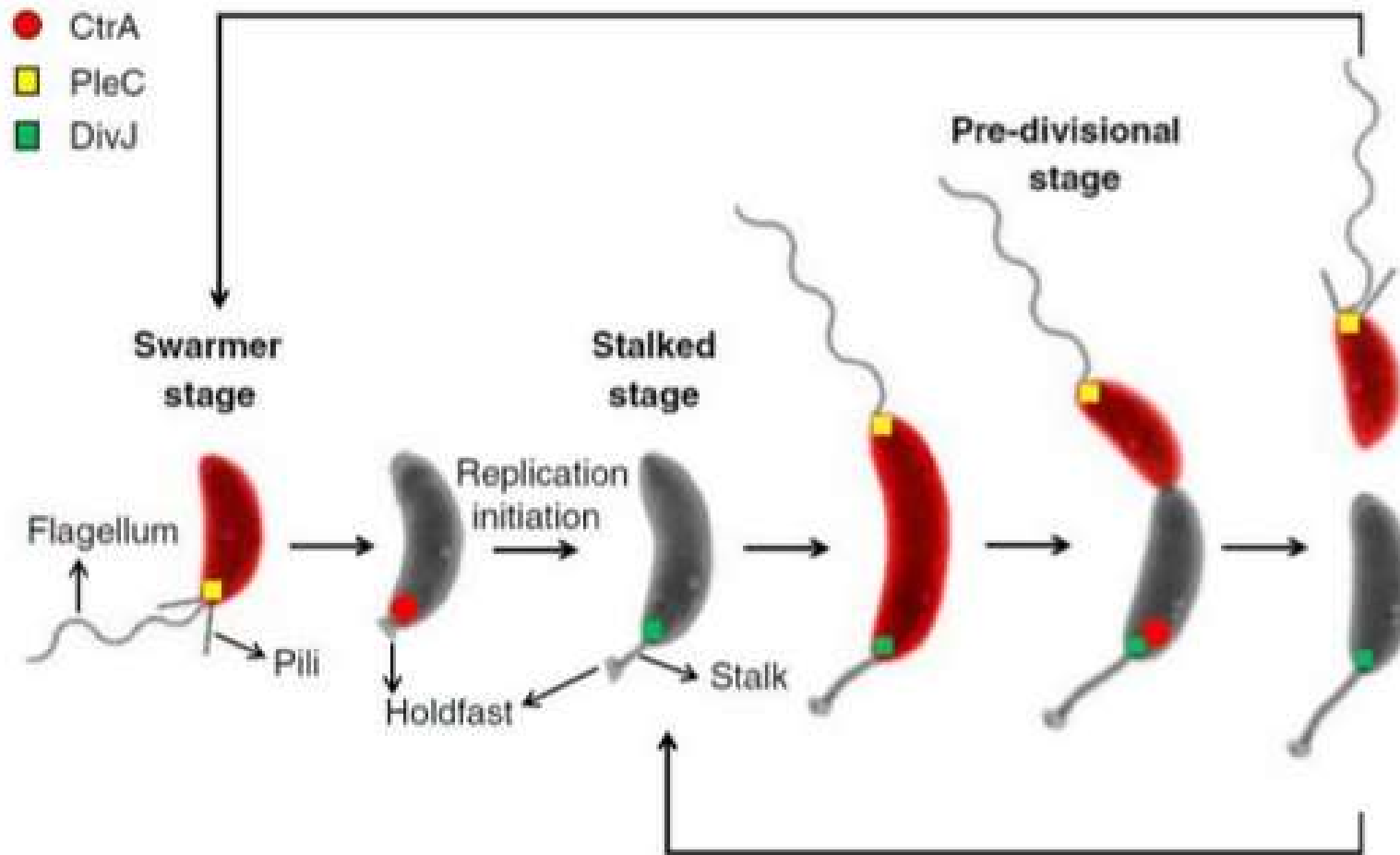




## Dynamique de la localisation des régulateurs durant la différenciation:



## Dynamique de la localisation des régulateurs durant la différenciation:



## Réplication et ségrégation du chromosome

Ori: 5 sites de fixation à CtrA-P

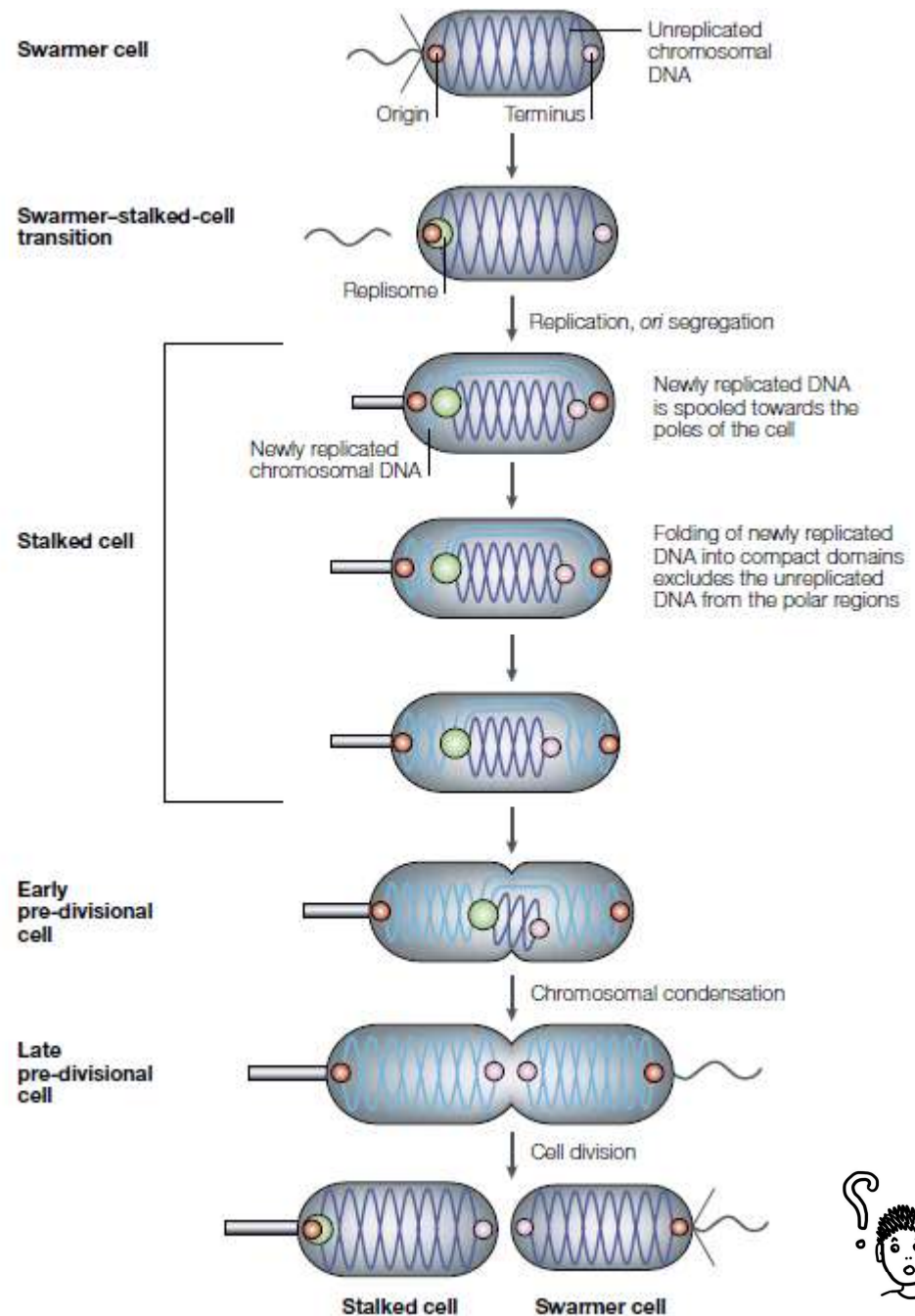
Site de fixation de DnaA

Promoteur Ps nécessaire à l'initiation

La dégradation de ScpA par Lon déclenche l'initiation.

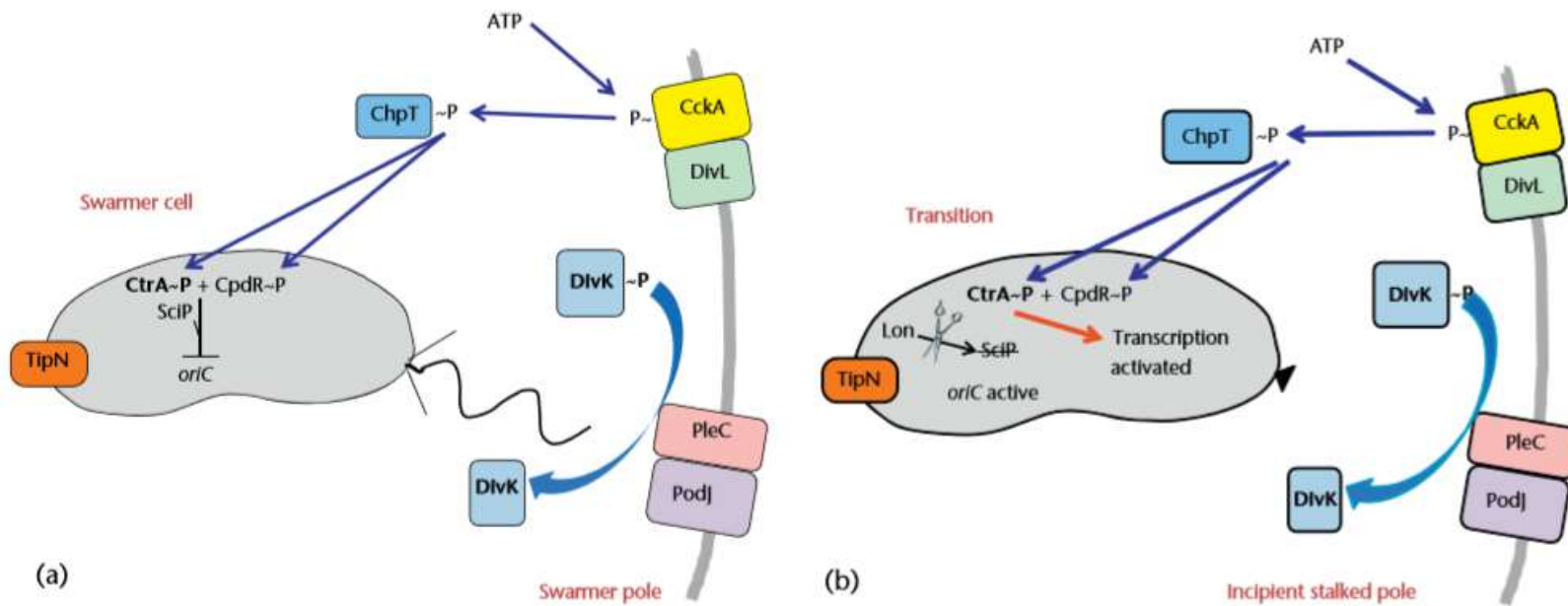
La nouvelle origine migre très rapidement (plus rapidement que l'élongation de la cellule). Processus actif inconnu (ParA/B?)

Les origines sont séquestrées aux pôles.



# VI-Un cycle cellulaire différencié chez *Caulobacter crescentus*: adaptation à un environnement oligotrophe.

## Transition cellule nageuse/cellule pédonculée



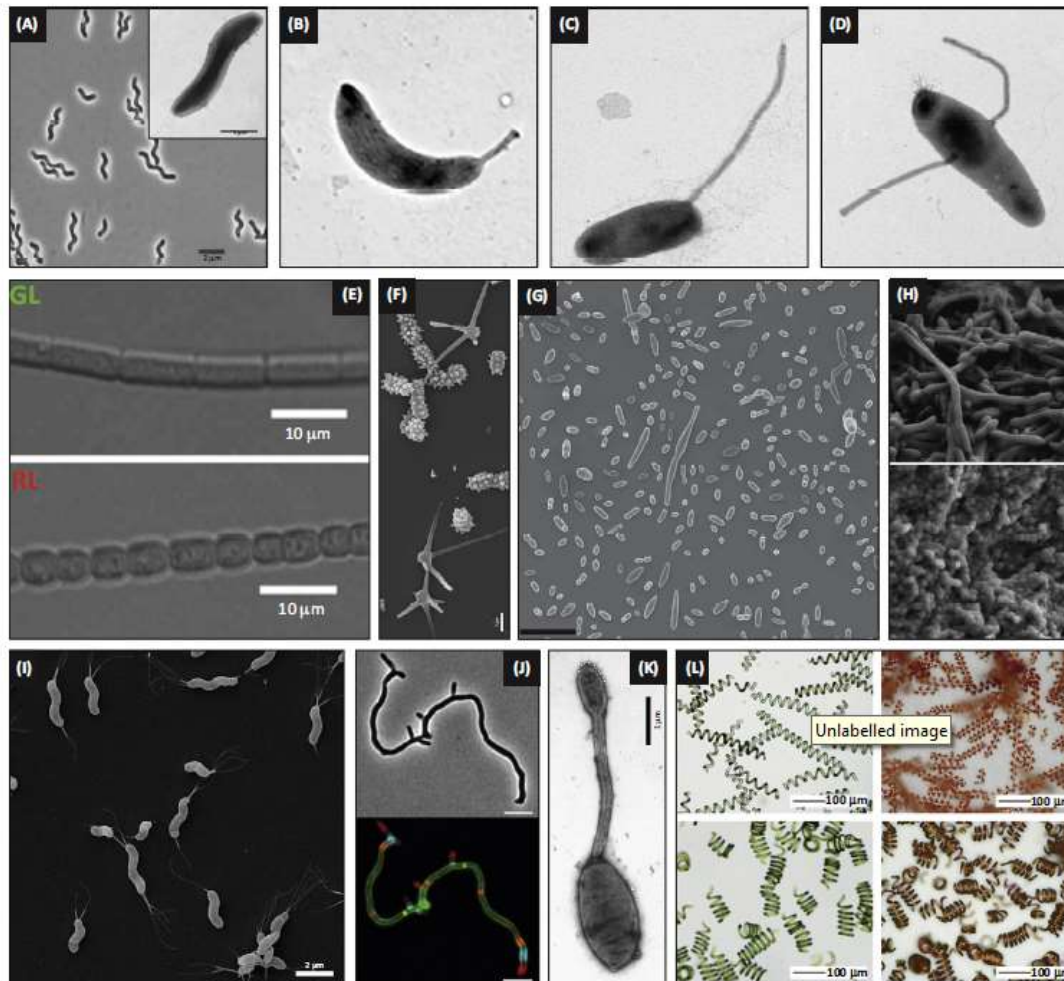




## VII-Conclusions-Questions

Des pratiques de cultures de laboratoire (LB) ont masqué la diversité des morphologies (et des différenciations)

Des exemples de plus en plus nombreux montrent des phénomènes de plasticité morphologiques (à l'échelle de la cellule) ou de pléomorphisme (à l'échelle d'une population)



De nombreux morphogènes sont encore à découvrir

Caccamo et al, 2017

