



HAL
open science

Role de protéines associées au cytosquelette bactérien

Anne-Stéphanie Rueff

► **To cite this version:**

Anne-Stéphanie Rueff. Role de protéines associées au cytosquelette bactérien. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112110 . tel-00633025

HAL Id: tel-00633025

<https://theses.hal.science/tel-00633025>

Submitted on 26 Oct 2011

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.



UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : *Gènes, Génomes, Cellules*

Unité MICALIS

DISCIPLINE : *Microbiologie*

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 12/07/2011

par

Anne-Stéphanie RUEFF

**Rôle de Protéines Associées au
Cytosquelette Bactérien**

Directeur de thèse : Rut Carballido-López Chargé de Recherche (INRA Jouy-en-Josas)

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Fabrice CONFALONIERI	Professeur (Université Paris-Sud 11)
<i>Rapporteurs :</i>	Anne GALINIER	Directeur de Recherche (CNRS, Marseille)
	Ivo GOMPERS BONECA	Directeur de Recherche (INSERM, Paris)
<i>Examineurs :</i>	Nathalie CAMPO	Chargé de Recherche (CNRS, Toulouse)
	Tam MIGNOT	Chargé de Recherche (CNRS, Marseille)

Mes plus profonds remerciements vont à Rut Carballido-López sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour. Rut, merci de m'avoir donnée la chance de travailler avec toi, merci encore pour ta patience et ta gentillesse.

Je tiens à remercier Nathalie Campo, Fabrice Confalonieri, Anne Galinier, Ivo Gomperts Boneca et Tam Mignot d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie aussi Nathalie Campo d'avoir été ma tutrice, pour avoir suivi ce travail et apporté un avis extérieur critique.

Je tiens à remercier Sérgio Filipe de m'avoir accueillie dans son équipe au Portugal. Merci aux membres de cette équipe de s'être si bien occupé de moi pendant trois semaines et de m'avoir fait découvrir, en plus du laboratoire, une partie de la belle région de Lisbonne.

J'adresse ma reconnaissance à Philippe Noirot ainsi qu'aux membres de son équipe. Merci de l'intérêt que vous avez manifesté pour mon sujet par vos questions, commentaires et discussions durant nos séminaires. Ils ont grandement enrichi mon travail.

Un grand Merci à Olivier Delumeau, Etienne Dervyn, Steven McGovern et François Lecointe pour leurs précieux conseils et aides qu'ils m'ont apporté. Merci à Magali Rault-Ventroux, Tatiana Rochas, Nathalie Pigeonneau, Anne Aucouturier et Valérie Bourgogne pour leurs sourires et discussions. Merci à Yoni Winogradsky, Calum Mackichan, Michal Ferens, Emilie Etienne, Eric Prestel, Quitterie Duputel, Camille Benoist, Célia Palcy et Sandrine Barru pour la bonne ambiance au laboratoire mais surtout pour tous ces déjeunés passés ensemble. Merci à Maria-Victoria Prejean pour ton aide dans la dernière ligne droite. Merci à Anaïs Saquet, j'ai été chanceuse de t'avoir comme stagiaire.

Un Merci aux super thésardes Lina Jakutyte, Julia Domínguez Escobar et Elodie Marchardier, je suis contente de vous avoir rencontré et d'avoir passé du temps avec vous toutes. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

Un grand Merci à Sean Kennedy pour les nombreuses petites attentions que tu m'as apporté aussi bien matérielles que morales.

Un Merci tout particulier à Arnaud Chastanet pour qui ca n'a pas été facile tous les jours. Mon collègue, ami, confident, qui a su m'écouter, me rassurer et me motiver.

Merci aux copains Parisiens non scientifiques, Ben et Camille qui m'ont permis de m'évader et de goûter à quelques bons cotés de la vie Parisienne, le plus souvent nocturnes.

Jan Willem, Merci pour ta bonne humeur quotidienne et pour ton soutien sans faille.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes deux grands frères, Vincent et Sébastien et mes parents. Maman, merci pour ton appui et tes encouragements. Papa, sans qui je me serais très certainement arrêté au DEUG, merci d'avoir cru en moi.

Sommaire

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	iii
Sommaire	1
Abréviations	9
Liste des tableaux	13
Liste des figures	17
Introduction générale	23
1/ Le cytosquelette bactérien : la fin d'un dogme.....	25
1.1/ Quelques généralités sur les microtubules.....	25
1.2/ Les homologues procaryotes de la tubuline.....	27
1.2.1/ FtsZ.....	27
1.2.2/ BtubA et BtubB.....	29
1.2.3/ TubZ.....	29
1.3/ Quelques généralités sur les filaments d'actine.....	30
1.4/ Les homologues procaryotes de l'actine.....	32
1.4.1/ MreB.....	33
1.4.2/ ParM.....	34
1.4.3/ MamK.....	35
1.4.4/ AlfA et protéines Alp.....	36
1.4.5/ FtsA.....	37
1.5/ Quelques généralités sur les filaments intermédiaires.....	37
1.5.1/ Un homologue procaryote des filaments intermédiaires.....	39
1.6/ La famille WACA.....	40
2/ <i>Bacillus subtilis</i> , top modèle.....	42
2.1/ Les homologues de l'actine de type MreB chez <i>Bacillus subtilis</i>	45

3/ La synthèse de la paroi bactérienne chez <i>B. subtilis</i>	48
3.1/ Généralités sur la paroi.....	48
3.2/ La voie de synthèse du <i>méso</i> -diaminopimélate.....	50
3.3/ La voie de synthèse du peptidoglycane.....	56
3.3.1/ La synthèse des précurseurs nucléotidiques.....	57
3.3.2/ La synthèse des précurseurs des intermédiaires lipidiques	57
3.3.3/ Polymérisation du peptidoglycane	60
3.4 / Renouvellement du PG.....	61
4/ Les réseaux d'interactions protéiques	61
4.1/ Généralités sur les réseaux protéiques	61
4.2/ Méthodes de détection d'interactions protéine-protéine	63
4.2.1/ Un exemple d'identification d'interactions protéine-protéine <i>in vitro</i> : la purification par affinité en tandem	63
4.2.2/ Un exemple d'approche génomique pour l'identification d'interactions protéine-protéine <i>in vivo</i> : le système double hybride dans la levure	65
5/ Les objectifs de cette thèse.....	67

Résultats

Partie I : Construction d'un réseau d'interactions protéine-protéine centré sur le cytosquelette d'actine chez *Bacillus subtilis*

I.1/ Introduction.....	71
I.2/ Résultats issus des criblages des banques génomiques de <i>B. subtilis</i>	72
I.2.1/ Les conditions expérimentales.....	73
I.2.2/ Les tests de spécificité	76
I.2.3/ Les criblages génomiques en chiffres	78
I.3/ Analyse globale du « réseau cytosquelette » de <i>B. subtilis</i>	79
I.3.1/ Transporteurs, █████, █████.....	83
I.3.2/ Système à deux composants, █████.....	85
I.3.3/ Régulation du saccharose, █████.....	87

I.3.4/ Protéines de fonctions inconnues, [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED]	88
I.3.5/ Métabolisme des lipides, [REDACTED]	93
I.3.6/ RNases, [REDACTED], [REDACTED]	94
I.3.7/ Synthèse du peptidoglycane, [REDACTED]	96
I.4/ Validation biologique d'interactions identifiées dans le « réseau cytosquelette »	99
I.4.1/ Quelles interactions caractériser ?	99
I.4.2/ Constructions et caractérisations de mutants	101
I.4.2.1/ Constructions des souches mutées	101
<i>a/ Construction d'allèles délétés par la méthode de Joining PCR</i>	103
<i>b/ Construction d'allèles interrompus par intégration du plasmide pMUTIN4</i>	104
I.4.2.2/ Caractérisations des souches mutées	107
<i>a/ Analyse de la croissance des souches mutantes</i>	107
<i>b/ Analyse de la sensibilité au lysozyme des souches mutantes</i>	112
<i>c/ Analyse du phénotype de la morphologie cellulaire</i>	115
I.4.3/ Construction et caractérisation de fusions GFP	117
I.5/ Conclusion	119
Partie II : Etude fonctionnelle de l'interaction protéine-protéine MreB-[REDACTED]	
II.1/ Validation biochimique de l'interaction MreB-[REDACTED] ([REDACTED])	125
II.1.1/ Détermination de la quantité relative de la protéine [REDACTED]-SPA en phase exponentielle de croissance	126
II.1.2/ Capture des complexes protéiques de [REDACTED]-SPA	127
II.1.2.1/ Purification par SPA-tag en une étape	131
II.2/ Etude de la protéine [REDACTED]	132
II.2.1/ Prédiction fonctionnelle et domaine de [REDACTED]	132
II.2.2/ Analyse du contexte génétique de [REDACTED]	135
II.3/ Etude du mutant de déplétion de [REDACTED]	138
II.3.1/ Construction du mutant de déplétion [REDACTED]	138
II.3.2/ Effets de la déplétion de [REDACTED] sur la viabilité, la croissance et la morphologie cellulaire	139
II. 3.3/ Analyse de la double mutation <i>mreB</i> ⁻ [REDACTED]	149

II. 3.4/ Analyse de la surexpression de [REDACTED]	150
II.4/ Localisation subcellulaire de [REDACTED]	152
II.4.1/ GFP-[REDACTED] une protéine de fusion fonctionnelle	153
II.4.2/ La localisation de GFP-[REDACTED]	155
II.5/ Effets de la déplétion de [REDACTED] sur la synthèse du PG	156
II.5.1/ Effets de la déplétion de [REDACTED] sur l'incorporation des précurseurs du PG.....	156
II.5.2/ Effets de la déplétion de [REDACTED] sur la composition du PG.....	161
II.5.3/ La dynamique de la composition en muopeptide lors la déplétion de [REDACTED]	163
II.5.4/ Effets de la déplétion de [REDACTED] sur les précurseurs cytoplasmiques du PG.....	165

Partie III : Etude d'enzymes de la voie de synthèse des précurseurs du PG

III.1/ Introduction	171
III.2/ Etudes <i>in vitro</i> de protéines de la machinerie de synthèse des précurseurs du PG ...	173
III.2.1/ Choix des protéines à étudier	173
III.2.2/ Purifications de protéines de la voie de synthèse du PG	174
III.2.3/ Polymérisations des protéines Dap testées	175
III.2.4/ Etude d'interactions protéiques par chromatographie de tamisage moléculaire	178
III.2.5/ Purification de la protéine MreB	178
III.2.6/ Capture de MreB par des protéines de la synthèse des précurseurs du PG	180
III.3/ Etude d'un réseau protéique centré sur [REDACTED]	183
III.3.1/ Capture et analyse de complexes protéique par SPA-Tag.....	183
III.3.2/ Partenaires protéiques de [REDACTED] identifiés par double hybride chez la levure ..	185
III.4/ Localisation subcellulaire des protéines de la voie de synthèse du DAP.....	186

Discussion générale..... 191

1/ Le réseau Y2H centré sur les protéines MreB, Mbl et MreBH de <i>B. subtilis</i>	195
2/ Lien entre MreB et d'autres protéines de la voie de synthèse du PG	199
2.1/ L'interaction spécifique MreB-[REDACTED]	201
2.2/ MreB en liens avec des protéines de la voie de synthèse du PG	205
2.3/ Lien entre des protéines de la voie de synthèse du PG et la machinerie de division	207

2.4/ Conclusion	208
Matériels et méthodes	211
Les souches bactériennes, les plasmides et les oligonucléotides.....	213
Croissance des souches de <i>B. subtilis</i> ASR032, ASR053 et 3725 en liquide (manuelle) ..	213
Croissance des souches de <i>B. subtilis</i> ASR032, ASR053 et 3725 avec le Bioscreen	213
La microscopie optique (<i>Bright Field</i>) et épifluorescente.....	213
La microscopie électronique à balayage et à transmission	213
Marquage des précurseurs du PG par la Van/Van-FL	213
Capture des complexes protéiques de █████-SPA	213
Purification par affinité des protéines █████, █████, █████, █████, █████ et █████	213
Purification par affinité de MreB.....	216
Analyse par Western blot.....	216
Chromatographie de tamisage moléculaire.....	217
Extraction du PG de <i>B. subtilis</i>	217
Extraction des précurseurs cytoplasmiques du PG de <i>B. subtilis</i>	218
Transformation de la levure	219
Double hybride chez la levure	219
Croisement de levure en matrice	221
Références bibliographiques	237
Annexes	257
1/ Solutions et tampons.....	259
2/ Milieux de cultures	260
3/ Fabrication des poudres DO pour les levures	261
4/ Résultats LC-MSMS de la capture du complexe █████-SPA (DO _{600nm} 2.0).....	262
5/ Résultats LC-MSMS de la capture du complexe █████-SPA (DO _{600nm} 0.7).....	267
6/ Article en cours de rédaction	275

Abréviations

°C : degrés Celsius

μM : micro molaire

μm : micro mètre

aa : acides aminés

ABP : *actin binding protein* (protéine associée à l'actine)

AD : *activating domain* (domaine d'activation)

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

BD : *binding domain* (domaine de liaison)

BSL : *Bacillus subtilis genomic library* (banque génomique de *Bacillus subtilis*)

Cm : chloramphenicol

CoH : *cluster de hub*

DAP : diaminopimélate

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

ECF : *extracytoplasmic function*

Erm : érythromycine

et al. : *et alii* (et autres)

Ex. : exemple

FI : filaments intermédiaires

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GlcNAc : N-acétylglucosamine

IPTG : isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

l : litre

LB : milieu riche Luria Bertani

Lc-MSMS : *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

Leu : leucine

M : molaire

mAU : *milli-absorbance unit*

m-DAP : *méso*-diaminopimélate

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique à transmission

Mg²⁺ : magnésium

MgSO₄ : sulfate de magnésium

min : minute

ml : millilitre

mM : milli molaire

MT : microtubules

MurNAc : N-acétylmuramique

Neo : néomycine

ORF : *open reading frame* (phase ouverte de lecture)

PAI : *proteins abundance index* (index d'abondance protéique)

Pb : pair de bases

PBP : *penicillin binding protein* (protéine associée à la pénicilline)

PCR : *polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)

PG : peptidoglycane

SDS : sodium dodécyl sulfate

sec : seconde

Spc : spectinomycine

TAT : *twin-arginine translocation*

Tet : tétracycline

Ura : uracile

UV : Ultra-violet

Y2H : *yeast two hybrid* (double hybride chez la levure)

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des quatre voies de synthèse de la lysine chez les bactéries	54
Tableau 2. Distribution biologique et non exhaustive des voies de synthèse du diaminopimélate .	55
Tableau 3. Récapitulatif des plasmides codant pour les protéines « appâts » utilisées pour le double hybride	73
Tableau 4. Récapitulatif des protéines obtenues lors du crible double hybride chez la levure à partir des homologues MreB, Mbl et MreBH	98
Tableau 5. Récapitulatif des résultats de l'étude exploratrice des protéines obtenues par criblage double hybride chez la levure	122
Tableau 6. MreB apparaît dans le complexe protéique de █████-SPA extrait du gel de polyacrylamide et analysé par LC-MSMS	129
Tableau 7. MreB apparaît à nouveau dans le complexe protéique de █████-SPA analysé par LC-MSMS	130
Tableau 8. Analyse des résultats de chromatographie d'exclusion moléculaire de █████, █████ et █████ étiquetée	176
Tableau 9. Résumé des résultats de l'analyse LC-MSMS de complexes █████-SPA.....	184
Tableau 10. Récapitulatif des fusions GFP des protéines de la voie de synthèse du PG observées et des résultats préliminaires obtenus	187
Tableau 11. Les souches utilisées	222
Tableau 12. Les plasmides utilisés	228
Tableau 13. Les oligonucléotides utilisés	229
Tableau 14. Suppléments pour les milieux	236

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1. La structure d'un microtubule et de sa sous-unité	27
Figure 2. Les structures d'un monomère d'actine et d'un filament d'actine	31
Figure 3. Comparaison de la structure tri-dimensionnelle de l'actine, de MreB et de ParM.....	33
Figure 4. Un modèle de construction d'un filament intermédiaire	39
Figure 5. Extrait de la méthode d'isolation de la souche 168 de <i>B. subtilis</i> (Spizizen, 1958)	45
Figure 6. Unité de base du PG de <i>B. subtilis</i>	49
Figure 7. Voie de synthèse du <i>méso</i> -diaminopimélate chez <i>B. subtilis</i>	51
Figure 8. Régulation des aspartokinases chez <i>B. subtilis</i>	52
Figure 9. Voie de biosynthèse du peptidoglycane.....	59
Figure 10. Polymérisation de peptidoglycane par action des PBPs	60
Figure 11. Activation de la transcription des gènes rapporteurs par reconstitution de l'activité de la GAL4 dans le système double hybride.....	66
Figure 12. Stratégie de construction du réseau d'interaction protéine-protéine centré sur les trois homologues de l'actine de <i>B. subtilis</i>	75
Figure 13. Représentation du système double hybride chez la levure	75
Figure 14. Principe du test de spécificité du système double hybride chez la levure	77
Figure 15. Réseau d'interactions Y2H centré sur les trois protéines MreB de <i>B. subtilis</i>	80
Figure 16. Réseau global d'interactions Y2H de <i>B. subtilis</i>	81
Figure 17. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED] et indication de ses domaines d'interaction	84
Figure 18. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED]	85
Figure 19. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED]	86
Figure 20. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	87
Figure 21. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	88
Figure 22. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	89
Figure 23. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED]	90
Figure 24. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED]	91
Figure 25. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	92
Figure 26. Prédictions topologiques de la protéine [REDACTED]	92
Figure 27. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	94
Figure 28. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED]	95

Figure 29. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED] 96

Figure 30. Domaines structuraux de la protéine [REDACTED] 97

Figure 31. Catégories fonctionnelles interagissant avec MreB, Mbl et MreBH de *B. subtilis*..... 99

Figure 32. Récapitulatif de l’environnement des gènes d’intérêt identifiés dans le réseau Y2H.... 102

Figure 33. Principe de la méthode de *Joining PCR*..... 104

Figure 34. Interruption d’un gène d’intérêt par intégration du pMUTIN4..... 105

Figure 35. Construction d’une souche de déplétion du gène [REDACTED] par intégration du pMUTIN4
..... 105

Figure 36. Courbes de croissance des huit mutants [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] et [REDACTED] et
de la souche sauvage en milieu LB à 37°C en fonction de la concentration de magnésium ajoutée
..... 106

Figure 37. Courbes de croissance des mutants de délétion [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] et [REDACTED] et de la souche
sauvage en milieu MSM à 37°C en fonction de la concentration de magnésium 109

Figure 38. Courbes de croissance des mutants Ω [REDACTED], Ω [REDACTED], Ω [REDACTED] et P_{spac}-[REDACTED] et de la souche
sauvage 168 en milieu MSM avec 0.5 mM d’IPTG en fonction de la concentration de magnésium
..... 111

Figure 39. Courbes de croissance de P_{spac} [REDACTED] et de la souche sauvage en milieu MSM en fonction
de la concentration de magnésium finale..... 112

Figure 40. Sensibilité au lysozyme des mutants *mreB::neo*, *mbl::spc* et de la souche sauvage, 168
..... 113

Figure 41. Sensibilité au lysozyme des mutants Ω [REDACTED], P_{spac} [REDACTED] et de la souche sauvage, 168... 114

Figure 42. Observations microscopiques des huit mutants et de la souche sauvage, 168..... 116

Figure 43. Observations microscopiques de fusions GFP à [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] 118

Figure 44. Observations microscopiques de fusions GFP à [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] et [REDACTED]..... 120

Figure 45. Interaction Y2H entre MreB et [REDACTED] *in vivo*..... 125

Figure 46. Expression constitutive de [REDACTED]-SPA au cours de la croissance 127

Figure 47. Gel SDS-PAGE des complexes protéiques de [REDACTED]-SPA 128

Figure 48. Interaction entre MreB et [REDACTED] par purification du complexe de [REDACTED]-SPA 132

Figure 49. Voie de synthèse du peptidoglycane de *B. subtilis* 133

Figure 50. Domaine prédit et auto-interaction de [REDACTED]..... 134

Figure 51. Profil d’élution de [REDACTED] par chromatographie d’exclusion moléculaire..... 135

Figure 52. Profil d’expression de *mreB*, [REDACTED], [REDACTED] et [REDACTED] de *B. subtilis* par *Tiling array* 137

Figure 53. [REDACTED] est essentiel pour la croissance et le maintien de la forme cellulaire chez *B. subtilis*
..... 140

Figure 54. La croissance du mutant de déplétion P _{spac} -█████ pMAP65 (ASR032) est dépendante de la concentration d'IPTG dans le milieu et affecté par le MgSO ₄	143
Figure 55. Microscopie électronique à balayage du mutant de déplétion P _{spac} -█████ pMAP65 (ASR032).....	144
Figure 56. Microscopie électronique à transmission du mutant de déplétion P _{spac} -█████ pMAP65 (ASR032).....	145
Figure 57. Diminution significative de l'épaisseur du PG lors de la déplétion de █████.....	146
Figure 58. Phénotype associé à la délétion du gène █████.....	147
Figure 59. Croissance de la souche P _{spac} -█████ pMAP65 (ASR032) en fonction de la concentration de lysine et de <i>méso</i> -diaminopimélate.....	148
Figure 60. Phénotype du double mutant <i>mreB</i> █████.....	149
Figure 61. Phénotype de la surexpression de █████.....	152
Figure 62. Fonctionnalité de la fusion GFP-█████.....	153
Figure 63. Détection des protéines de fusion GFP-█████ et █████-GFP.....	155
Figure 64. Localisation subcellulaire de GFP-█████.....	156
Figure 65. Site de fixation de la vancomycine sur le précurseur externalisé du PG.....	157
Figure 66. Marquage des cellules de <i>B. subtilis</i> avec de la vancomycine fluorescente (Van-FL)...	158
Figure 67. Profils d'élution HPLC des muuropeptides du PG extrait de la souche de référence et des mutants █████ et <i>mreB</i>	160
Figure 68. Dynamique de la composition des muuropeptides du PG lors de la déplétion de █████.....	164
Figure 69. Analyse des précurseurs cytoplasmiques de la paroi cellulaire de la souche de référence et des mutants █████ et <i>mreB</i>	166
Figure 70. Purification par affinité de six protéines de la voie de synthèse des précurseurs cytoplasmiques du PG.....	175
Figure 71. Profils d'élution de █████, █████, █████ et █████ obtenus par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	177
Figure 72. Droite d'étalonnage réalisée à partir des volumes d'élution obtenus par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	178
Figure 73. Profil d'élution du mélange protéique [█████ + █████ + █████] obtenu par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	178
Figure 74. Purification de MreB.....	179
Figure 75. Profil d'élution de MreB obtenu par chromatographie d'exclusion moléculaire et dépôt sur gel natif de MreB et █████ étiquetées.....	180
Figure 76. Fractions éluées lors de la capture par affinité de protéines de la synthèse du PG.....	181

Figure 77. MreB est présent dans les complexes protéiques retenus par [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] et [REDACTED] 182

Figure 78. Voie de synthèse du DAP et de la lysine, thréonine, méthionine et glycine..... 185

Figure 79. Interactions Y2H entre [REDACTED] et [REDACTED] *in vivo* 186

Figure 80. Localisation subcellulaire de protéines de la voie de synthèse du DAP 189

Figure 81. Interconnexions identifiées dans cette étude entre protéines de la voie de synthèse des précurseurs du PG et les homologues d'actine chez *B. subtilis*..... 206

Figure 82. Modèle représentant les complexes macromoléculaires impliqués dans la synthèse de la paroi latérale durant l'élongation chez *B. subtilis* 209

Introduction générale

1/ Le cytosquelette bactérien : la fin d'un dogme

Chez les cellules eucaryotes, le cytosquelette est un organisateur central de nombreux processus cellulaires tels que, la morphogenèse, la division, la ségrégation, la polarité ou le trafic intracellulaire (Howard and Hyman, 2003; Inoue and Salmon, 1995; Pollard and Borisy, 2003; Scholey et al., 2003). Il forme un réseau dynamique et complexe de filaments protéiques constitué de trois catégories de polymères de protéines : les microfilaments d'actine, les microtubules de tubuline et les filaments intermédiaires. Pendant longtemps, un des dogmes de la biologie cellulaire était la présence du cytosquelette uniquement chez les cellules eucaryotes. Néanmoins depuis une vingtaine d'années ce dogme s'est vu renversé par l'identification chez les cellules procaryotes de protéines homologues aux protéines du cytosquelette eucaryote (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2010; Carballido-López, 2006; Errington, 2003; Michie and Lowe, 2006). De plus, une quatrième catégorie de protéines cytosquelettales dénommées WACA a été identifiée, dont aucun homologue eucaryote n'a été trouvé.

1.1/ Quelques généralités sur les microtubules

La tubuline est un composant majeur du cytosquelette eucaryote et forme des microtubules (MT) (**Figure 1 A**). Les MT eucaryotes déterminent la position des organites et dirigent les transports intracellulaires (Howard and Hyman, 2003; Rock, 2010). Ils ont un rôle central dans la ségrégation des chromosomes par la formation du fuseau mitotique permettant le positionnement des chromosomes et la séparation des deux chromatides durant la division

cellulaire (Howard and Hyman, 2003; Scholey et al., 2003). Des dimères d' α - et de β -tubuline s'attachent les uns aux autres, par des liaisons non covalentes, pour former un hétérodimère appelé protofilament (**Figure 1 B**). C'est l'assemblage latéral de treize protofilaments, sous la forme d'un cylindre creux, qui constituent un MT (**Figure 1 C-E**) (Scholey et al., 2003). Les MT sont des éléments instables car très dynamiques. Ils polymérisent et dépolymérisent en permanence grâce à l'activité GTPase de la tubuline (Carlier and Pantaloni, 1981; Pantaloni et al., 1981). Les deux extrémités d'un protofilament polymérisent à une vitesse différente (**Figure 1 B-C**). Une des extrémités dites « plus » polymérise rapidement et forme la base du MT. A l'opposé, les extrémités dites « moins », dépolymérisent plus rapidement (Howard and Hyman, 2003). La différence de vitesse de croissance aux deux extrémités est due à des modifications conformationnelles de chaque monomère lorsqu'il entre dans le polymère. Il existe une instabilité dynamique des filaments ainsi qu'un comportement de *treadmilling* qui sont associés à l'hydrolyse des nucléosides triphosphates. Des protéines associées aux filaments de MT formé après nucléation ont été identifiées et sont collectivement appelées protéines associées aux microtubules ou MAP (*microtubule-associated protein*) (Gouveia and Akhmanova, 2010). Les MAPs ont des rôles multiples dans la stabilisation des MT, le blocage du désassemblage ou encore comme intermédiaire d'interaction entre le MT et d'autres protéines.

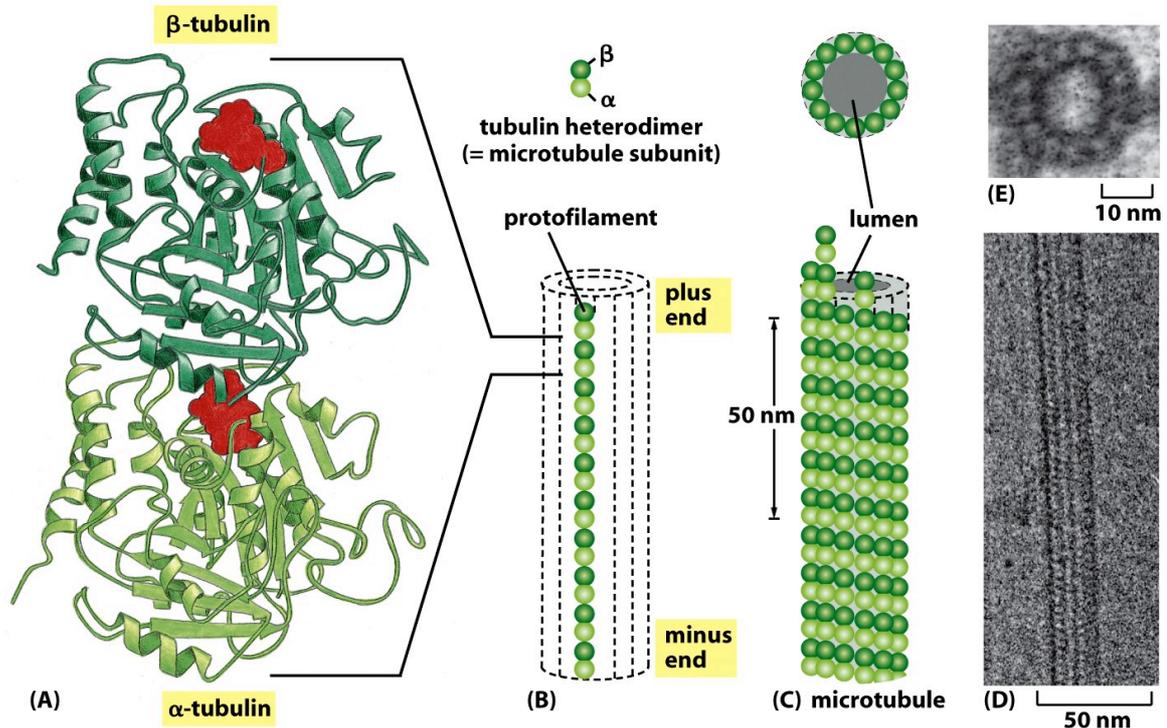


Figure 1. La structure d'un microtubule et de sa sous-unité :

Figure extraite de *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008, Figure 16-11). (A) La sous-unité de chaque protofilament est un hétérodimère de tubuline formé à partir d'un doublet de monomère d' α - et de β -tubuline. La molécule de GTP dans le monomère d' α -tubuline est tellement fortement liée qu'elle peut être considérée comme une partie intégrante de la protéine. La molécule de GTP dans le monomère de β -tubuline est quant à elle moins fortement liée et a un rôle important dans la dynamique du filament. Les deux nucléotides sont représentés en rouge. (B) Une sous-unité de tubuline (α - β hétérodimère) et un protofilament sont représentés schématiquement. Chaque protofilament consiste en plusieurs sous-unités adjacentes avec la même orientation. (C) Le microtubule est un tube creux formé d'un alignement parallèle de 13 protofilaments. (D) Observation au microscope électronique d'un court segment de microtubule. (E) Observation d'une section transversale d'un microtubule montrant l'anneau formé de 13 protofilaments distincts.

1.2/ Les homologues procaryotes de la tubuline

1.2.1/ FtsZ

C'est dans les années 90 que la protéine FtsZ (pour *filamentous temperature sensitive*) a été mise en évidence comme homologue procaryote de la tubuline (Erickson, 1995; Lowe and

Amos, 1998). FtsZ est une protéine universelle retrouvée dans le cytosol de pratiquement toutes les bactéries, ainsi que chez les chloroplastes eucaryotes ou encore chez les mitochondries d'eucaryotes primitifs (Osteryoung and McAndrew, 2001; Osteryoung and Nunnari, 2003). FtsZ possède une activité GTPase qui lui permet de polymériser pour former un anneau (appelé *Z ring*) au niveau du futur site de division cellulaire, lequel est essentiel pour le recrutement des protéines responsables de la formation du septum de division (Bi and Lutkenhaus, 1991; de Boer et al., 1992a; Rothfield et al., 1999). La séquence primaire d'acides aminés de FtsZ présente une faible identité de séquence (10-18%) avec la séquence des tubulines eucaryotes pouvant s'expliquer par une divergence très ancienne d'un ancêtre commun (Lowe and Amos, 1998). En revanche, sa structure tridimensionnelle et ses propriétés de polymérisation sont remarquablement similaires à celles des tubulines (Lowe and Amos, 1998). Contrairement aux tubulines, un seul isoforme de FtsZ existe chez les procaryotes et ne semble pas former de structure cylindrique (Margolin and Long, 1994; Michie and Lowe, 2006). Par analogie aux MAP eucaryotes, des partenaires de FtsZ ont été identifiés, tels que ZipA et ZapA, qui promouvoient *in vitro* la polymérisation de FtsZ (Adams and Errington, 2009). D'autres partenaires sont impliqués dans une régulation négative de l'assemblage des protofilaments, comme Ezra, SulA, MciZ, MinC et MipZ (Adams and Errington, 2009; Thanbichler and Shapiro, 2006). Contrairement aux MT constitués uniquement de tubuline, l'histoire des homologues bactériens ne s'arrête pas avec FtsZ. Récemment, de nouveaux homologues bactériens de la tubuline, les protéines BtubA/B et TubZ, ont été identifiés (Jenkins et al., 2002; Larsen et al., 2007).

1.2.2/ BtubA et BtubB

Les protéines BtubA/B ont été découvertes chez les bactéries du genre *Prostheco bacter* (Jenkins et al., 2002), leur(s) fonction(s) n'est pas encore connue et elles ne sont pas retrouvées dans toutes les espèces bactériennes (Jenkins et al., 2002). Il existe une plus forte similarité de ces protéines avec la tubuline eucaryote ($\approx 35\%$) qu'avec la protéine FtsZ ($\approx 10\%$). En effet, la structure tridimensionnelle de BtubA/B est extrêmement proche de celle de la tubuline et suggère une origine par transfert horizontal (Schlieper et al., 2005). La cristallisation des protéines BtubA/B a également mis en évidence la formation d'un hétérodimère qui ressemble à celui de la tubuline (Schlieper et al., 2005). BtubA et BtubB ont été exprimées chez *E. coli* puis leurs étude *in vitro* a mis en évidence la formation de longues structures allongées qui parcourent la cellule de pôle à pôle (Sontag et al., 2005).

1.2.3/ TubZ

Une autre protéine de type tubuline, appelée TubZ a été caractérisée en 2007 chez *B. thuringiensis* (Larsen et al., 2007). L'analyse de la séquence de la protéine TubZ a mis en évidence une faible similarité avec la séquence de la tubuline et de FtsZ ($\approx 15\%$) néanmoins une conservation de certains résidus d'une part avec la tubuline et d'autre part avec FtsZ existe, c'est pourquoi cette protéine à été appelée TubZ (Larsen et al., 2007). La protéine TubZ est codée par des plasmides bactériens présents chez de nombreuses espèces de *Bacillus* (Larsen et al., 2007). Elle possède également une activité GTPase pour la formation de filaments le plus souvent disposés en paire ou en regroupement (Anand et al., 2008; Chen and Erickson, 2008). La polymérisation des filaments TubZ induit la séparation

des plasmides nouvellement synthétisés permettant leur distribution dans chacune des cellules après la division cellulaire (Larsen et al., 2007). Les filaments de TubZ forment une superstructure en double hélice inhabituelle par rapport aux structures des filaments des protéines FtsZ et tubulines (Aylett et al., 2010). En revanche, une structure en double hélice existe chez l'actine eucaryote et chez son homologue bactérien ParM, impliqué dans la partition des plasmides (van den Ent et al., 2002) (voir ci-dessous). Récemment, il a été proposé que ce groupe TubZ ait un rôle, non seulement dans la ségrégation des plasmides mais également dans leur réplication. En effet, une de ces protéines, TubZ-Ba (également appelée RepX), est nécessaire pour la réplication du plasmide de virulence pXO1 de *Bacillus anthracis* (Tinsley and Khan, 2006).

1.3/ Quelques généralités sur les filaments d'actine

L'actine est le principal composant du cytosquelette eucaryote. C'est une protéine globulaire très abondante et importante pour le maintien de l'architecture, la division, la locomotion de la cellule et les transports intracellulaires (Pollard, 2003). La cristallisation du monomère d'actine (**Figures 2 A et 3**) a mis en évidence deux domaines principaux (I et II) qui peuvent être divisés en deux grands sous-domaines (IA et IIA) et deux petits sous-domaines (IB et IIB) (Holmes et al., 1990; van den Ent et al., 2001a). Une poche de fixation à l'ATP est positionnée entre les sous-domaines IA et IIA (**Figure 2 A**). L'actine existe sous deux formes au sein des cellules, une forme monomérique soluble, appelée actine G (*Globular actin*) et une forme filamenteuse appelée actine F (*Filamentous actin*). La polymérisation de l'actine G en actine F est promue par une activité ATPase (**Figure 2 B**) (Korn et al., 1987). A l'instar des MT, le mode d'assemblage induit une polarité au filament

avec deux extrémités différent par la vitesse de polymérisation : une des extrémités « plus » à croissance rapide et une extrémité « moins » où la polymérisation de l'actine est plus lente. Les filaments d'actine (appelés aussi microfilaments) sont des polymères hélicoïdaux à deux brins d'actine (Holmes et al., 1990). Une orientation régulière et parallèle des microfilaments induit une polarité structurelle.

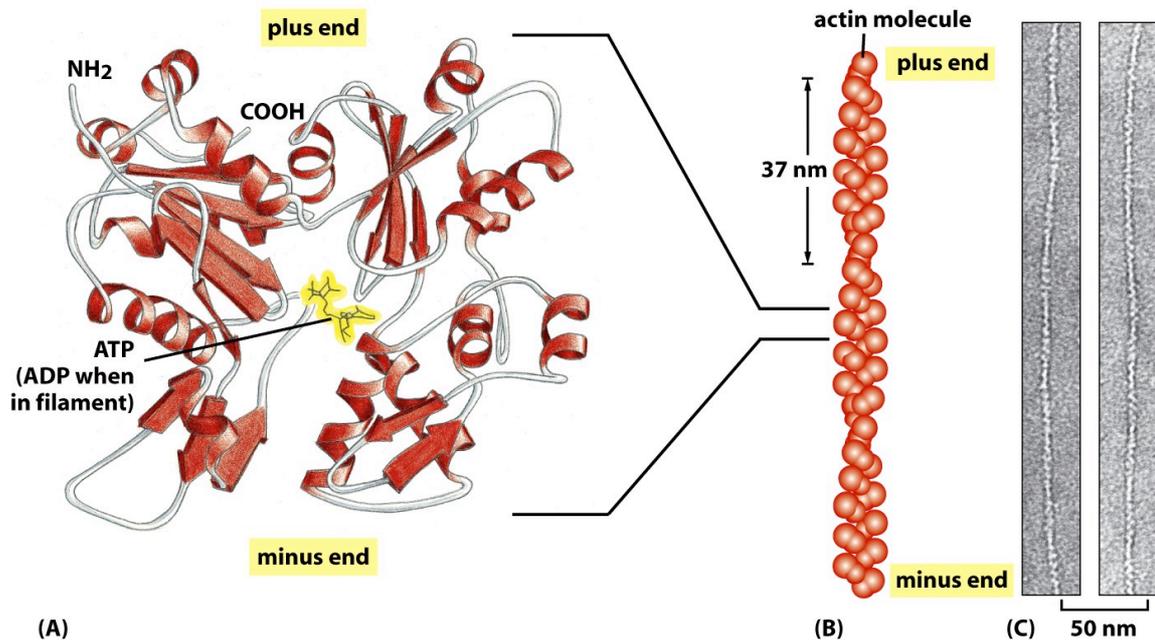


Figure 2. Les structures d'un monomère d'actine et d'un filament d'actine :

Figure extraite de *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008, Figure 16-12). (A) Le monomère d'actine a un nucléotide (soit de l'ATP, soit de l'ADP) lié dans une profonde poche située au centre de la molécule. (B) Représentation schématique de l'arrangement des monomères dans le filament. Bien que le filament soit souvent décrit comme une simple hélice de monomères, il est également envisageable que se soit deux protofilaments maintenu ensemble par des contacts latéraux et qui s'enroulent le uns autour des autres comme deux brins parallèles d'une hélice. Toutes les sous-unités formant le filament sont dans la même orientation. (C) Image de microscopie électronique de filaments d'actines.

La polymérisation de l'actine est hautement régulée par la fixation et l'hydrolyse des nucléotides mais également par de nombreuses autres protéines dites protéines accessoires ou ABP (*actin binding protein*) (Cooper and Schafer, 2000; dos Remedios et al., 2003;

Smith and Maguire, 1998; Winder and Ayscough, 2005). A l'heure actuelle plus d'une centaine d'ABP ont été identifiées chez les eucaryotes dont certaines sont essentielles et ont plusieurs activités, telles que la fixation des monomères d'actine G pour la nucléation des filaments (ex. Arp2/3 et WASP), la séquestration, la libération ou les échanges des monomères (ex. thymosine, twinfiline et profilin) et la liaison avec les filaments intermédiaires (ex. spectine), les MT (ex. tau) et même la liaison avec les deux (ex. plectin et MAP2).

1.4/ Les homologues procaryotes de l'actine

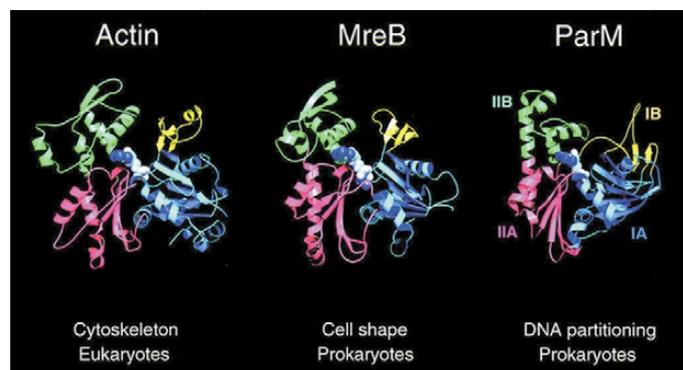
La première référence de la présence d'homologues d'actine chez les bactéries date de 1992, lors d'un travail d'analyse de séquences protéiques issu de la comparaison de structures tridimensionnelles de trois ATPases (actine, Hsp70 et hexokinase) aux fins d'identifier un motif ATPasique commun (Bork et al., 1992). Basé sur la recherche de ce motif, des protéines procaryotes ont été identifiées, dont MreB (avec environ 15% d'identité) et ParM (StbA) (avec environ 11% d'identité) (Bork et al., 1992). La découverte des structures cytosquelettales que forme la protéine MreB (Jones et al., 2001), a déclenché l'engouement pour l'étude du cytosquelette bactérien des homologues de l'actine, que l'on connaît encore aujourd'hui. D'autres analyses de séquences de génomes bactériens ont récemment mis en évidence de nouveaux homologues de l'actine, tels que MamK (Komeili et al., 2006), Alfa (Becker et al., 2006) et bien d'autres candidats de la famille Alp (Derman et al., 2009).

1.4.1/ MreB

Les premiers homologues fonctionnels et structuraux de l'actine ont été identifiés chez les procaryotes quelques années après l'identification des homologues bactériens de la tubuline. En effet, en 2001 Jones *et al.*, ont montré l'implication des protéines MreB-like (MreB et Mbl) dans la morphogénèse ainsi que leur assemblage *in vivo* en structures filamenteuses hélicoïdales le long de la cellule chez *Bacillus subtilis* (Jones et al., 2001). Des approches biochimiques et la cristallisation de la protéine MreB1 de *Thermotoga maritima* ont par la suite mis en évidence les propriétés de polymérisation de cette protéine similaires à celle de l'actine, aussi bien en présence d'ATP que de GTP, ainsi qu'une forte similitude entre la structure tridimensionnelle de MreB et celle de l'actine (van den Ent et al., 2001b) (**Figure 3**). Plus tard, c'est MreB de *B. subtilis* qui a été caractérisée (Bean and Amann, 2008) (56% d'identité avec MreB1 de *T. maritima*) et a mis en évidence des différences dans les propriétés de polymérisation, comme une inhibition plus forte de l'assemblage pour MreB à des températures inférieures à 15°C ou en présence de faible concentration en cations monovalents (Mayer and Amann, 2009).

Figure 3. Comparaison de la structure tridimensionnelle de l'actine, de MreB et de ParM :

Figure extraite de (Carballido-López and Errington, 2003). Une similitude de structure avec peu de divergence apparaît lors de la superposition des trois structures.



Des études de localisations subcellulaires ont été menées par microscopie à immunofluorescence ou par la fusion d'une protéine fluorescente (GFP) chez *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus* ont mis en évidence un assemblage des protéines MreBs en une structure filamenteuse hélicoïdale le long de la cellule (Carballido-López et al., 2006; Figue et al., 2004; Gitai et al., 2004). D'autres expériences de localisation sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Rhodobacter* ont également été caractérisées et ont révélées des distributions des MreBs aussi bien hélicoïdales que médianes (Cowles and Gitai, 2010; Slovak et al., 2005; Vats et al., 2009).

Des homologues de MreB sont retrouvés chez la plupart des espèces bactériennes avec une forme complexe, c'est-à-dire chez les bactéries non sphériques (Daniel and Errington, 2003; Jones et al., 2001). La plupart des bactéries à Gram négatif n'ont qu'un seul gène *mreB*, habituellement en opéron avec les gènes *mreC* et *mreD*. Quant aux organismes à Gram positif, ils ont le plus souvent de multiples homologues de *mreB*, dont un se retrouve en opéron avec *mreCD*. Le cytosquelette MreB est impliqué dans des processus cellulaires majeurs incluant la morphogénèse cellulaire, la ségrégation des chromosomes et la polarité cellulaire (Carballido-López, 2006).

1.4.2/ ParM

La protéine ParM, a également été identifiée comme un des membres de la superfamille des actines (Bork et al., 1992) bien que l'identité de sa séquence ne soit que de 11%. ParM a été identifié comme homologue procaryote de l'actine en raison de sa structure tridimensionnelle remarquablement similaire à celle de l'actine (**Figure 3**) (van den Ent et al., 2002). *In vitro*, ParM forme des structures filamenteuses en présence d'ATP, ATP γ S et

AMPPNP (Garner et al., 2004; Moller-Jensen et al., 2002). Contrairement à la structure de l'actine F qui constitue une hélice droite, deux protofilaments de ParM forment une hélice gauche (Galkin et al., 2009; Orlova et al., 2007; Popp et al., 2008; van den Ent et al., 2002). Par opposition avec MreB qui est codée depuis le chromosome bactérien, ParM est quant à elle codée par le plasmide R1 présent chez *E. coli* et est impliquée dans la ségrégation de ce plasmide (d'où son nom ParM : *partitioning motor*). Cette fonction nécessite la coopération de ParM avec ParR, une protéine de liaison à l'ADN et de sa séquence de reconnaissance sur le plasmide, *parC*. Une partition efficace du plasmide nécessite une activité ATPase qui est fortement stimulée *in vitro* par la fixation de ParM sur le site *parC* (Jensen and Gerdes, 1997). *In vivo*, ParM forme une structure filamenteuse incurvée qui court d'un pôle à l'autre de la cellule (Moller-Jensen et al., 2002)

1.4.3/ MamK

Les magnétosomes sont présent chez les bactéries magnétotactiques (Komeili et al., 2006; Murat et al., 2010) et définis comme des organites bactériens, plus précisément se sont des chaînes de cristaux de magnétite qui parcourt le long de la cellule et lui permette de s'orienter dans un champ géomagnétique (Komeili, 2007). Il existe de nombreuses caractéristiques communes entre les magnétosomes et des organites eucaryotes, ce qui en font de bon modèle d'étude. L'utilisation de la cryotomographie électronique a mis en évidence la présence d'invaginations de la membrane cellulaire, appelées magnétosomes qui sont entourées d'un réseau de filaments (Komeili et al., 2006). La protéine MamK a été identifiée seulement chez *Magnetospirillum magneticum* et comporte peu de similitudes avec les protéines MreB et ParM (Komeili et al., 2006; Rioux et al., 2010). MamK est

nécessaire pour l'arrangement linéaire des magnétosomes. En effet, la mutation du gène *mamK* induit l'absence du cytosquelette associé aux magnétosomes et ces derniers ne s'assemblent plus en longues chaînes (Pradel et al., 2006; Taoka et al., 2007). L'utilisation d'ATP marqué radioactivement a permis de montrer la polymérisation de MamK sous forme de faisceaux de filaments hélicoïdaux droits (Taoka et al., 2007). Les propriétés d'assemblage et la dynamique de MamK, en comparaison avec les données connues sur les autres homologues bactériens de l'actine, restent à découvrir.

1.4.4/ AlfA et protéines Alp

La protéine AlfA (pour *actin like filament*) constitue une nouvelle famille d'homologues de l'actine car elle présente de faible similarité de séquence avec MreB (17%), ParM (15%) et l'actine (16%) (Becker et al., 2006). La fonction d'AlfA est similaire à celle de ParM et consiste en la ségrégation du plasmide pBET131 de *B.subtilis* (Becker et al., 2006). AlfA, forme des filaments dynamiques en hélice gauche (comme ParM) positionnés le long de l'axe longitudinal des cellules. Néanmoins l'architecture semble distincte de celle de ParM (Polka et al., 2009; van den Ent et al., 2002). Une recherche phylogénétique a permis de mettre en évidence plus de 35 familles de protéine ressemblant à l'actine mais très divergentes et ont été nommées protéines Alp (pour *actin like proteins*) (Derman et al., 2009). La majorité des protéines Alp est codée par des séquences plasmidiques, des génomes de phage ou des éléments intégratifs et seulement dans peu de cas par des chromosomes bactériens, ce qui suggère une grande variabilité fonctionnelle (Derman et al., 2009). L'étude de ces protéines n'a pas encore abouti ; en revanche au moins trois d'entre elles (Alp6A, Alp7A et Alp8A) forment de longues structures filamenteuses chez

E. coli et une d'elles, Alp7A, est impliquée dans la partition plasmidique, ce qui suggère que la plupart (si non toutes) des Alps sont en effet des actines procaryotes (Derman et al., 2009).

1.4.5/ FtsA

Initialement, l'analyse de la séquence de MreB avait révélé des similarités avec celle de FtsA (Doi et al., 1988). FtsA est une protéine impliquée dans la division cellulaire (Donachie et al., 1979) mais c'est également un membre de la superfamille des homologues bactériens de l'actine comme l'indique sa structure tridimensionnelle (van den Ent and Lowe, 2000). Une interaction entre FtsA et l'homologue de la tubuline FtsZ a été mise en évidence et semble nécessaire pour l'ancrage de FtsZ à la membrane (Descoteaux and Drapeau, 1987; Yan et al., 2000). Les analyses *in vivo* ont montré une localisation de FtsA au niveau de l'anneau de division (*Z-ring*) ainsi qu'au niveau des structures hélicoïdales de FtsZ (Addinall and Lutkenhaus, 1996; Ma et al., 1996). *In vitro*, FtsA présente une capacité de polymérisation (Lara et al., 2005). Un domaine de fixation de l'ATP est conservé et une activité ATPasique a été reportée chez FtsA de *B. subtilis* (Feucht et al., 2001), par contre une activité d'une telle sorte n'a pas été détectée chez FtsA de *Streptococcus pneumoniae* (Lara et al., 2005).

1.5/ Quelques généralités sur les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FI) ont été baptisés ainsi en raison de leur taille (8 à 12 nm) intermédiaire à celle des filaments d'actine (5-9 nm) et des MT (~25 nm). Chez les

eucaryotes, les FI constituent une famille de protéines considérablement diversifiée au niveau de leur séquence et de leurs fonctions. Les FI sont constitués de trois parties (**Figure 4 A**) : la tête à l'extrémité amino-terminale, une région centrale « *coiled-coil* » et la queue carboxy-terminale (Parry and Steinert, 1992). Les deux extrémités pouvant varier en taille et en séquence. Les FI peuvent s'auto-assembler *in vitro* en filament non polaire et cela sans la présence de nucléotides, ni de cofacteurs (**Figure 4 B-E**).

Les FI sont des structures flexibles mais très résistantes. Leur principale fonction est de constituer une charpente qui contribue au maintien de la forme et de l'intégrité de la cellule, ainsi qu'à l'ancrage des organites cellulaires. Il a également été proposé qu'ils jouent un rôle dans la migration cellulaire et l'induction de signaux (Coulombe and Wong, 2004; Helfand et al., 2004; Parry et al., 2007)

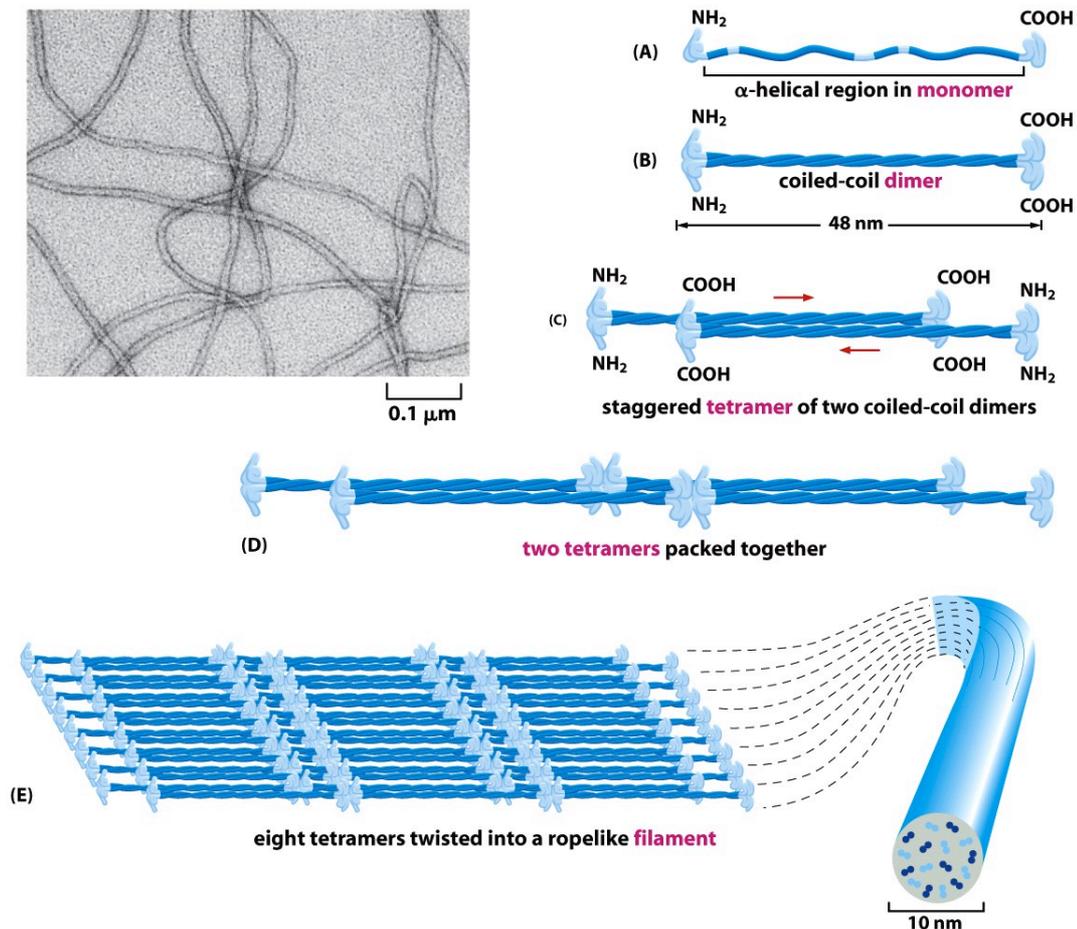


Figure 4. Un modèle de construction d'un filament intermédiaire :

Figure extraite de *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008, Figure 16-19). (A) Représentation schématique d'un monomère qui s'assemble en paires avec un autre monomère identique pour former un dimère (B) avec un domaine central identique et aligné en parallèle en une structure coiled-coil. (C) Deux dimères s'alignent côte à côte et forment un tétramère antiparallèle constitué de quatre chaînes de polypeptides. Le tétramère est la sous-unité soluble des filaments intermédiaires. (D) Au sein de chaque tétramère, les deux dimères sont décalés les uns par rapport aux autres afin d'établir des associations avec d'autres tétramères. (E) Les tétramères sont impactés ensemble en une hélice contenant 16 dimères (32 coiled-coils). Au total, on obtient 10 nm de filaments en forme de corde. La moitié de ces dimères est orienté dans une direction tandis que l'autre moitié pointe dans la direction opposée. Une image de microscopie électronique de filaments intermédiaires apparaît sur la partie gauche de la figure.

1.5.1/ Un homologue procaryote des filaments intermédiaires

C'est en 2003 que la protéine Crescentine, un homologue procaryote des filaments intermédiaires, a été identifiée chez *Caulobacter crescentus* (Ausmees et al., 2003). Chez

cet organisme à la forme caractéristique de croissant de lune, la Crescentine s'auto-assemble du côté interne de la cellule (partie concave) pour former un filament d'un pôle à l'autre (Ausmees et al., 2003). Elle est impliquée dans la détermination de cette forme cellulaire car l'inactivation de son gène, *creS* induit une perte de la courbure des cellules de *C. crescentus*. Le modèle proposé actuellement est que la structure de la Crescentine résiste mécaniquement aux forces d'étirement causé par l'élongation cellulaire ce qui réduirait le stress physique de la paroi cellulaire (Cabeen et al., 2009). L'association entre la structure de Crescentine et l'enveloppe cellulaire semble dépendre de MreB (Charbon et al., 2009). De nombreux génomes bactériens spécifient au moins une protéine homologue des FI (Bagchi et al., 2008) mais très peu ont encore été caractérisés (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2010).

1.6/ La famille WACA

Une quatrième famille de protéines, n'ayant pas d'homologue eucaryote, a été identifiée comme appartenant au cytosquelette bactérien. Ces protéines forment le famille WACA (pour *Walker A Cytoskeletal ATPase*) (Michie and Lowe, 2006). Elles sont codées par les plasmides Ti d'*Agrobacterium* et sont nécessaires pour la régulation spatiale de la partition du chromosome ainsi que pour la division cellulaire (Koonin, 1993). Les protéines de ce groupe appartiennent à une grande famille diversifiée d'ATPases car elles possèdent dans leur séquence un motif Walker A déviant (Koonin, 1993). Bien que les protéines comportant le motif Walker A déviant soient structurellement homologues, leurs fonctions divergent. La famille WACA peut être divisée en deux sous-groupes comprenant MinD et ParA. Ces protéines partagent une très bonne similitude de séquence et de structure

tridimensionnelle (Cordell and Lowe, 2001; Leonard et al., 2005a). MinD est impliquée dans le processus de positionnement de l'anneau *Z-ring* durant la division cellulaire (Bi and Lutkenhaus, 1993; de Boer et al., 1989, 1992b; Rothfield and Zhao, 1996), tandis que les protéines du sous-groupe ParA (incluant Soj, SopA et ParF) ont des rôles multiples dans des processus cellulaires comme la ségrégation chromosomique, la transcription et l'organisation des plasmides ou des chromosomes (Castaing et al., 2008; Hester and Lutkenhaus, 2007). Toutes les protéines portant un motif Walker A déviant peuvent dimériser de façon ATP-dépendante (Koonin, 1993). Généralement les protéines WACA présentent un comportement dynamique *in vivo* (Drew et al., 2005; Shih et al., 2003). ParA localise en alternance entre les nucléoïdes (Ebersbach and Gerdes, 2001) et MinD semble se déplacer par oscillation d'un pôle à l'autre de la cellule (Rowland et al., 2000). L'activité ATPase et le comportement dynamique des protéines WACA sont régulés par des interactions avec des protéines activatrices (Leonard et al., 2005b; Ma et al., 2004). MinD nécessite MinE (Hu and Lutkenhaus, 2001) et ParA nécessite ParB (Bouet and Funnell, 1999). Le mécanisme d'action de MinD est probablement le mieux connu à l'heure actuelle grâce à l'étude chez *E. coli* des trois protéines MinC, MinD et MinE (de Boer et al., 1989). Les protéines MinCDE ont été identifiées pour leur rôle dans le positionnement du septum de division au milieu de la cellule ainsi que de l'inhibition de la division cellulaire au niveau des pôles cellulaires. MinD est attachée à la membrane et interagit avec MinC (l'inhibiteur de la division cellulaire) afin de la recruter à la membrane (Szeto et al., 2002; Zhou and Lutkenhaus, 2003). MinE semble aussi pouvoir interagir avec MinD pour l'activation du renouvellement de l'ATP de MinD (Hu and Lutkenhaus, 2001). Le mécanisme d'oscillation de MinD est fortement lié à l'hydrolyse de l'ATP. A noter que chez *B. subtilis* on n'observe pas d'oscillation de MinD, qui semble plutôt attachée aux

pôles cellulaires par le biais d'une autre interaction avec DivIVA (car *B. subtilis* ne possède pas de MinE) (Edwards and Errington, 1997; Edwards et al., 2000). Le mécanisme d'action de ParA dans le positionnement des plasmides et des chromosomes reste, quant à lui, mal connu. Il a été mis en évidence que ParB se fixe au plasmide au niveau du site *parS*, puis ParA interagit avec le complexe ParB/*parS* (Bouet and Funnell, 1999).

2/ *Bacillus subtilis*, top modèle

Le genre *Bacillus* fait partie du phylum *Firmicutes*. Les bactéries qui définissent ce genre sont des bacilles à Gram positif, aérobies et qui ont la capacité à former des endospores (appelées également spores). Ce genre bactérien est répandu dans la nature et se retrouve dans presque toutes les niches écologiques allant du sol, à l'air et aux sédiments aquatiques. La grande majorité de ces organismes sont non-pathogènes sauf quelques rares espèces pathogènes pour les animaux et les humains, comme *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* ou pathogène d'insectes, *Bacillus thuringiensis*. La diversité métabolique et la pathogénicité réduite des *Bacillus* font de ces bactéries des outils remarquables pour les biotechnologies et les applications industrielles. Le membre le plus connu du genre *Bacillus* est un dénommé *Bacillus subtilis*. Cette bactérie a été identifiée pour la première fois en 1835 par Christian Gottfried Ehrenberg sous le nom de *Vibrio subtilis* puis quelques années plus tard, en 1872, elle fut renommée par Ferdinand Cohn en son nom actuel, *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis est une bactérie ubiquitaire mais habituellement retrouvée dans le sol. Elle a une forme de bâtonnet et est recouverte d'une ciliature péritriche. De taille assez grande, c'est un modèle d'étude remarquable. C'est une bactérie mésophile, c'est à dire vivant à des températures modérées, facilement cultivable et manipulable en laboratoire. Elle est beaucoup employée en industrie pour la synthèse de nombreux composés tels que de l'amylase, des protéases, des cellulases ou des antibiotiques. Comme tous les membres du genre *Bacillus*, *B. subtilis* a la possibilité d'élaborer des tactiques sophistiquées pour survivre dans des conditions rudes. Afin d'assurer la survie ou l'adaptation aux changements environnementaux, au moins trois programmes génétiques différents peuvent être induits chez *B. subtilis* : (i) l'entrée en phase stationnaire où les cellules deviennent isolées et mobiles, (ii) un déclenchement de la compétence naturelle pour intégrer de l'ADN environnant en vue d'acquérir du nouveau matériel génétique (iii) et enfin, la formation d'endospores.

Les endospores sont extrêmement résistantes à une grande variété de stress tels que la chaleur, le froid, la sécheresse et les radiations UV (Driks, 2002). Elles sont considérées comme des *time-capsules* car elles ont permis la survie des organismes pendant des milliers, voire des millions d'années (Cano and Borucki, 1995). Lorsque les conditions environnementales sont modifiées comme par exemple à un changement climatique, une dispersion par le vent ou encore un transport par un autre organisme vers une nouvelle niche, la spore peut germer et la cellule peut alors entrer à nouveau en phase végétative. Une autre caractéristique intéressante de *B. subtilis* est son comportement social ; les cellules ont la possibilité de se regrouper entre elles ou sur des surfaces en structures multicellulaires appelées biofilms (Lenon et al., 2008). Les cellules regroupées peuvent aussi se déplacer en masse par un phénomène appelé *swarming* (Kearns and Losick, 2003).

Un système de *quorum sensing* est également présent chez *B. subtilis* (Tortosa et al., 2001b; Tran et al., 2000), c'est un mécanisme de communications intercellulaires permettant la modulation coordonnée de l'expression des gènes en réponse à des changements de densité de la population bactérienne (Waters and Bassler, 2005).

B. subtilis est un des organismes les plus étudiés ; parmi les procaryotes, il arrive en seconde position derrière *Escherichia coli* (Sonenshen et al., 2002). La richesse et le nombre d'informations qui ont été collectées sur cette bactérie font de *B. subtilis* une des bactéries les plus utilisées en génétique et biologie cellulaire. C'est le principal modèle pour l'analyse de la physiologie des bactéries à Gram positif. L'utilisation de *B. subtilis* comme système expérimental a été stimulée par la grande variété d'outils de biologie moléculaire disponibles pour sa manipulation et par l'identification (ou la génération) de souches facilement manipulables et fortement compétentes pour des transformations naturelles. En effet, les recherches actuelles portent sur différentes souches isolées, en commençant par « la souche d'origine » de F. Cohn datant de 1872 et communément appelée, la souche de Marburg. A partir de cette souche, d'autres ont été sélectionnées en fonction de leur phénotype de croissance. Ainsi, Burkholder & Giles ont sélectionné plusieurs souches suite à des inductions de mutations biochimiques (Burkholder and Giles, 1947). En 1958, parmi la transformation de trois mutants auxotrophes par de l'ADN exogène (Spizizen, 1958) la souche dite 168 fut sélectionnée pour son efficacité de transformation (**Figure 5**). Par la suite en collaboration avec C. Anagnostopoulos les conditions de transformation ont été définies (Anagnostopoulos and Spizizen, 1961). Cette souche 168 et ses dérivés sont toujours utilisés aujourd'hui et sont devenus le paradigme pour la recherche sur les bactéries à Gram positif.

METHODS	
<i>Strains of B. subtilis.</i> —The strains of <i>B. subtilis</i> were obtained from Dr. Charles Yanofsky and originated from a collection of Burkholder and Giles ² at Yale University.	
Wild-type <i>B. subtilis</i> 23 ³ was employed for the isolation of transforming DNA. The following strains of nutritionally deficient <i>B. subtilis</i> were used as recipients for the transformation studies:	
Strain No.	Growth Requirement
168	L-Tryptophane, or indole
166	L-Tryptophane, indole, or anthranilic acid
122	Nicotinic acid

Figure 5. Extrait de la méthode d'isolation de la souche 168 de *B. subtilis* (Spizizen, 1958)

En 1997, le séquençage complet du génome de *B. subtilis* a été réalisé (4.214.810 pb et 4.100 phases ouvertes de lecture) ouvrant ainsi la porte de la microbiologie vers de nouvelles perspectives (Kunst et al., 1997). De nouvelles questions biologiques, suivies de découvertes, ont pu voir le jour portant sur l'organisation chromosomique, l'expression globale des gènes, les fonctions des protéines ou encore la physiologie cellulaire. Mais par la même occasion le séquençage a permis de mettre en évidence combien il reste à découvrir pour une identification complète de la fonction des gènes.

2.1/ Les homologues de l'actine de type MreB chez *Bacillus subtilis*

B. subtilis a trois protéines homologues de l'actine eucaryote de type MreB appelées : MreB, MreBH pour *MreB Homologue* et Mbl pour *MreB-Like*. Le gène *mreB* (1011 pb) est positionné dans un opéron en amont des deux morphogènes *mreC* et *mreD*. *mbl* (999 pb) est gène monocistronique (Lindback and Kolsto, 1999) et *mreBH* (1005 pb) est probablement en opéron avec un petit gène de fonction inconnue, *ykpC* (Kobayashi et al., 2003). Dans des conditions normales de croissance, les gènes *mreB* et *mbl* sont essentiels, tandis que *mreBH* n'est essentiel que dans des conditions de croissance à basse

concentration en magnésium (Jones et al., 2001). Il est néanmoins possible d'obtenir des souches viables inactivées pour *mreB* ou *mbl* par l'utilisation d'un milieu de culture à forte concentration en magnésium (Mg^{2+}) (Formstone and Errington, 2005; Schirner and Errington, 2009a). La mutation des gènes *mreB* et *mbl* induit de gros défauts de morphologie qui sont également restaurés par la présence d'un niveau élevé de Mg^{2+} (Carballido-López et al., 2006; Formstone and Errington, 2005; Jones et al., 2001). La mutation de *mreBH* quant à elle induit également des défauts de morphologie plus léger que pour les deux autres homologues (Carballido-López et al., 2006). Le mécanisme par lequel le Mg^{2+} est capable de restaurer la viabilité des trois mutants *mreB-like*, ainsi qu'une morphologie et une croissance presque identiques à celles de la souche sauvage est encore inconnu.

Chacun des trois homologues de l'actine chez *B. subtilis* a été associé à un rôle caractéristique dans la morphogénèse de la cellule (Carballido-López et al., 2006; Daniel and Errington, 2003; Jones et al., 2001), cependant il a été montré qu'il existe une redondance partielle dans leur fonction (Kawai et al., 2009a).

Le mécanisme d'action de MreB reste inconnu, son rôle principal semble être le contrôle de la largeur cellulaire (Formstone and Errington, 2005; Jones et al., 2001). Il a été également suggéré que MreB est impliquée dans le positionnement de la machinerie de synthèse du peptidoglycane (PG) (Formstone and Errington, 2005). En plus de ce rôle dans la morphogénèse, il a été suggéré que MreB jouerait un rôle majeur dans la ségrégation du chromosome chez *B. subtilis* ; mais ce rôle est controversé (Formstone and Errington, 2005; Soufo and Graumann, 2003).

Le rôle principal de Mbl n'est pas complètement élucidé. Une première étude avait mis en évidence le rôle de Mbl dans la biosynthèse de la paroi latérale (élongation), notamment en contrôlant l'insertion hélicoïdale des précurseurs du PG sur la paroi latérale (Daniel and Errington, 2003). Mais, quelques années plus tard ce rôle a été contredit (Tiyanont et al., 2006). Finalement, c'est récemment qu'une troisième publication (Kawai et al., 2009a) montre également que Mbl seule n'a pas de contrôle sur l'insertion des précurseurs du PG car il existe une redondance fonctionnelle partielle des trois isoformes. C'est seulement la double (*mreB* et *mbl*) ou triple (*mreB*, *mbl* et *mreBH*) interruption des gènes qui induit des défauts de synthèse du PG au niveau de la paroi latérale (Kawai et al., 2009a). L'interruption de Mbl dans des conditions standards avait été réalisée dans un premier temps mais avait présenté une croissance difficile (Abhayawardhane and Stewart, 1995), puis dans un deuxième temps, il a été montré que les souches dépourvus de *mbl* présentaient des supresseurs c'est-à-dire une ou plusieurs mutations spontanées additionnelles qui compensent le phénotype de la première mutation (Schirner and Errington, 2009a). Seule la croissance en présence de forte concentration en magnésium permet de réaliser la mutation de *mbl* en s'affranchissant de l'apparition de supresseurs. Ainsi, un des supresseurs du mutant *mbl* identifié correspond à l'interruption de *rsgI*, ce qui conduit à une activation du régulon du facteur sigma I qui est normalement induit par un stress thermique et permet la croissance de *B. subtilis* à une température de 55°C. C'est dans un contexte génomique dépourvu de *rsgI* que la triple interruption de *mreB*, *mbl* et *mreBH* a pu être réalisée (Schirner and Errington, 2009a).

Le troisième isoforme, MreBH, est également impliqué dans la morphogenèse : c'est un régulateur spatial de la maturation (hydrolyse) de la paroi (Carballido-López et al., 2006).

Les cellules maintiennent ainsi un équilibre entre la synthèse et l'hydrolyse du matériel de la paroi cellulaire (Carballido-López et al., 2006; Stewart, 2005).

MreB, Mbl et MreBH colocalisent en une structure hélicoïdale à la périphérie cellulaire, en lien étroit avec la membrane interne cytoplasmique (Carballido-López et al., 2006). Il a été proposé que l'hélice des trois protéines MreB soit responsable de l'organisation et de la coordination de la machinerie de biosynthèse de la paroi cellulaire pendant la croissance (Daniel and Errington, 2003). En effet cette idée est portée par le fait que la topologie d'insertion des précurseurs du PG apparaît en un modèle hélicoïdal le long de la paroi latérale (cylindre) chez *B. subtilis* (Daniel and Errington, 2003; Tiyanont et al., 2006). Ce patron d'insertion est similaire à la localisation en hélice des protéines MreB-like. Il a aussi été montré que MreBH interagit directement avec LytE, une hydrolase de la paroi cellulaire (Carballido-López et al., 2006). Cependant, les détails des mécanismes ainsi que les protéines effectrices utilisées par les protéines MreB pour l'insertion et la dégradation du matériel de la paroi, restent à caractériser.

3/ Synthèse de la paroi bactérienne chez *B. subtilis*

3.1/ Généralités sur la paroi

Chez la grande majorité des bactéries, la paroi bactérienne est responsable de la forme ainsi que de l'intégrité structurale de la cellule. La paroi représente une barrière physique et mécanique pour la protection de la cellule contre les agressions environnementales mais surtout pour contrer la forte pression osmotique à l'intérieur de la cellule. Cette barrière a

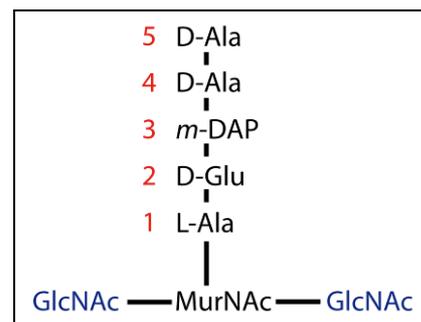
donc une importance cruciale pour la viabilité de la cellule. La paroi est également une structure dynamique, continuellement en synthèse et en hydrolyse pour permettre la croissance et la division cellulaire (Vollmer et al., 2008; Weidel and Pelzer, 1964).

Chez les bactéries à Gram positif, comme l'organisme modèle *B. subtilis*, la paroi cellulaire est principalement constituée d'une structure multicouche épaisse de peptidoglycane (PG) aussi appelé muréine et de polymères anioniques, en particulier les acides téichoïques (Bhavsar and Brown, 2006; Neuhaus and Baddiley, 2003; Pollack and Neuhaus, 1994). Le PG est un réseau de polymères composé de longues chaînes de glycanes, reliées les unes aux autres par des ponts peptidiques flexibles (Hayhurst et al., 2008). Cette composition permet à la paroi d'être à la fois une structure solide et élastique.

La structure de base du PG est identique à toutes les eubactéries à l'exception des *Mycoplasma*. Les chaînes de glycanes sont composées d'une alternance de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) reliés par des liaisons osidiques β -1,4. Ainsi, une unité de base du PG consiste en un disaccharide-pentapeptidique (**Figure 6**).

Figure 6. Unité de base du PG de *B. subtilis* :

Disaccharide-pentapeptique composé d'une alternance de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'acide *N*-acétylmuramine (MurNAc) reliés par des liaisons osidiques β -1,4. Le penta-peptide (1 à 5) est attaché par une liaison covalente au groupement lactyl du MurNAc. Chez *B. subtilis* l'acide aminé en position 3 est l'acide méso-diaminopimélate (*m-DAP*).



La composition chimique de ces chaînes de glycanes varie très peu entre les différentes espèces bactériennes. En revanche, il existe des variations dans la composition des ponts peptidiques qui sont reliés au groupement carboxyle de MurNAc (Schleifer and Kandler,

1972). Les ponts peptidiques sont synthétisés en chaînes de penta-peptides, constitués de plusieurs acides aminés aux conformations énantiomères L et D et d'un acide aminé dibasique en troisième position. L'acide aminé dibasique est essentiel pour réaliser la jonction entre les différents ponts peptidiques du PG. Chez la majorité des bactéries à Gram positif, cet acide dibasique est une lysine. Par contre, chez la plupart des bactéries à Gram négatif ainsi que quelques bactéries à Gram positif tel que *B. subtilis*, on retrouve à cette position l'acide *méso*-diaminopimélate (*m*-DAP) majoritairement amidé (**Figure 6**) (Scheffers and Pinho, 2005). Pour exemple le pont peptidique présent chez *E. coli* et *B. subtilis* est constitué de L-Ala₍₁₎-D-Glu₍₂₎-*m*-DAP₍₃₎-D-Ala₍₄₎-D-Ala₍₅₎ et c'est L-Ala qui est reliée au MurNAc (**Figure 6**) (Foster and Popham, 2002; Warth and Strominger, 1971).

3.2/ La voie de synthèse du *méso*-diaminopimélate

La voie de biosynthèse du *m*-DAP désignée sous le nom de voie de synthèse du diaminopimélate (*DAP pathway*) est également dans la voie de synthèse commune à la lysine, la thréonine, la méthionine et le dipicolinate (Galili, 1995). Cette voie métabolique importante et essentielle, présente chez la grande majorité des bactéries et plantes, synthétise de la lysine à partir de l'aspartate (Galili, 1995; Hudson et al., 2005). Chez *B. subtilis* (**Figure 7**), à l'exception de la première et de la dernière étape, toutes les enzymes impliquées sont essentielles et par conséquent cette voie de biosynthèse est vitale pour la cellule.

La **Figure 7** illustre les différentes étapes de la voie de synthèse des DAP chez *B. subtilis* (168).

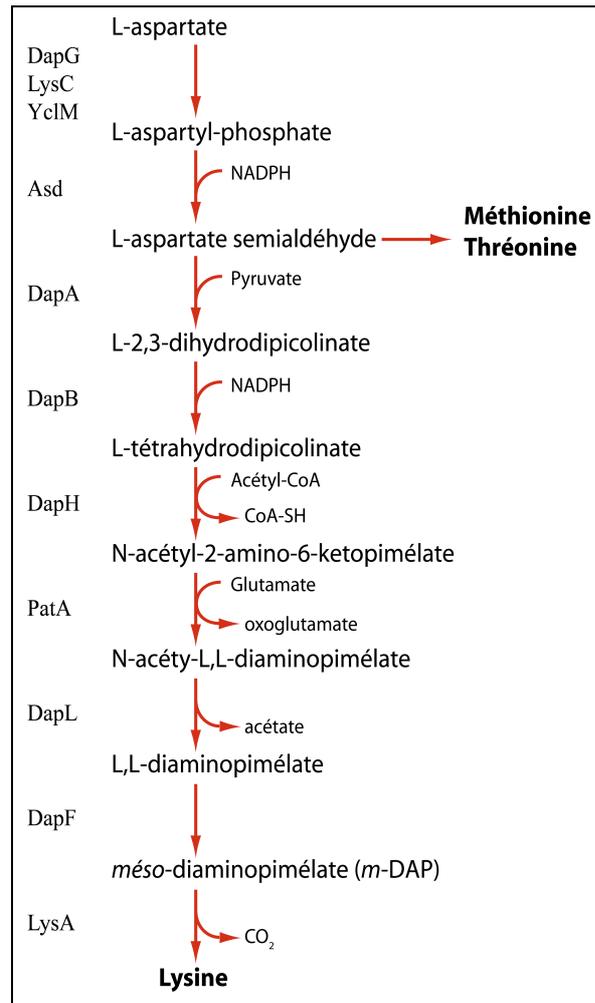


Figure 7. Voie de synthèse du méso-diaminopimélate chez *B. subtilis*

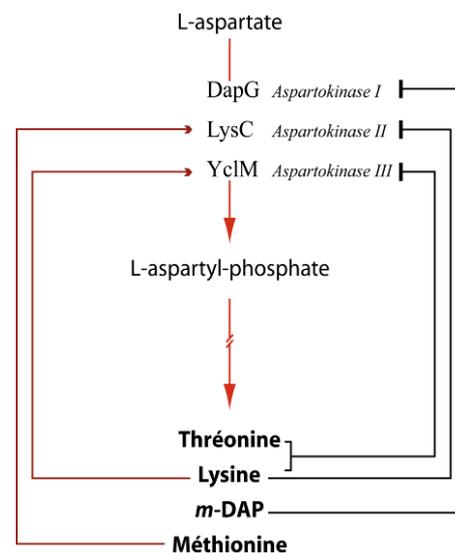
La première étape est catalysée par des aspartokinases qui convertissent l'aspartate en aspartyl-phosphate. Bien que cette étape dépende d'enzymes non essentielles, une régulation appropriée de l'activité des aspartokinases chez les bactéries est habituellement obtenue par la production de multiple isozymes. Les aspartokinases sont sujettes à des régulations différentielles comme la répression par le produit final ou des inhibitions allostériques. Chez *B. subtilis* (168), trois aspartokinases monofonctionnelles ont été identifiées, aspartokinase I nommée DapG ; aspartokinase II nommée LysC et

aspartokinase III nommée YclM (Graves and Switzer, 1990a, b; Kobashi et al., 2001; Zhang et al., 1990).

Bien que ces trois isozymes, DapG, LysC et YclM catalysent la même réaction, elles diffèrent par leurs propriétés comme leur masse molaire, leur spécificité pour les cations monovalents, leur réponse aux variations de pH, de substrats ou de cinétiques d'inhibitions (Rosner and Paulus, 1971).

Leur action respective étant dépendante des conditions de croissance ainsi que des besoins de la cellule, on observe ainsi des rétrocontrôles sur chacune des aspartokinases (**Figure 8**).

Figure 8. Régulation des aspartokinases chez *B. subtilis* :
Récapitulatif des rétrocontrôles des trois aspartokinases (DapG, LysC, YclM) de la voie de biosynthèse du méso-diaminopimélate induit par les composés synthétisés : thréonine, lysine, m-DAP et méthionine. Les flèches rouges indiquent les rétrocontrôles positifs, et les traits noirs les rétrocontrôles négatifs.



Le niveau d'expression de *dapG* (code pour l'aspartokinase I) est constant durant la croissance en phase exponentielle ainsi qu'en phase stationnaire et l'addition d'acides aminés dans le milieu ne modifie pas son expression. En revanche, le *m*-DAP synthétisé dans la cellule va induire un rétrocontrôle négatif de l'expression du gène *dapG* (Kochhar and Paulus, 1996). Le rôle de DapG semble être de prévenir un niveau constant de synthèse d'aspartyl-phosphate indispensable à la biosynthèse des précurseurs du *m*-DAP (Rosner and

Paulus, 1971; Roten et al., 1991). Le gène *lysC* code l'aspartokinase II a un niveau d'expression qui décline en fin de phase exponentielle de croissance, ce gène *lysC* est réprimé en milieu riche et la lysine synthétisée opère un rétrocontrôle négatif sur son expression (Kochhar and Paulus, 1996). Le rôle de LysC serait d'assurer la synthèse des précurseurs de la lysine. Enfin, le gène *yclM* qui code l'aspartokinase III est inhibé par l'action synergique de la thréonine et de la lysine mais il est également induit par la présence de lysine (Kobashi et al., 2001). Bien que cela semble paradoxale, *yclM* est donc réprimé et induite par la lysine. Toutefois, la concentration minimale de lysine nécessaire à la répression de *yclM* doit être fortement supérieure à celle permettant de réprimer *lysC* et ne pourra avoir lieu qu'en présence de thréonine. Cette répression de *yclM* par la thréonine et son induction par la lysine oriente le rôle de l'enzyme YclM vers la synthèse de la thréonine (Kobashi et al., 2001).

La seconde étape de la voie de synthèse du *m*-DAP est catalysée par une aspartate semi aldéhyde déshydrogénase appelée, Asd (Chen et al., 1993) (**Figure 7**). Le produit de cette réaction, le L-aspartate semi aldéhyde fait la jonction entre d'un côté la voie aboutissant à la synthèse de la méthionine, la thréonine et l'isoleucine (non décrite dans le cadre de cette thèse) et de l'autre côté la continuité de la voie de synthèse du *m*-DAP. Le L-aspartate semi aldéhyde va ensuite être associé à du pyruvate sous l'action de DapA, une dihydrodipicolinate synthase (Chen et al., 1993), pour donner du dihydrodipicolinate qui est à son tour réduit par DapB, une dihydrodipicolinate réductase, pour former du L-tetrahydrodipicolinate. Une réaction de transfert d'un groupement acyle par DapH (appelée aussi YkuQ) (une acétyl transférase) (Beaman et al., 2002; Rodionov et al., 2003;

Weinberger and Gilvarg, 1970) aboutit au N-acétyl-2-amino-6-ketopimélate puis Pata, une amino transférase, conduit au N-acétyl-L,L-diaminopimélate (Berger et al., 2003).

Les septièmes et huitièmes réactions de cette voie sont une déacétylation et une inversion stéréochimique catalysées respectivement par DapL (appelée aussi Ykur) (Rodionov et al., 2003), une acétyl-diaminopimélate déacétylase et Dapf (appelée aussi YutL) (Rodionov et al., 2003), une DAP épimérase, qui forment le *m*-DAP. Le *m*-DAP peut alors être soit décarboxylé par LysA pour donner de la lysine (Kalcheva et al., 1997) (**Figure 7**), soit être directement utilisé par MurE (une UDP-N-acétylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-*m*-diaminopimélate synthétase (Michaud et al., 1990)) et être incorporé en troisième position dans le précurseur du PG (Daniel and Errington, 2003; van Heijenoort, 2007) (**Figure 49**).

Il est à noter que quatre variantes de cette voie de synthèse des DAP ont été identifiées en fonction de l'organisme (**Tableau 1**) appelées : succinyl-DAP, acétyl-DAP, DAP-déshydrogénase et DAP-aminotransférase.

Succinyl-DAP	Acétyl-DAP	DAP-déshydrogénase	DAP-aminotransférase
DapA dihydrodipicolinate synthase	DapA	DapA	DapA
DapB dihydrodipicolinate réductase	DapB	DapB	DapB
DapD succinyl transférase	DapH (YkuQ) acétyl transférase	Ddh diaminopimélate déshydrogénase	DapL diaminopimélate aminotransférase
DapC succinyl diaminopimélate aminotransférase	PatA acétyl diaminopimélate aminotransférase		
DapE succinyl diaminopimélate désuccinylate	DapL (YkuR) acétyl diaminopimélate déacétylase		
DapF DAP épimérase	DapF		
LysA décarboxylase	LysA	LysA	LysA

Tableau 1. Récapitulatif des quatre voies de synthèse de la lysine chez les bactéries

Toutes quatre partagent les mêmes premières et dernières étapes catalysées par DapA, DapB et LysA et diffèrent au niveau des réactions centrales (Hudson et al., 2006; Velasco et al., 2002; Weinberger and Gilvarg, 1970).

La première voie à avoir été identifiée chez *E. coli* est la succinyl-DAP (Gilvarg, 1959, 1961), elle ressemble étroitement à la voie acétyl-DAP présente chez *B. subtilis* et décrite ci-dessus. On retrouve les mêmes réactions enzymatiques à une exception près : un groupement succinyle est incorporé au lieu d'un groupement acétyle (Velasco et al., 2002). L'identification ainsi que l'annotation des enzymes de la voie acétyl-DAP sont basées sur une homologie de séquence avec les enzymes identifiées chez *E. coli* (Rodionov et al., 2003). La voie succinyl-DAP est largement répandue parmi les différentes espèces bactériennes alors que la voie acétyl-DAP a une distribution phylogénétique plus étroite (**Tableau 2**) (Velasco et al., 2002; Weinberger and Gilvarg, 1970).

Succinyl-DAP	Acétyl-DAP	DAP-déhydrogénase	DAP-Aminotransférase
Bactéries Protéobactéries, <i>E. coli</i> Cyanobactéries Firmicutes Bacillus/Clostridium <i>B. pumilus</i> Plactomyces/Chlamydia/ Verrucomicrobium Spirochaetales Thermotogales Archées Euryarchaeota Crenarchaeota Eucaryotes Protoctista Hyochytriomycota Oomucota Plantes	Bactéries Firmicutes Bacillus/Clostridium <i>B. pumilus</i> <i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. subtilis</i>	Bactéries Protéobactéries Sous-division gamma Firmicutes Actinobactéries <i>Corynebacterium glutamicum*</i> Bacillus/Clostridium <i>B. brevis*</i> <i>B. cereus*</i> <i>B. licheniformis*</i> <i>B. sphaericus</i> Eucaryotes Plantes	Bactéries Chlamydia Archées Methanothermobacter thermotrophiscus Eucaryotes Plantes <i>Arabidopsis thaliana</i> Cyanobactéries

Tableau 2. Distribution biologique et non exhaustive des voies de synthèse du diaminopimélate :

Adaptation d'après (Liu et al., 2010; McCoy et al., 2006; Velasco et al., 2002; Weinberger and Gilvarg, 1970).

* Bactéries qui peuvent également utiliser la voie succinyl-DAP (Schrumpf et al., 1991; Wehrmann et al., 1998).

La voie DAP-déshydrogénase implique moins de protéines que les deux précédentes voies (**Tableau 1**). Une seule enzyme, Ddh pour DAP déshydrogénase, conduit à la formation de DAP. Cette voie est utilisée par quelques *Firmicutes*, *proteobactéries* et plantes (Misono et al., 1976, 1979).

Enfin, la voie DAP-aminotransférase identifiée récemment, possède uniquement deux enzymes centrales. La première enzyme appelée DapL (comme dans la voie acétyl-DAP) est une diaminopimélate aminotransférase. Cette protéine réalise en une seule étape la transformation du L-tétradrodipicolinate en L,L-diaminopimélate sans ajout de groupement acétyl. La seconde enzyme, Dapf, catalyse la réaction de formation du *m*-DAP comme pour les voies succinylase et acétylase. La voie DAP-aminotransférase est partagée par des *cyanobacteria*, *chlamydia*, *archaea* et plantes (Hudson et al., 2008; Hudson et al., 2006; Liu et al.; McCoy et al., 2006).

La plupart des bactéries ne possèdent ou n'utilisent qu'une seule de ces quatre voies de synthèse du DAP. Néanmoins quelques procaryotes comme par exemple *C. glutamicum* et *Bacillus macerans* possèdent les deux voies succinylase et déshydrogénase (Schrumpf et al., 1991).

3.3/ La voie de synthèse du peptidoglycane

La synthèse du PG est classiquement divisée en trois groupes de réactions successives (van Heijenoort, 1998). D'abord la synthèse et l'assemblage des précurseurs nucléotidiques qui se déroule dans le cytoplasme, puis la synthèse des précurseurs lipidiques au niveau de la membrane cytoplasmique et enfin l'étape finale de polymérisation du PG qui prend place à

l'extérieur de la membrane cytoplasmique. La plupart des enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs du PG de *B. subtilis* ont été assignée par similitude avec la séquence d'*E. coli* pour laquelle, la fonction a été démontrée (Foster and Popham, 2002).

3.3.1/ La synthèse des précurseurs nucléotidiques

Le premier groupe de réaction pour la synthèse du PG se déroule dans le cytoplasme et consiste en la formation des deux précurseurs nucléotidique: UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et UDP-*N*-acétylmuramique-penta-peptide (UDP-MurNAc-penta-peptide) (Scheffers and Pinho, 2005; van Heijenoort, 1998). La **Figure 9** schématise les différentes réactions aboutissant au produit final, le PG. La formation de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique est catalysée par les enzymes MurA et MurB (Brown et al., 1995; Marquardt et al., 1992; Matsuzawa et al., 1969). Se succèdent ensuite quatre réactions pour l'élaboration du penta-peptide relié au UDP-MurNAc, exécutées successivement par MurC, MurD, MurE et MurF (van Heijenoort, 1998) qui toutes quatre sont des ligases d'acide aminé ATP-dépendantes (El Zoeiby et al., 2003).

3.3.2/ La synthèse des précurseurs des intermédiaires lipidiques

Le deuxième groupe de réaction se déroule quant à lui dans la membrane cytoplasmique (**Figure 9**) (Bouhss et al., 2008; van Heijenoort, 1998). Le groupement phospho-MurNAc-penta-peptide de l'UDP-MurNAc-penta-peptide est transféré par MraY au bactoprénol, une molécule lipidique, produisant ainsi le lipide I (MurNAc-penta-peptide-pyrophosphoryl-undécaprenyl) (Branstrom et al., 2000). Puis le GlcNAc issu de l'UDP-GlcNAc est ajouté

au lipide I par la protéine MurG ce qui abouti au second intermédiaire lipidique appelé lipide II (GlcNAc- β -(1,4)-MurNAc-penta-peptide-pyrophosphoryl-undécaprénol). Le lipide II est le substrat pour la réaction de polymérisation du PG chez les bactéries. La polymérisation du PG ayant lieu à l'extérieur de la cellule, le lipide II doit être transporté à travers la membrane cytoplasmique. Chez *E. coli*, la protéine membranaire FtsW vient d'être identifiée comme le transporteur du lipide II à travers la membrane cytoplasmique (Mohammadi et al., 2011). En revanche, chez *B. subtilis* la ou les protéine(s) responsable(s) de la translocation du lipide II n'ont pas encore été formellement identifiées, même si RodA (Henriques et al., 1998) et FtsW (Ehlert and Holtje, 1996; Scheffers, 2007) apparaissent comme bons candidats pour être la flipase liée respectivement à l'élongation de la paroi latérale et la formation du septum.

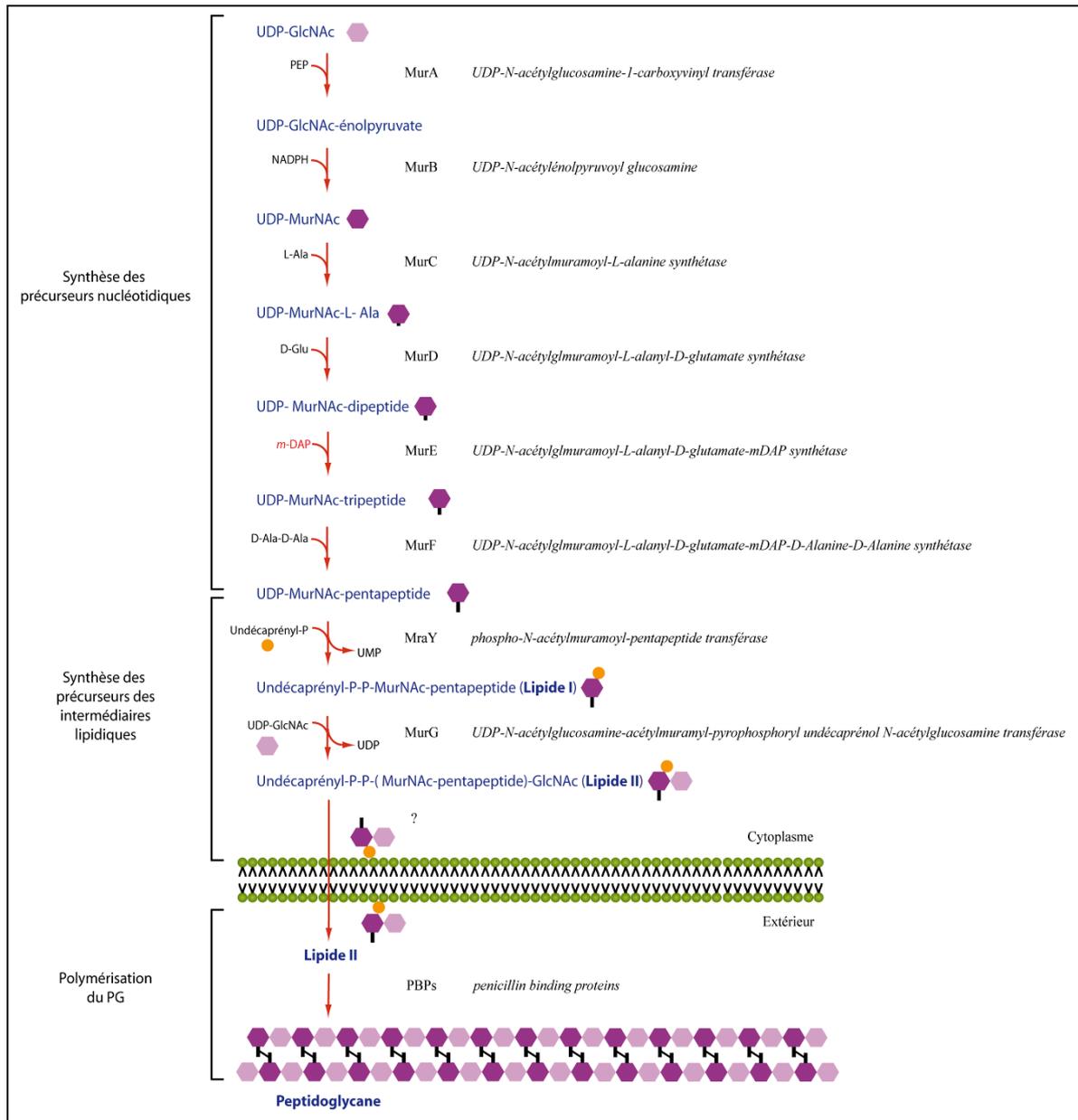


Figure 9. Voie de biosynthèse du peptidoglycane

3.3.3/ Polymérisation du peptidoglycane

Le troisième groupe de réactions constitue l'étape finale de la synthèse du PG et prend place à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Scheffers and Pinho, 2005). Cette étape consiste en l'incorporation des nouvelles unités disaccharide pentapeptidique au sein du PG préexistant. Une catégorie d'enzymes a été principalement identifiée pour exécuter cette incorporation et désignée sous le nom de *penicillin-binding-proteins* (PBPs). Les PBPs catalysent les réactions de transglycosylation et de transpeptidation (**Figure 10**) (Scheffers and Pinho, 2005). La réaction de transglycosylation permet la formation des chaînes de glycane par la liaison des extrémités réduites du MurNac naissant au carbone C4 du GlcNac (Fraipont et al., 2006), ce qui entraîne une libération du résidu undécaprénylpyrophosphate. Séquentiellement, durant la réaction de transpeptidation le résidu D-Ala-D-Ala du penta-peptide précurseur est clivé et libère le D-Ala terminal. Ce clivage produit l'énergie nécessaire à une réaction de transfert et de liaison de l'avant dernier résidu D-Ala avec l'acide aminée dibasique (*m*-DAP chez *B. subtilis* et *E. coli*) d'un penta-peptide du PG préexistant.

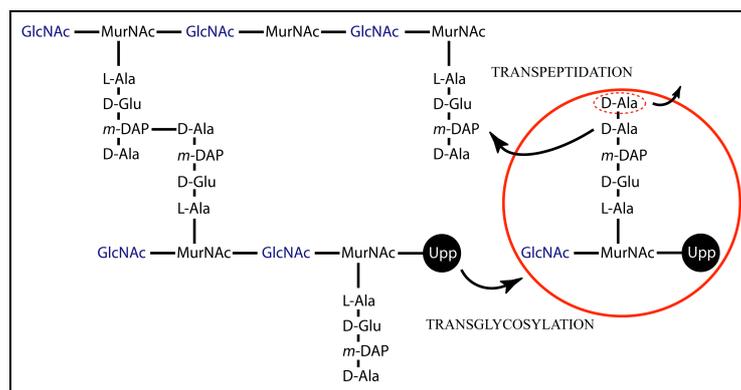


Figure 10. Polymérisation de peptidoglycane par action des PBPs : Réactions de transglycosylation et de transpeptidation. Abréviations, **Upp**: undécaprénol phosphate, **GlcNAc**: N-acétylglucosamine, **MurNAc**: acide N-acétylmuramique, **m-DAP**: méso-diaminopimélate. Le cercle rouge entoure le précurseur.

3.4 / Renouvellement du PG

La cellule est soumise à un renouvellement perpétuel de sa paroi durant lequel le PG doit être hydrolysé et synthétisé en même temps. Dans les sections précédentes nous avons développé la synthèse du PG mais pour l'incorporation de nouveaux précurseurs dans le sacculus il est nécessaire de l'hydrolyser. Ce sont les autolysines qui sont responsable d'une variété de processus chez *B. subtilis* tels que la maturation du PG, la séparation de la paroi au niveau du septum durant la division, le développement de la compétence et de la spore, la germination et la sécrétion des protéines (Smith et al., 2000). Les analyses du génome ont mis en évidence 35 autolysines chez *B. subtilis* qui ont été réparties en 11 familles de protéines (Smith et al., 2000). Les autolysines hydrolysent le PG et peuvent endommager la cellule c'est pourquoi leurs activités ont besoin d'être extrêmement régulées ; cependant peu de choses sont connues sur cette régulation. Il a été suggéré que ce soit le niveau d'énergie provenant de la force protomotrice de la cellule qui contrôlerait l'activité des autolysines (Calamita et al., 2001).

4/ Les réseaux d'interactions protéiques

4.1/ Généralité sur les réseaux protéiques

“Montre moi tes amis, je te dirai qui tu es”, tel est le dicton. Les interactions protéine-protéine jouent aussi un rôle fondamental et crucial dans les processus biologiques. En effet, bon nombre des processus cellulaires majeurs tels que la réplication de l'ADN, la

transcription, la traduction, la sécrétion, le contrôle du cycle cellulaire et les transductions de signaux sont réalisés par des machineries cellulaires impliquant un grand nombre de protéines. Ces complexes protéiques représentent des composants essentiels à la vie cellulaire et une part importante de l'étude de la biologie des systèmes. L'identification des partenaires d'une protéine peut donc révéler sa fonction et/ou les mécanismes moléculaires qui y sont impliqués. La construction du réseau d'interactions d'une protéine révèle son environnement et en conséquence apporte une compréhension des principales fonctions qu'elle exerce dans la cellule.

La diversité des interactions protéine-protéine dans la littérature est importante (Nooren and Thornton, 2003). Une des principales distinctions est faite sur la base du temps de vie du complexe protéique, ce qui se traduit par la formation de complexes protéiques permanents ou transitoires. Les interactions protéine-protéine permanentes sont des interactions très stables, fortes, irréversibles et ne vont exister que sous la forme de complexe. A contrario, les interactions transitoires ont la possibilité de subir des changements rapides au sein de l'oligomère. Elles sont temporaires avec la possibilité de s'associer ou se dissocier et demandent un certain nombre de conditions pour promouvoir l'interaction, telle que des phosphorylations, des changements de conformation ou une localisation spécifique au sein de la cellule. Ce groupe d'interactions a été subdivisé en deux catégories : les interactions transitoires faibles et fortes. Les complexes transitoires faibles désignent un équilibre oligomérique dynamique *in vivo* en solution, avec les interactions qui se forment et se rompent en continu. Contrairement aux complexes transitoires forts qui changent d'état uniquement lors d'un déclenchement, par exemple par la fixation d'un ligand (Nooren and Thornton, 2003; Perkins et al.). Les interactions protéine-protéine transitoires peuvent être impliquées dans le recrutement et l'assemblage de complexes de transcription au niveau de

leurs promoteurs, le transport de protéines à travers les membranes, le repliement des protéines natives catalysé par les protéines chaperonnes ou encore l'assemblage et désassemblage de structures subcellulaires durant le cycle cellulaire

4.2/ Méthodes de détection d'interactions protéine-protéine

L'identification et la caractérisation des interactions protéiques sont un enjeu important pour la compréhension des processus cellulaires. Cependant les méthodes de purification varient d'une protéine à l'autre, du fait des propriétés intrinsèques de chaque protéine et de la stabilité des complexes (Deutscher, 1990), ce qui rend impossible la mise au point d'une technique universelle. C'est pourquoi un grand nombre de méthodes génériques de détection d'interaction entre protéines ont été mises au point *in vivo* et *in vitro*.

4.2.1/ Un exemple d'approche génomique pour l'identification d'interactions protéine-protéine *in vitro* : la purification par affinité en tandem

Les techniques classiques pour la détection d'interactions protéiques *in vitro* sont l'immunoprécipitation et la précipitation de complexes connue sous le nom de *pull down*. Ces techniques, basées sur la purification par affinité de protéines appâts, ont été améliorées pour les applications en protéomique par une méthode appelée purification par affinité en tandem (*tandem affinity purification*, TAP) (Puig et al., 2001; Rigaut et al., 1999). Elle consiste en une purification en deux étapes (permettant d'éliminer un grand nombre de contaminant) d'une protéine chimérique, exprimée avec une étiquette, dans ses conditions natives. Ces étapes de purification peuvent être combinées avec une analyse par

spectrométrie de masse afin d'identifier les constituants du complexe. La première étiquette TAP mise au point consiste en deux domaines de fixation à l'anticorps IgG de la protéine A (ProA) de *Staphylococcus aureus* suivie d'un peptide se liant à la calmoduline (CBP), séparés par un site de clivage par la protéase TEV. La première étape de purification se déroule grâce une forte liaison de la ProtA à une résine constituée avec des IgG. Le matériel retenu est par la suite élué grâce à l'action de la protéase TEV puis mis en contact avec une résine contenant de la calmoduline. Cette deuxième étape de purification est réalisée en présence de calcium pour permettre l'interaction entre l'étiquette et la résine, cette étape permet d'éliminer un maximum de contaminants. La libération du complexe protéique survient grâce au pouvoir chélatant de l'EGTA pour les ions calcium. Sur le même principe d'autres étiquettes ont vu le jour comme l'étiquette SPA (Zeghouf et al., 2004). Un certain nombre d'avantages accompagne ces méthodes. La capture de complexes protéiques peut être réalisée après expression de la protéine d'intérêt étiquetée à son niveau naturel (ex. exprimées sous contrôle de son promoteur endogène) car une quantité relativement réduite de matériel peut être utilisée. Aucune connaissances particulières sur la composition, l'activité ou encore la fonction du complexe n'est requise. Seule la protéine appât est génétiquement modifiée par l'addition de l'étiquette d'affinité tandis que le protéome non modifié constitue la proie. L'étiquette généralement de petite taille (environ 10 kDa) réduit les problèmes de conformation et donc interfère moins avec la fonction de la protéine. La succession de deux étapes de purification apporte une spécificité d'interaction supplémentaire. Enfin, les éluions douces pratiquées (clivage protéolytique par la protéase TEV et compétition avec l'EGTA) permettent de préserver au mieux les conditions d'expression physiologiques des protéines et d'isoler des complexes natifs. Parmi les points faibles de cette technique on notera que la détection des interactions ou complexes

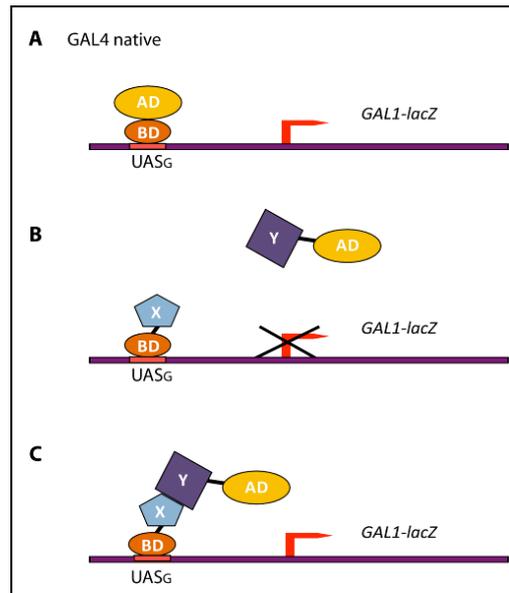
transitoires n'est pas réalisable. En effet, la réalisation des deux étapes augmente la durée de l'expérience, seules des interactions stables pourront « résister » jusqu'à la fin et être détectées. Des alternatives pourraient être l'utilisation d'un agent de liaison pour effectuer un *cross-link* ou la réalisation d'une seule des étapes de purification.

4.2.2/ Un exemple d'approche génomique pour l'identification d'interactions protéine-protéine *in vivo* : le système double hybride dans la levure

Le système double hybride chez la levure a été développé par Fields et Song en 1989 (Fields and Song, 1989) comme un outil génétique pour étudier des interactions physiques entre protéines en prenant avantage des propriétés de la protéine GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine GAL4 est un activateur transcriptionnel nécessaire pour l'expression de gènes codant pour l'utilisation du galactose (Johnston, 1987). Cet activateur transcriptionnel est constitué de deux domaines distincts et de fonctions essentielles. Un domaine N-terminal qui se fixe spécifiquement à des séquences d'ADN (UAS_G *upstream activation sequences*) et un domaine C-terminal, comportant des régions acides, qui est nécessaire pour activer la transcription. Le principe de ce système repose sur la possibilité de scinder l'activité du facteur de transcription GAL4 et de fusionner chacun des domaines à une protéine d'intérêt, créant ainsi deux protéines hybrides. C'est la formation d'un complexe protéine-protéine qui va rétablir la proximité des domaines permettant la reconstitution du facteur de transcription fonctionnel et ainsi la transcription des gènes régulés par UAS_G peut avoir lieu (**Figure 11**).

Figure 11. Activation de la transcription des gènes rapporteurs par reconstitution de l'activité de la GAL4 dans le système double hybride :

A, la protéine native GAL4 est constituée d'un domaine de fixation à l'ADN (BD) et d'une région activatrice (AD), qui vont induire la transcription de GAL1-lacZ. **B**, les protéines X et Y sont respectivement fusionnées avec le BD et AD. En absence d'interaction entre X et Y, la GAL4 ne peut pas se reconstituer et le gène rapporteur n'est pas exprimé. **C**, Une interaction protéine-protéine entre les protéines X et Y rapproche les domaines de la GAL4 ce qui rétablit l'activité transcriptionnelle.



Quelques inconvénients sont à noter pour cette méthode de double hybride chez la levure comme la présence de faux positifs et de faux négatifs. Néanmoins l'utilisation répandue de cette méthode a conduit à la mise au point de test de spécificité (ex. voir **partie I.2.2**). Les interactions protéiques doivent se dérouler dans le noyau de la levure limitant la détection d'interaction avec des protéines ancrées ou intégrées à la membrane. Les avantages de ce système double hybride chez la levure sont nombreux et son efficacité n'est plus à prouver. Un des avantages de cette méthode est la possibilité de rechercher des interactions protéiques dans tout le génome de l'organisme d'intérêt grâce à des criblages de banque protéique (James et al., 1996). Des banques d'ADN génomiques peuvent être construites à partir de fragments génomiques couplées avec l'AD de la GAL4. Ainsi, un grand nombre de données d'interaction protéique binaire ont été générées par ce procédé pour plusieurs espèces. L'étude des interactomes par la méthode de double hybride a été menée entre autre chez des virus (Flajolet et al., 2000; Guo et al., 2001; McCraith et al., 2000), des parasites tel que *Plasmodium falciparum* (LaCount et al., 2005), des bactéries pathogènes telle que

Helicobacter pylori (Rain et al., 2001), la drosophile (Giot et al., 2003) et plus récemment chez l'homme (LaCount et al., 2005; Rual et al., 2005; Stelzl et al., 2005).

5/ Les objectifs de cette thèse

Jusqu'à présent seul un très petit nombre de protéines interagissant avec MreB et ses paralogues est connu chez *B. subtilis* (Carballido-López et al., 2006; Defeu Soufo and Graumann, 2006; Defeu Soufo et al., 2010; Kawai et al., 2009b). Les protéines MreB doivent être connectées à d'autres protéines ainsi qu'à des complexes protéiques pouvant servir soit « d'interface » entre le cytosquelette et d'autres réseaux cellulaires, soit être directement responsable des fonctions du cytosquelette. De même, une de nos hypothèses de travail est que les complexes macromoléculaires formés par les protéines déterminant la forme cellulaire et la machinerie de synthèse et/ou de dégradation de la paroi existent dans la cellule et seraient dirigés par le cytosquelette. Un de nos objectifs majeurs est l'identification des protéines interagissant avec les protéines MreB qui seraient en mouvement et/ou positionnées par les filaments des homologues de l'actine. Comment les protéines MreB agissent-elles dans le contrôle de la forme cellulaire ? Comment contrôlent-elles la topologie de synthèse du peptidoglycane ? Quels sont les mécanismes d'action et les protéines effectrices impliqués ? Existe-t-il un lien avec d'autres processus du cycle cellulaire ?

L'objectif de cette thèse est de tenter de répondre à ces questions par une combinaison d'approches génétiques, génomiques, bioinformatiques, biochimiques et cytologiques (notamment par l'utilisation de la microscopie électronique et à épifluorescence). Ce travail de thèse se présente en trois parties. Tout d'abord, nous allons présenter, dans la **partie I**, la mise en œuvre des approches génomiques en vue d'identifier des interactions protéiques avec les protéines MreBs de *B. subtilis*, suivie d'une approche exploratrice réalisée pour la sélection d'une seule interaction à caractériser. C'est donc la caractérisation d'une seule interaction protéine-protéine qui est présentée dans la **partie II**, qui pour finir s'en suit dans la **partie III** d'un élargissement des connaissances de l'environnement fonctionnel de la protéine candidate et du rôle potentiel de son interaction avec le cytosquelette MreB.

Résultats

Partie I : Construction d'un réseau d'interactions protéine-protéine centré sur le cytosquelette d'actine chez *Bacillus subtilis*.

“Social network is a social structure made up of individuals, which are tied by one or more specific types of interdependency, such as friendship, kinship, common interest, financial exchange, dislike, sexual relationships or relationships of beliefs, knowledge or prestige”
Wikipedia

Partie I : Construction d'un réseau d'interactions protéine-protéine centré sur le cytosquelette d'actine chez *Bacillus subtilis*

I.1/ Introduction

Les interactions protéiques sont au cœur des processus cellulaires. La caractérisation des partenaires protéiques permet de comprendre les mécanismes d'action et/ou de trouver de nouvelles fonctions aux protéines. En effet, la construction de réseaux protéiques permet d'intégrer une protéine cible dans le contexte biologique de la protéine interagissant avec elle et peut ainsi mettre en évidence une nouvelle fonction. Le cytosquelette est un complexe protéique très important au sein d'une cellule. Étudié depuis longtemps chez les eucaryotes, il est au centre de nombreux processus cellulaires comme la division, la ségrégation, la morphogénèse, ou le transport intracellulaire... . Chez les bactéries, des homologues de l'actine, de la tubuline et des filaments intermédiaires ont été mis en évidence, mais ces découvertes sont récentes et la connaissance du cytosquelette bactérien est encore restreinte. Notamment, des partenaires protéiques restent à identifier en vue d'ajouter de nouvelles fonctions au cytosquelette bactérien. Ces partenaires peuvent aussi fournir des informations sur les mécanismes impliqués dans les fonctions déjà connues ou encore, par analogie avec les protéines associées aux actines eucaryotes (ABP : *actin binding proteins*), l'identification de partenariat peut mettre en évidence des protéines effectrices de ces fonctions, des adaptateurs ou des fixateurs des polymères. Jusqu'à présent seul un très petit nombre de protéines interagissant avec les homologues de l'actine de *B. subtilis* est connu (Carballido-López et al., 2006; Kawai et al., 2009a). Les protéines de type MreB doivent être connectées à d'autres protéines ainsi qu'à des complexes protéiques

pouvant servir, soit « d'interface » entre le cytosquelette et d'autres réseaux cellulaires, soit être directement responsables des fonctions du cytosquelette.

Dans cet effort d'élargissement des connaissances du cytosquelette d'actine bactérien, nous avons cherché à identifier des partenaires protéiques des trois homologues de *B. subtilis*, MreB, Mbl et MreBH. Un réseau préliminaire d'interactions protéiques avait déjà été construit au laboratoire par une approche génomique de double hybride chez la levure (Y2H) (R. Carballido-López, non publié). La caractérisation du rôle biologique d'une de ces interactions avait permis d'élucider le rôle de MreBH dans la morphogénèse (Carballido-Lopez et al., 2006).

Dans cette première partie nous allons présenter l'élargissement du réseau existant d'interaction protéine-protéine centré sur les trois homologues de l'actine de *B. subtilis*. Dans un premier temps, l'identification de nouveaux partenaires protéiques par de nouveaux criblages Y2H va être décrite. Le « réseau cytosquelette » qui en découle, fait ressortir des liens avec des protéines de fonctions inconnues et de catégories fonctionnelles variées. Dans un deuxième temps, nous allons développer l'approche exploratrice réalisée et nécessaire pour l'orientation du travail vers une caractérisation détaillée d'une des interactions protéine-protéine.

I.2/ Résultats issus des criblages des banques génomiques de *B. subtilis*

Un réseau « cytosquelette » initial a été réalisé par Rut Carballido-López (communications internes) par criblage génomique de souches contenant les gènes *mreB*, *mbl* et *mreBH* entiers fusionnés au BD (*GAL4 Binding domain*) (BD-MreB, BD-Mbl et BD-MreBH) (**Figure 12**). Cependant, ces protéines de fusions n'ont pas fait apparaître d'auto-interaction

(exemples MreB-MreB, Mbl-Mbl ou MreBH-MreBH) c'est pourquoi de nouveaux clonages ont été réalisés ainsi que la construction de fusion des domaines N- et C-terminaux de chacune des protéines. Il a été remarqué au sein de l'équipe de Philippe Noirot que la fragmentation des protéines en domaines fusionnés au BD permet d'augmenter le nombre de partenaires protéiques. C'est donc ce second lot de constructions qui a été utilisé au cours de cette étude, comme détaillé ci-dessous.

I.2.1/ Les conditions expérimentales

Les gènes entiers, ainsi que des fragments chevauchants N- et C-terminaux des protéines MreB, Mbl et MreBH de *B. subtilis* ont été clonés dans le plasmide pGBDU (Ura+), à l'extrémité C-terminale du domaine de liaison à l'ADN (BD) de l'activateur transcriptionnel GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tableau 3**).

Tableau 3. Récapitulatif des plasmides codant pour les protéines « appâts » utilisées pour le double hybride :

Constructions de Rut Carballido-López par « GAP repair » dans le plasmide pGBDU digéré par EcoRI et Sall et transformé dans la souche PJ69-4a. La sélection des cellules transformées se fait grâce à la présence d'un marqueur Uracile sur le plasmide. Deux clones ont été récupérés dans chaque clonage afin de constituer deux lots indépendants.

Plasmide et nom du gène cloné	Taille du fragment/taillle du gène (aa)
pGBDU-<i>mreB</i>	1-337/337
pGBDU-<i>mreB</i>-Nter	1-203/337
pGBDU-<i>mreB</i>-Cter	152-337/337
pGBDU-<i>mbl</i>-Nter	1-196/333
pGBDU-<i>mbl</i>-Cter	144-333/333
pGBDU-<i>mreBH</i>-Nter	1-179/335
pGBDU-<i>mreBH</i>-Cter	145-335/335

Ces fusions codant pour des protéines hybrides ont été exprimées comme *appât* chez la levure est utilisée pour cribler trois banques aléatoires génomiques de *B. subtilis*, BSL (*B. subtilis genomic libraries*) nommées : BSL-C1, BSL-C2 et BSL-C3 (James *et al.*, 1996,

Noirot-Gros *et al.*, 2002). Ces banques ont été clonées dans le plasmide pGAD (Leu+), fusionnées au domaine d'activation (AD) de la transcription de la GAL4 et sont exprimées comme *proie*. Les levures haploïdes, PJ69-4 α et PJ69-4a ont été transformées respectivement par les vecteurs dérivés du pGBDU et pGAD (**Figures 12 et 13**). Les cellules sont alors croisées dans le but d'obtenir des cellules diploïdes contenant les deux plasmides dérivés (Ura⁺ Leu⁺) et pouvant exprimer les protéines hybrides *appât* et *proie*. Une interaction entre la protéine du cytosquelette (protéine *appât*) et une des protéines de *B. subtilis* (protéine *proie*), permet le rapprochement des deux domaines (BD et AD) de la GAL4.

L'activité du facteur de transcription GAL4 est alors rétablie, ce qui permet l'expression des gènes rapporteurs sous son contrôle. Dans notre système les gènes rapporteurs sont : *his3*, *ade2* et *lacZ* (**Figure 13**) sous le contrôle des promoteurs respectifs pGal1, pGal2 et pGal7. La sélection des interactions est promue sur des milieux synthétiques dépourvus d'histidine ou d'adénine. Du 3 amino-triazole (3-AT), un inhibiteur compétitif de l'enzyme His3 impliquée dans la biosynthèse de l'histidine, a été ajouté dans le milieu de sélection ne contenant pas d'histidine permettant d'augmenter la stringence de la sélection et par conséquent d'éliminer les faux positifs. Parmi les candidats isolés, la séquence codant pour le peptide *proie* est amplifiée par PCR puis séquencée et identifiée par comparaison de séquence avec le génome de *B. subtilis*.

On peut noter l'obtention de deux types de candidats pour l'interaction. Premièrement, plusieurs fragments différents, le plus souvent chevauchant, qui codent pour une même protéine peuvent être identifiés. Ceci confère une robustesse à l'interaction et favorise une meilleure compréhension du domaine minimal de la protéine *proie* impliquée dans l'interaction (**Figure 17**).

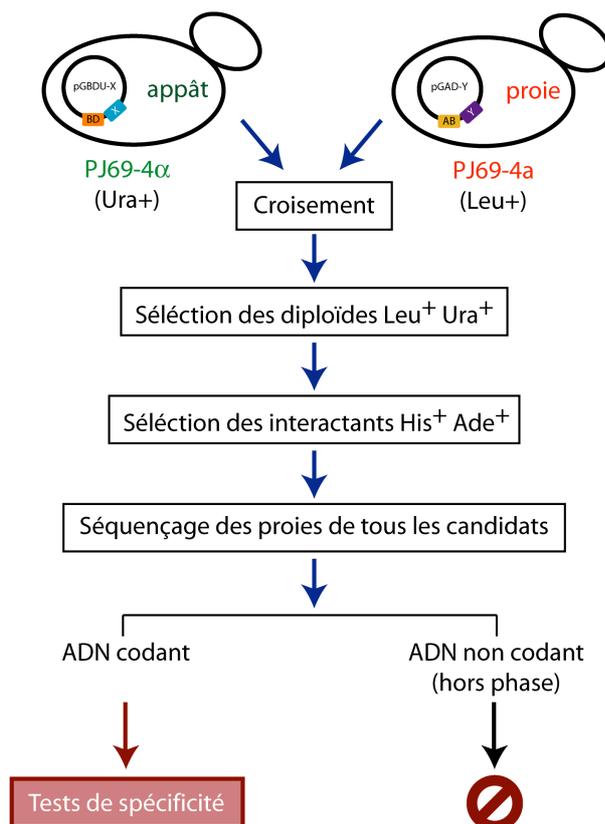


Figure 12. Stratégie de construction du réseau d'interaction centré sur le cytosquelette des homologues de l'actine de *B. subtilis*

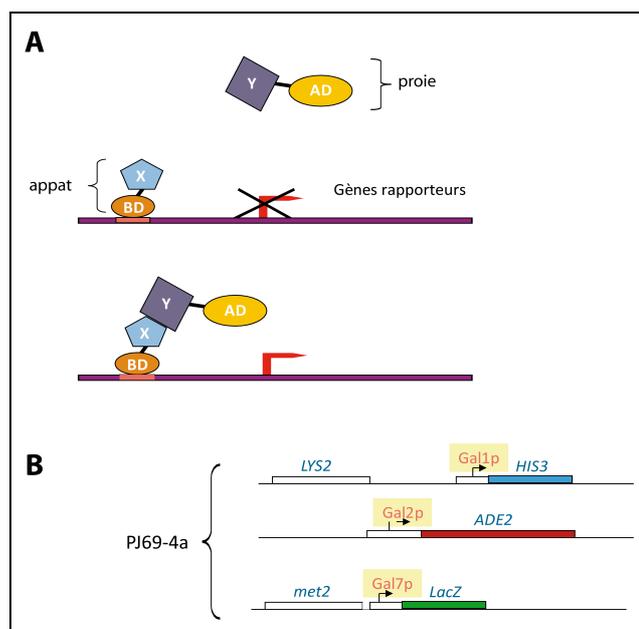
Pour les explications, voir dans le texte ci-dessus.

Figure 13. Représentation du système double hybride chez la levure :

L'interaction entre la protéine X et Y permet la reconstitution de la protéine GAL4 formée de deux domaines : un domaine d'activation (AD) et un domaine de liaison à l'ADN (BD),

A. GAL4 va activer la transcription des gènes rapporteurs. Ce système comporte 3 gènes rapporteurs différents codant pour de l'histidine, de l'adénine et la β -galactosidase,

B.



Deuxièmement, une ORF (*open reading frame*) unique codant pour une protéine ou un fragment protéique peut être identifié. Dans ce cas la probabilité de spécificité de l'interaction est faible et on ne peut omettre le risque de faux positifs.

Les faux positifs apparaissent avec des phénotypes d'interaction de manière indépendante à une interaction entre la protéine ou peptide *proie* et la protéine *appât*. Pour parer à ces difficultés, une étape de vérification systématique et drastique de la spécificité des interactions obtenues a été réalisée, communément appelée, tests de spécificité.

I.2.2/ Les tests de spécificité

Les tests de spécificité sont pratiqués en vue d'éliminer les faux positifs et de valider une interaction entre deux protéines. Plusieurs raisons peuvent être à l'origine d'une fausse détection d'interaction (Cusick et al., 2005). En exemple, la présence de mutations au sein du chromosome de la levure ou encore au niveau des séquences codant la protéine *appât*. Nous pouvons également suspecter une interaction sans sens biologique entre la protéine *appât* et l'AD ou à l'inverse, entre la protéine *proie* et le BD qui conduisent à la reconstitution de l'activité GAL4. Dans ces deux cas c'est une auto-activation.

Les tests de spécificité ont trois objectifs principaux : (i) Vérifier la reproductibilité de l'interaction grâce à un croisement direct entre le peptide *proie* isolé et l'*appât* initialement utilisé pour cribler la banque, (ii) Vérifier l'absence d'une auto-activation en croisant les protéines *proies* avec le vecteur pGBDU vide, (iii) Examiner que le fragment protéique récupéré ne soit pas « collant », c'est-à-dire qu'il n'interagit pas de façon non spécifique avec n'importe quelle protéine (**Figure 14**).

Ainsi, le fragment du gène codant la protéine *proie* isolée pendant le criblage est transféré dans un nouveau plasmide pGAD n'ayant jamais été en contact avec la sélection et transformé dans une nouvelle levure PJ69-4 α , afin de s'affranchir de potentielles mutations chromosomiques. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de *GAP repair* (voir *Matériels et Méthodes*), ce qui permet de récupérer et de transformer dans de nouvelles levures tous les fragments codant pour les protéines ou peptides candidats. Les levures haploïdes obtenues ont été déposées en plaque pour un croisement direct avec les levures contenant les protéines *appâts* d'intérêt (test de reproductivité), le vecteur vide (test d'auto-activation) et des protéines *appâts* de natures différentes (test de spécificité) (**Figure 14**).

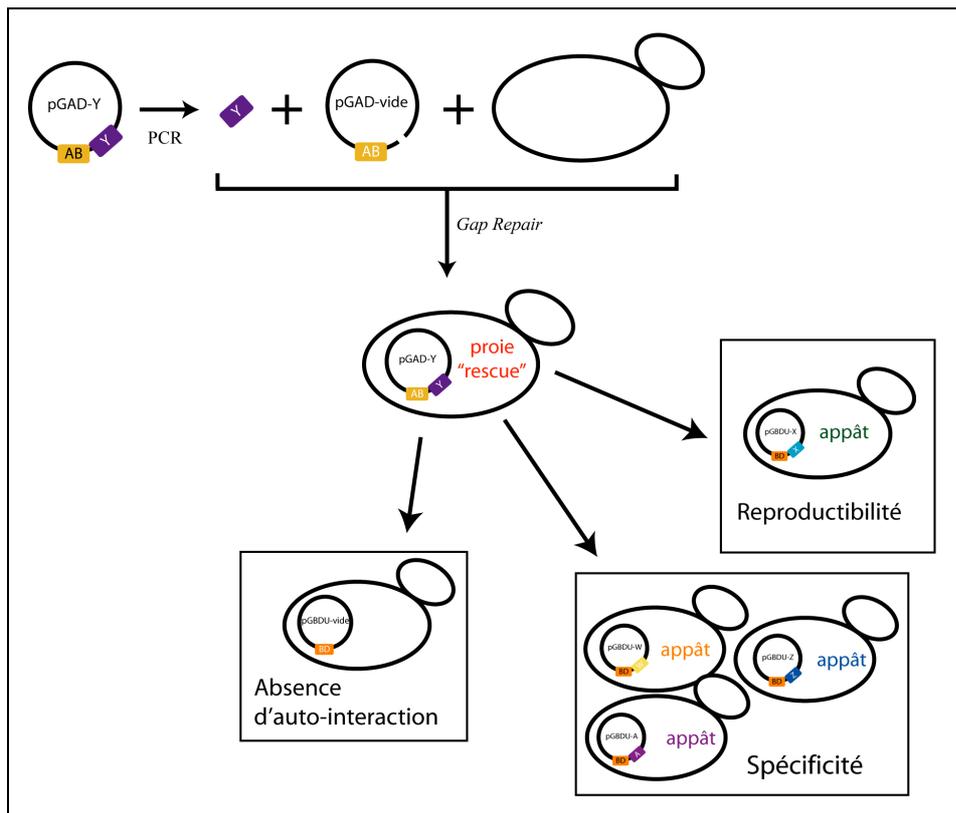


Figure 14. Principe du test de spécificité du système double hybride chez la levure :

Pour les explications, voir dans le texte ci-dessus.

I.2.3/ Les criblages génomiques en chiffres

Lors du clonage des ORFs des protéines MreB dans les pGBDU, deux lots indépendants de transformants ont été isolés pour chaque clonage. L'identification de partenaires protéiques n'étant pas exhaustive dans ces cribles génomiques, la recherche d'interactants fut réalisée en parallèle sur les deux lots indépendants (sauf pour le domaine C-terminal de MreBH), afin de dupliquer les manipulations (**Tableau 3**). Au total, 13 criblages indépendants ont été réalisés. Ceux-ci ont abouti à 1470 candidats positifs. Suite au séquençage et à l'analyse de tous les candidats, 268 partenaires potentiels qui expriment des fragments codants en phase avec la protéine de fusion ont été identifiés et seulement 182 ont été soumis aux tests de spécificité en raison de la redondance de certains fragments. Les tests de spécificité étant réalisés en double, ce sont donc 364 tests qui ont été effectués. Pour cela, 116 des partenaires potentiels ont été isolés et (re-)clonés dans de nouveaux vecteurs pGAD et transformés dans une nouvelle levure PJ69-4 α (**Figure 14**). Les 66 partenaires potentiels restants ont été récupérés dans la collection de souches de levure du laboratoire. Tous les partenaires potentiels ont été croisés, non seulement avec la protéine MreB ayant permis son identification durant le crible contre la banque génomique, mais aussi avec les deux autres isoformes MreB de *B. subtilis*. Au final, 2 912 croisements ont été réalisés, lesquels ont fait ressortir 9 nouvelles interactions spécifiques impliquant 8 protéines (**Figure 15**). Les résultats des tests de spécificité représentent 5% du total d'interactions potentielles issues des cribles avant les tests de spécificité. On constate que ce pourcentage est plus faible que ce qui est « habituellement » obtenu au laboratoire dans nos tests de spécificité Y2H. En effet, il a été établi qu'en moyenne 20% des interactions potentielles s'avèrent spécifiques.

La méthode de double hybride chez la levure est un outil puissant pour une détection d'interactions à haut débit. Mais cette méthode n'est pas exhaustive, certaines interactions qui pouvait être attendues (exemple, Mbl-Mbl, MreBH-MreBH, Mbl-MreBH, etc...) n'ont pas été détectées. Nous pouvons expliquer cette hétérogénéité de résultats par une ou plusieurs raisons liées à la préparation des banques génomiques de *B. subtilis* (James et al., 1996). Certains gènes peuvent être sous-représentés voir même absent de la banque. La fusion à l'AD peut engendrer une conformation spatiale différente de la conformation fonctionnelle, qui empêcherait une éventuelle interaction. Il ne faut pas oublier que se sont des protéines bactériennes que nous exprimons dans un organisme eucaryote, d'où une possibilité de toxicité pour la cellule lors de l'expression de certaines protéines de fusions. A noter également que l'interaction protéique suivie de l'activation de la GAL4 a lieu dans

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abhayawardhane, Y., and Stewart, G.C. (1995). *Bacillus subtilis* possesses a second determinant with extensive sequence similarity to the *Escherichia coli* *mreB* morphogene. *Journal of bacteriology* *177*, 765-773.
- Adams, D.W., and Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* *7*, 642-653.
- Addinall, S.G., and Lutkenhaus, J. (1996). FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *Journal of bacteriology* *178*, 7167-7172.
- Agranoff, D., Monahan, I.M., Mangan, J.A., Butcher, P.D., and Krishna, S. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *The Journal of experimental medicine* *190*, 717-724.
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961). Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. *Journal of bacteriology* *81*, 741-746.
- Anand, S.P., Akhtar, P., Tinsley, E., Watkins, S.C., and Khan, S.A. (2008). GTP-dependent polymerization of the tubulin-like RepX replication protein encoded by the pXO1 plasmid of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* *67*, 881-890.
- Atrih, A., Bacher, G., Allmaier, G., Williamson, M.P., and Foster, S.J. (1999). Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation. *Journal of bacteriology* *181*, 3956-3966.
- Ausmees, N., Kuhn, J.R., and Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* *115*, 705-713.
- Aylett, C.H., Wang, Q., Michie, K.A., Amos, L.A., and Lowe, J. (2010). Filament structure of bacterial tubulin homologue TubZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 19766-19771.
- Aymerich, S., and Steinmetz, M. (1987). Cloning and preliminary characterization of the *sacS* locus from *Bacillus subtilis* which controls the regulation of the exoenzyme levansucrase. *Mol Gen Genet* *208*, 114-120.
- Aymerich, S., and Steinmetz, M. (1992). Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/Sacy family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 10410-10414.
- Bagchi, S., Tomenius, H., Belova, L.M., and Ausmees, N. (2008). Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* *70*, 1037-1050.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C., *et al.* (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* *155*, 1758-1775.
- Barral, J.M., Hutagalung, A.H., Brinker, A., Hartl, F.U., and Epstein, H.F. (2002). Role of the myosin assembly protein UNC-45 as a molecular chaperone for myosin. *Science (New York, NY)* *295*, 669-671.
- Beaman, T.W., Vogel, K.W., Drueckhammer, D.G., Blanchard, J.S., and Roderick, S.L. (2002). Acyl group specificity at the active site of tetrahydridipicolinate N-succinyltransferase. *Protein Sci* *11*, 974-979.
- Bean, G.J., and Amann, K.J. (2008). Polymerization properties of the *Thermotoga maritima* actin MreB: roles of temperature, nucleotides, and ions. *Biochemistry* *47*, 826-835.
- Becker, E., Herrera, N.C., Gunderson, F.Q., Derman, A.I., Dance, A.L., Sims, J., Larsen, R.A., and Pogliano, J. (2006). DNA segregation by the bacterial actin Alfa during *Bacillus subtilis* growth and development. *Embo J* *25*, 5919-5931.

- Berger, B.J., English, S., Chan, G., and Knodel, M.H. (2003). Methionine regeneration and aminotransferases in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology* *185*, 2418-2431.
- Berkmen, M.B., Lee, C.A., Loveday, E.K., and Grossman, A.D. (2010). Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* *192*, 38-45.
- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A., and Elofsson, A. (2009). TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic acids research* *37*, W465-468.
- Bhavsar, A.P., and Brown, E.D. (2006). Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Mol Microbiol* *60*, 1077-1090.
- Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1993). Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *Journal of bacteriology* *175*, 1118-1125.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* *354*, 161-164.
- Blatch, G.L., and Lassel, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* *21*, 932-939.
- Bongers, R.S., Veening, J.W., Van Wieringen, M., Kuipers, O.P., and Kleerebezem, M. (2005). Development and characterization of a subtilin-regulated expression system in *Bacillus subtilis*: strict control of gene expression by addition of subtilin. *Appl Environ Microbiol* *71*, 8818-8824.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 7290-7294.
- Bouet, J.Y., and Funnell, B.E. (1999). P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *Embo J* *18*, 1415-1424.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D., and Mengin-Lecreux, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 208-233.
- Branstrom, A.A., Midha, S., Longley, C.B., Han, K., Baizman, E.R., and Axelrod, H.R. (2000). Assay for identification of inhibitors for bacterial MraY translocase or MurG transferase. *Anal Biochem* *280*, 315-319.
- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., and Kolter, R. (1995). MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *177*, 4194-4197.
- Bugg, T.D., and Walsh, C.T. (1992). Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat Prod Rep* *9*, 199-215.
- Burkholder, P.R., and Giles, N.H., Jr. (1947). Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* *34*, 345-348.
- Butcher, B.G., and Helmann, J.D. (2006). Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Mol Microbiol* *60*, 765-782.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., *et al.* (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* *433*, 531-537.
- Cabeen, M.T., Charbon, G., Vollmer, W., Born, P., Ausmees, N., Weibel, D.B., and Jacobs-Wagner, C. (2009). Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth. *Embo J* *28*, 1208-1219.

- Cabeen, M.T., and Jacobs-Wagner, C. (2010). The bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Genet* 44, 365-392.
- Calamita, H.G., Ehringer, W.D., Koch, A.L., and Doyle, R.J. (2001). Evidence that the cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15260-15263.
- Cano, R.J., and Borucki, M.K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268, 1060-1064.
- Carballido-López, R. (2006). The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 888-909.
- Carballido-López, R., and Errington, J. (2003). A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13, 577-583.
- Carballido-López, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P., and Errington, J. (2006). Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell* 11, 399-409.
- Carrier, M.F., and Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* 20, 1918-1924.
- Carpousis, A.J. (2002). The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* 30, 150-155.
- Carpousis, A.J., Leroy, A., Vanzo, N., and Khemici, V. (2001). *Escherichia coli* RNA degradosome. *Methods in enzymology* 342, 333-345.
- Castaing, J.P., Bouet, J.Y., and Lane, D. (2008). F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA. *Mol Microbiol* 70, 1000-1011.
- Charbon, G., Cabeen, M.T., and Jacobs-Wagner, C. (2009). Bacterial intermediate filaments: in vivo assembly, organization, and dynamics of crescentin. *Genes Dev* 23, 1131-1144.
- Chen, N.Y., Jiang, S.Q., Klein, D.A., and Paulus, H. (1993). Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. *J Biol Chem* 268, 9448-9465.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (2008). In vitro assembly studies of FtsZ/tubulin-like proteins (TubZ) from *Bacillus* plasmids: evidence for a capping mechanism. *J Biol Chem* 283, 8102-8109.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 68, 1029-1046.
- Commichau, F.M., Rothe, F.M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Volker, U., and Stulke, J. (2009). Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics* 8, 1350-1360.
- Cooper, J.A., and Schafer, D.A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 12, 97-103.
- Cordell, S.C., and Lowe, J. (2001). Crystal structure of the bacterial cell division regulator MinD. *FEBS Lett* 492, 160-165.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Coulombe, P.A., and Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6, 699-706.

- Cowles, K.N., and Gitai, Z. (2010). Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* *76*, 1411-1426.
- Cusick, M.E., Klitgord, N., Vidal, M., and Hill, D.E. (2005). Interactome: gateway into systems biology. *Human molecular genetics 14 Spec No. 2*, R171-181.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends in biochemical sciences* *28*, 655-662.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* *113*, 767-776.
- de Boer, P., Crossley, R., and Rothfield, L. (1992a). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* *359*, 254-256.
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., and Rothfield, L.I. (1989). A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* *56*, 641-649.
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., and Rothfield, L.I. (1992b). Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *174*, 63-70.
- Defeu Soufo, H.J., and Graumann, P.L. (2004). Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep* *5*, 789-794.
- Defeu Soufo, H.J., and Graumann, P.L. (2006). Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Mol Microbiol* *62*, 1340-1356.
- Defeu Soufo, H.J., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J., and Graumann, P.L. (2010). Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 3163-3168.
- Derman, A.I., Becker, E.C., Truong, B.D., Fujioka, A., Tucey, T.M., Erb, M.L., Patterson, P.C., and Pogliano, J. (2009). Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Mol Microbiol* *73*, 534-552.
- Dervyn, E., Noirot-Gros, M.F., Mervelet, P., McGovern, S., Ehrlich, S.D., Polard, P., and Noirot, P. (2004). The bacterial condensin/cohesin-like protein complex acts in DNA repair and regulation of gene expression. *Mol Microbiol* *51*, 1629-1640.
- Descoteaux, A., and Drapeau, G.R. (1987). Regulation of cell division in *Escherichia coli* K-12: probable interactions among proteins FtsQ, FtsA, and FtsZ. *Journal of bacteriology* *169*, 1938-1942.
- Deutscher, M.P. (1990). Maintaining protein stability. *Methods Enzymol* *182*, 83-89.
- Deutscher, M.P., and Reuven, N.B. (1991). Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 3277-3280.
- Divakaruni, A.V., Baida, C., White, C.L., and Gober, J.W. (2007). The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol* *66*, 174-188.
- Doi, M., Wachi, M., Ishino, F., Tomioka, S., Ito, M., Sakagami, Y., Suzuki, A., and Matsubashi, M. (1988). Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology* *170*, 4619-4624.

- Donachie, W.D., Begg, K.J., Lutkenhaus, J.F., Salmond, G.P., Martinez-Salas, E., and Vincente, M. (1979). Role of the *ftsA* gene product in control of *Escherichia coli* cell division. *Journal of bacteriology* *140*, 388-394.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* *83*, 433-473.
- Drew, D.A., Osborn, M.J., and Rothfield, L.I. (2005). A polymerization-depolymerization model that accurately generates the self-sustained oscillatory system involved in bacterial division site placement. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 6114-6118.
- Driks, A. (2002). Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci* *59*, 389-391.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2001). The double *par* locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15078-15083.
- Edwards, D.H., and Errington, J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol* *24*, 905-915.
- Edwards, D.H., Thomaides, H.B., and Errington, J. (2000). Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *Embo J* *19*, 2719-2727.
- Ehlert, K., and Holtje, J.V. (1996). Role of precursor translocation in coordination of murE in and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *178*, 6766-6771.
- Eiamphungporn, W., and Helmann, J.D. (2008). The *Bacillus subtilis* sigma(M) regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Molecular microbiology* *67*, 830-848.
- El Zoeiby, A., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular microbiology* *47*, 1-12.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols* *2*, 953-971.
- Erickson, H.P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* *80*, 367-370.
- Errington, J. (2003). Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat Cell Biol* *5*, 175-178.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., and Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *40*, 115-125.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., and Gober, J.W. (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* *51*, 1321-1332.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L., *et al.* (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* *36*, D281-288.
- Flajolet, M., Rotondo, G., Daviet, L., Bergametti, F., Inchauspe, G., Tiollais, P., Transy, C., and Legrain, P. (2000). A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map. *Gene* *242*, 369-379.
- Formstone, A., and Errington, J. (2005). A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *55*, 1646-1657.

- Foster, S.J., and Popham, D.L. (2002). Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. In *Bacillus subtilis and Closest Relatives: from Genes to Cells*, L. Sonensheim, R. Losick, and J.A. Hoch, eds. (Washington, DC, American Society for Microbiology), pp. 21-41.
- Fouet, A., Arnaud, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1987). *Bacillus subtilis* sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in *Escherichia coli* and homology to enzymes II from enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 8773-8777.
- Foulquier, E., Pompeo, F., Bernadac, A., Espinosa, L., and Galinier, A. (2011). The YvcK protein is required for morphogenesis via localization of PBP1 under gluconeogenic growth conditions in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* *80*, 309-318.
- Fraipont, C., Sapunovic, F., Zervosen, A., Auger, G., Devreese, B., Lioux, T., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., Herdewijn, P., Van Beeumen, J., *et al.* (2006). Glycosyl transferase activity of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1b: specificity profile for the substrate. *Biochemistry* *45*, 4007-4013.
- Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhashi, K., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J. (2008). Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting n-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *The Journal of biological chemistry* *283*, 11117-11125.
- Galili, G. (1995). Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell* *7*, 899-906.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Rivera, C., Mullins, R.D., and Egelman, E.H. (2009). Structural polymorphism of the ParM filament and dynamic instability. *Structure* *17*, 1253-1264.
- Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* *306*, 1021-1025.
- Garti-Levi, S., Hazan, R., Kain, J., Fujita, M., and Ben-Yehuda, S. (2008). The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *69*, 1018-1028.
- Gilvarg, C. (1959). N-Succinyl-L-diaminopimelic acid. *J Biol Chem* *234*, 2955-2959.
- Gilvarg, C. (1961). N-Succinyl-alpha-amino-6-ketopimelic acid. *J Biol Chem* *236*, 1429-1431.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, NY)* *302*, 1727-1736.
- Gitai, Z., Dye, N., and Shapiro, L. (2004). An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8643-8648.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* *62*, 1079-1093.
- Gouveia, S.M., and Akhmanova, A. (2010). Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *International review of cell and molecular biology* *285*, 1-74.
- Graves, L.M., and Switzer, R.L. (1990a). Aspartokinase II from *Bacillus subtilis* is degraded in response to nutrient limitation. *J Biol Chem* *265*, 14947-14955.
- Graves, L.M., and Switzer, R.L. (1990b). Aspartokinase III, a new isozyme in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of bacteriology* *172*, 218-223.
- Guo, D., Rajamaki, M.L., Saarma, M., and Valkonen, J.P. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *The Journal of general virology* *82*, 935-939.

- Han, D., Oh, J., Kim, K., Lim, H., and Kim, Y. (2007). Crystal structure of Yrrb: a TPR protein with an unusual peptide-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 784-790.
- Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14603-14608.
- Helfand, B.T., Chang, L., and Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 117, 133-141.
- Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in microbial physiology* 46, 47-110.
- Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran, C.P., Jr. (1998). Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 28, 235-247.
- Hester, C.M., and Lutkenhaus, J. (2007). Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20326-20331.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-49.
- Holtje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murE sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 62, 181-203.
- Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.
- Hu, Z., and Lutkenhaus, J. (2001). Topological regulation of cell division in *E. coli*. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell* 7, 1337-1343.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J.D. (1999). Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Molecular microbiology* 31, 361-371.
- Hudson, A.O., Bless, C., Macedo, P., Chatterjee, S.P., Singh, B.K., Gilvarg, C., and Leustek, T. (2005). Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. *Biochim Biophys Acta* 1721, 27-36.
- Hudson, A.O., Gilvarg, C., and Leustek, T. (2008). Biochemical and phylogenetic characterization of a novel diaminopimelate biosynthesis pathway in prokaryotes identifies a diverged form of LL-diaminopimelate aminotransferase. *Journal of bacteriology* 190, 3256-3263.
- Hudson, A.O., Singh, B.K., Leustek, T., and Gilvarg, C. (2006). An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol* 140, 292-301.
- Hulett, F.M. (1996). The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 19, 933-939.
- Hulett, F.M., Lee, J., Shi, L., Sun, G., Chesnut, R., Sharkova, E., Duggan, M.F., and Kapp, N. (1994). Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 176, 1348-1358.
- Inoue, S., and Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular biology of the cell* 6, 1619-1640.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 4, 1265-1272.

- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* *144*, 1425-1436.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G., and Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 17049-17054.
- Jensen, R.B., and Gerdes, K. (1997). Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J Mol Biol* *269*, 505-513.
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* *51*, 458-476.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* *104*, 913-922.
- Kalcheva, E.O., Faiziev, M.M., and Malyuta, S.S. (1997). Isolation and comparative analysis of diaminopimelate decarboxylase from *Streptococcus bovis* and *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 34-37.
- Kaushal, B., Paul, S., and Hulett, F.M. (2010). Direct regulation of *Bacillus subtilis* phoPR transcription by transition state regulator ScoC. *Journal of bacteriology* *192*, 3103-3113.
- Kawai, Y., Asai, K., and Errington, J. (2009a). Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *73*, 719-731.
- Kawai, Y., Daniel, R.A., and Errington, J. (2009b). Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol Microbiol* *71*, 1131-1144.
- Kearns, D.B., and Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *49*, 581-590.
- Kobashi, N., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2001). Characterization of aspartate kinase III of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* *65*, 1391-1394.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., *et al.* (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4678-4683.
- Kochhar, S., and Paulus, H. (1996). Lysine-induced premature transcription termination in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* *142 (Pt 7)*, 1635-1639.
- Komeili, A. (2007). Molecular mechanisms of magnetosome formation. *Annu Rev Biochem* *76*, 351-366.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., and Jensen, G.J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* *311*, 242-245.
- Koonin, E.V. (1993). A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol* *229*, 1165-1174.
- Korn, E.D., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* *238*, 638-644.
- Kruse, T., and Gerdes, K. (2005). Bacterial DNA segregation by the actin-like MreB protein. *Trends Cell Biol* *15*, 343-345.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* *390*, 249-256.
- LaCount, D.J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J.R., Schoenfeld, L.W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C., *et al.* (2005). A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* *438*, 103-107.

- Langhorst, M.F., Reuter, A., and Stuermer, C.A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 62, 2228-2240.
- Lara, B., Rico, A.I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., and Massida, O. (2005). Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol Microbiol* 55, 699-711.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev* 21, 1340-1352.
- Leaver, M., Dominguez-Cuevas, P., Coxhead, J.M., Daniel, R.A., and Errington, J. (2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* 457, 849-853.
- Lecoite, F., Serena, C., Velten, M., Costes, A., McGovern, S., Meile, J.C., Errington, J., Ehrlich, S.D., Noirot, P., and Polard, P. (2007). Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *Embo J* 26, 4239-4251.
- Lee, J.C., and Stewart, G.C. (2003). Essential nature of the mreC determinant of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 185, 4490-4498.
- Lenon, G.B., Li, C.G., Xue, C.C., Thien, F.C., and Story, D.F. (2008). Inhibition of inducible nitric oxide production and iNOS protein expression in lipopoLysAccharide-stimulated rat aorta and Raw 264.7 macrophages by ethanol extract of a Chinese herbal medicine formula (RCM-101) for allergic rhinitis. *J Ethnopharmacol* 116, 547-553.
- Leonard, T.A., Butler, P.J., and Lowe, J. (2005a). Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *Embo J* 24, 270-282.
- Leonard, T.A., Moller-Jensen, J., and Lowe, J. (2005b). Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 523-535.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9642-9647.
- Lewis, P.J., and Marston, A.L. (1999). GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 227, 101-110.
- Lindback, T., and Kolsto, A.B. (1999). Characterization of the mbl determinant and cloning of the spoIIID gene from *Bacillus cereus* ATCC 10987. *Current microbiology* 38, 224-227.
- Liu, Y., White, R.H., and Whitman, W.B. (2010). Methanococci use the diaminopimelate aminotransferase (DapL) pathway for lysine biosynthesis. *Journal of bacteriology* 192, 3304-3310.
- Lopez, D., and Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* 24, 1893-1902.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206.
- Luttinger, A., Hahn, J., and Dubnau, D. (1996). Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 19, 343-356.
- Ma, L., King, G.F., and Rothfield, L. (2004). Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the *Escherichia coli* MinD ATPase during division site selection. *Mol Microbiol* 54, 99-108.
- Ma, X., Ehrhardt, D.W., and Margolin, W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12998-13003.

- Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., and Cellier, M.F. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (Mnth) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular microbiology* 35, 1065-1078.
- Manival, X., Yang, Y., Strub, M.P., Kochoyan, M., Steinmetz, M., and Aymerich, S. (1997). From genetic to structural characterization of a new class of RNA-binding domain within the Sacy/BglG family of antiterminator proteins. *The EMBO journal* 16, 5019-5029.
- Marchadier (2009). Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée (Paris XI), pp. 204.
- Marchadier, E., Carballido-Lopez, R., Brinster, S., Fabret, C., Mervelet, P., Bessieres, P., Noiro-Gros, M.F., Fromion, V., and Noiro, P. (2010). An expanded protein-protein interaction network in *Bacillus subtilis* reveals a group of hubs: Exploration by an integrative approach. *Proteomics*.
- Margolin, W., and Long, S.R. (1994). *Rhizobium meliloti* contains a novel second homolog of the cell division gene *ftsZ*. *Journal of bacteriology* 176, 2033-2043.
- Marquardt, J.L., Siegele, D.A., Kolter, R., and Walsh, C.T. (1992). Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *Journal of bacteriology* 174, 5748-5752.
- Matsuzawa, H., Matsushashi, M., Oka, A., and Sugino, Y. (1969). Genetic and biochemical studies on cell wall peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Biochem Biophys Res Commun* 36, 682-689.
- Mayer, J.A., and Amann, K.J. (2009). Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB. *Cell motility and the cytoskeleton* 66, 109-118.
- McCoy, A.J., Adams, N.E., Hudson, A.O., Gilvarg, C., Leustek, T., and Maurelli, A.T. (2006). L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17909-17914.
- McCraith, S., Holtzman, T., Moss, B., and Fields, S. (2000). Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4879-4884.
- Meile, J.C., Wu, L.J., Ehrlich, S.D., Errington, J., and Noiro, P. (2006). Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics* 6, 2135-2146.
- Michaud, C., Parquet, C., Flouret, B., Blanot, D., and van Heijenoort, J. (1990). Revised interpretation of the sequence containing the *murE* gene encoding the UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase of *Escherichia coli*. *Biochem J* 269, 277-278.
- Michie, K.A., and Lowe, J. (2006). Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem* 75, 467-492.
- Misono, H., Togawa, H., Yamamoto, T., and Soda, K. (1976). Occurrence of meso-alpha, epsilon-diaminopimelate dehydrogenase in *Bacillus sphaericus*. *Biochem Biophys Res Commun* 72, 89-93.
- Misono, H., Togawa, H., Yamamoto, T., and Soda, K. (1979). Meso-alpha,epsilon-diaminopimelate D-dehydrogenase: distribution and the reaction product. *Journal of bacteriology* 137, 22-27.
- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., and den Blaauwen, T. (2007). The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 65, 1106-1121.

- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Disteche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *Embo J* *30*, 1425-1432.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. (2003). Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of bacteriology* *185*, 1911-1922.
- Moller-Jensen, J., Jensen, R.B., Lowe, J., and Gerdes, K. (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J* *21*, 3119-3127.
- Morrow, I.C., and Parton, R.G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* *6*, 725-740.
- Mortier-Barriere, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Pietrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., Le Cam, E., *et al.* (2007). A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* *130*, 824-836.
- Muller, J.P., An, Z., Merad, T., Hancock, I.C., and Harwood, C.R. (1997). Influence of *Bacillus subtilis* phor on cell wall anionic polymers. *Microbiology (Reading, England)* *143 (Pt 3)*, 947-956.
- Murat, D., Byrne, M., and Komeili, A. (2010). Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000422.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR *63*, 174-229.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR *67*, 686-723.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering* *10*, 1-6.
- Noirot-Gros, M.F., Dervyn, E., Wu, L.J., Mervelet, P., Errington, J., Ehrlich, S.D., and Noirot, P. (2002). An expanded view of bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 8342-8347.
- Nooren, I.M., and Thornton, J.M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *Embo J* *22*, 3486-3492.
- Orlova, A., Garner, E.C., Galkin, V.E., Heuser, J., Mullins, R.D., and Egelman, E.H. (2007). The structure of bacterial ParM filaments. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 921-926.
- Osteryoung, K.W., and McAndrew, R.S. (2001). The Plastid Division Machine. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* *52*, 315-333.
- Osteryoung, K.W., and Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* *302*, 1698-1704.
- Oussenko, I.A., Abe, T., Ujiie, H., Muto, A., and Bechhofer, D.H. (2005). Participation of 3'-to-5' exoribonucleases in the turnover of *Bacillus subtilis* mRNA. *Journal of bacteriology* *187*, 2758-2767.
- Oussenko, I.A., Sanchez, R., and Bechhofer, D.H. (2004). *Bacillus subtilis* Yhcr, a high-molecular-weight, nonspecific endonuclease with a unique domain structure. *Journal of bacteriology* *186*, 5376-5383.

- Pantaloni, D., Carlier, M.F., Simon, C., and Batelier, G. (1981). Mechanism of tubulin assembly: role of rings in the nucleation process and of associated proteins in the stabilization of microtubules. *Biochemistry* 20, 4709-4716.
- Parry, D.A., and Steinert, P.M. (1992). Intermediate filament structure. *Curr Opin Cell Biol* 4, 94-98.
- Parry, D.A., Strelkov, S.V., Burkhard, P., Aebi, U., and Herrmann, H. (2007). Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res* 313, 2204-2216.
- Paul, S., Birkey, S., Liu, W., and Hulett, F.M. (2004). Autoinduction of *Bacillus subtilis* *phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from *EsigmaA*- and *EsigmaE*-responsive promoters by phosphorylated PhoP. *Journal of bacteriology* 186, 4262-4275.
- Perkins, J.R., Diboun, I., Dessailly, B.H., Lees, J.G., and Orengo, C. (2010). Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* 18, 1233-1243.
- Petit, M.A., Dervyn, E., Rose, M., Entian, K.D., McGovern, S., Ehrlich, S.D., and Bruand, C. (1998). *PcrA* is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol Microbiol* 29, 261-273.
- Pierson, D.E. (1994). Mutations affecting lipopoLysAccharide enhance *ail*-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *Journal of bacteriology* 176, 4043-4051.
- Polka, J.K., Kollman, J.M., Agard, D.A., and Mullins, R.D. (2009). The structure and assembly dynamics of plasmid actin *AlfA* imply a novel mechanism of DNA segregation. *Journal of bacteriology* 191, 6219-6230.
- Pollack, J.H., and Neuhaus, F.C. (1994). Changes in wall teichoic acid during the rod-sphere transition of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of bacteriology* 176, 7252-7259.
- Pollard, T.D. (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* 422, 741-745.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Popp, D., Narita, A., Oda, T., Fujisawa, T., Matsuo, H., Nitani, Y., Iwasa, M., Maeda, K., Onishi, H., and Maeda, Y. (2008). Molecular structure of the *ParM* polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *Embo J* 27, 570-579.
- Pradel, N., Santini, C.L., Bernadac, A., Fukumori, Y., and Wu, L.F. (2006). Biogenesis of actin-like bacterial cytoskeletal filaments destined for positioning prokaryotic magnetic organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17485-17489.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods (San Diego, Calif)* 24, 218-229.
- Qi, Y., Kobayashi, Y., and Hulett, F.M. (1997). The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *Journal of bacteriology* 179, 2534-2539.
- Que, Q., and Helmann, J.D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by *MntR*, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Molecular microbiology* 35, 1454-1468.
- Quentin, Y., Fichant, G., and Denizot, F. (1999). Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol* 287, 467-484.

- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., *et al.* (2001). The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* *409*, 211-215.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* *17*, 1030-1032.
- Rioux, J.B., Philippe, N., Pereira, S., Pignol, D., Wu, L.F., and Ginet, N. (2010). A second actin-like MamK protein in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 encoded outside the genomic magnetosome island. *PLoS One* *5*, e9151.
- Rock, R.S. (2010). Intracellular transport: force controls motor switching at filament junctions. *Curr Biol* *20*, R525-527.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2003). Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res* *31*, 6748-6757.
- Rosner, A., and Paulus, H. (1971). Regulation of aspartokinase in *Bacillus subtilis*. The separation and properties of two isofunctional enzymes. *J Biol Chem* *246*, 2965-2971.
- Roten, C.A., Brandt, C., and Karamata, D. (1991). Genes involved in meso-diaminopimelate synthesis in *Bacillus subtilis*: identification of the gene encoding aspartokinase I. *J Gen Microbiol* *137*, 951-962.
- Rothfield, L., Justice, S., and Garcia-Lara, J. (1999). Bacterial cell division. *Annual review of genetics* *33*, 423-448.
- Rothfield, L.I., and Zhao, C.R. (1996). How do bacteria decide where to divide? *Cell* *84*, 183-186.
- Rowland, S.L., Fu, X., Sayed, M.A., Zhang, Y., Cook, W.R., and Rothfield, L.I. (2000). Membrane redistribution of the *Escherichia coli* MinD protein induced by MinE. *Journal of bacteriology* *182*, 613-619.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., *et al.* (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* *437*, 1173-1178.
- Scheffers, D.J. (2007). The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. In *Bacillus Cellular and Molecular Biology* P. Graumann, ed. (Norfolk NR18 0JA: Caister Academic Press), pp. 331-375.
- Scheffers, D.J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *69*, 585-607.
- Schirner, K., and Errington, J. (2009a). The cell wall regulator σ^I specifically suppresses the lethal phenotype of *mbl* mutants in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* *191*, 1404-1413.
- Schirner, K., and Errington, J. (2009b). Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* *36*, 407-477.
- Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M., and Lowe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 9170-9175.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature* *422*, 746-752.

- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Eggeling, L., and Sahm, H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* *173*, 4510-4516.
- Shaevitz, J.W., and Gitai, Z. (2010). The structure and function of bacterial actin homologs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000364.
- Sheldrick, G.M., Jones, P.G., Kennard, O., Williams, D.H., and Smith, G.A. (1978). Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature* *271*, 223-225.
- Shih, Y.L., Le, T., and Rothfield, L. (2003). Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7865-7870.
- Shimotsu, H., and Henner, D.J. (1986). Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. *Journal of bacteriology* *168*, 380-388.
- Sierro, N., Makita, Y., de Hoon, M., and Nakai, K. (2008). DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic acids research* *36*, D93-96.
- Slovak, P.M., Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2005). Localization of MreB in *Rhodobacter sphaeroides* under conditions causing changes in cell shape and membrane structure. *Journal of bacteriology* *187*, 54-64.
- Smith, R.L., and Maguire, M.E. (1998). Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol* *28*, 217-226.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology (Reading, England)* *146 (Pt 2)*, 249-262.
- Sonenshen, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (2002). *Bacillus subtilis* and its closest relatives from genes to cells (ASM Press).
- Sontag, C.A., Staley, J.T., and Erickson, H.P. (2005). In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. *J Cell Biol* *169*, 233-238.
- Soufo, H.J., and Graumann, P.L. (2003). Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol* *13*, 1916-1920.
- Spizizen, J. (1958). Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *44*, 1072-1078.
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A.O., and Volker, U. (2005). Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)* *151*, 399-420.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., and Aymerich, S. (1989). Induction of saccharolytic enzymes by sucrose in *Bacillus subtilis*: evidence for two partially interchangeable regulatory pathways. *Journal of bacteriology* *171*, 1519-1523.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., *et al.* (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* *122*, 957-968.
- Stewart, G.C. (2005). Taking shape: control of bacterial cell wall biosynthesis. *Mol Microbiol* *57*, 1177-1181.
- Sun, G., Birkey, S.M., and Hulett, F.M. (1996). Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* *19*, 941-948.

- Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2010). Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annual review of biophysics* 39, 539-557.
- Szeto, T.H., Rowland, S.L., Rothfield, L.I., and King, G.F. (2002). Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15693-15698.
- Taghbalout, A., and Rothfield, L. (2007). RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1667-1672.
- Takacs, C.N., Poggio, S., Charbon, G., Pucheault, M., Vollmer, W., and Jacobs-Wagner, C. (2010). MreB drives de novo rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall. *Journal of bacteriology* 192, 1671-1684.
- Taoka, A., Asada, R., Wu, L.F., and Fukumori, Y. (2007). Polymerization of the actin-like protein MamK, which is associated with magnetosomes. *Journal of bacteriology* 189, 8737-8740.
- Thanbichler, M., and Shapiro, L. (2006). MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126, 147-162.
- Tinsley, E., and Khan, S.A. (2006). A novel FtsZ-like protein is involved in replication of the anthrax toxin-encoding pXO1 plasmid in *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology* 188, 2829-2835.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z., and Walker, S. (2006). Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11033-11038.
- Tortosa, P., Declerck, N., Dutartre, H., Lindner, C., Deutscher, J., and Le Coq, D. (2001a). Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and Sacy. *Molecular microbiology* 41, 1381-1393.
- Tortosa, P., and Le Coq, D. (1995). A ribonucleic antiterminator sequence (RAT) and a distant palindrome are both involved in sucrose induction of the *Bacillus subtilis* sacXY regulatory operon. *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 11), 2921-2927.
- Tortosa, P., Logsdon, L., Kraigher, B., Itoh, Y., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D. (2001b). Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of bacteriology* 183, 451-460.
- Tran, L.S., Nagai, T., and Itoh, Y. (2000). Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 37, 1159-1171.
- Uehara, T., and Park, J.T. (2008). Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *Journal of bacteriology* 190, 3914-3922.
- Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 144 (Pt 11), 3097-3104.
- van den Ent, F., Amos, L., and Lowe, J. (2001a). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol* 4, 634-638.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Lowe, J. (2001b). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.
- van den Ent, F., and Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *Embo J* 19, 5300-5307.
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., and Lowe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J* 21, 6935-6943.

- van Dijl, J.M., Braun, P.G., Robinson, C., Quax, W.J., Antelmann, H., Hecker, M., Muller, J., Tjalsma, H., Bron, S., and Jongbloed, J.D. (2002). Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. *J Biotechnol* *98*, 243-254.
- van Heijenoort, J. (1998). Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell Mol Life Sci* *54*, 300-304.
- van Heijenoort, J. (2007). Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *71*, 620-635.
- van Tilbeurgh, H., Manival, X., Aymerich, S., Lhoste, J.M., Dumas, C., and Kochoyan, M. (1997). Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein Sacy of *Bacillus subtilis*. *The EMBO journal* *16*, 5030-5036.
- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes & development* *12*, 2770-2781.
- Varma, A., de Pedro, M.A., and Young, K.D. (2007). FtsZ directs a second mode of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *189*, 5692-5704.
- Vats, P., Shih, Y.L., and Rothfield, L. (2009). Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* *72*, 170-182.
- Vavrova, L., Muchova, K., and Barak, I. (2010). Comparison of different *Bacillus subtilis* expression systems. *Res Microbiol* *161*, 791-797.
- Velasco, A.M., Leguina, J.I., and Lazcano, A. (2002). Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways. *J Mol Evol* *55*, 445-459.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 149-167.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., and Eichenberger, P. (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular biology* *358*, 16-37.
- Wang, W., and Bechhofer, D.H. (1996). Properties of a *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase deletion strain. *Journal of bacteriology* *178*, 2375-2382.
- Warth, A.D., and Strominger, J.L. (1971). Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* *10*, 4349-4358.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 319-346.
- Wehrmann, A., Phillipp, B., Sahm, H., and Eggeling, L. (1998). Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* *180*, 3159-3165.
- Weidel, W., and Pelzer, H. (1964). Bagshaped Macromolecules--a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* *26*, 193-232.
- Weinberger, S., and Gilvarg, C. (1970). Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis. *Journal of bacteriology* *101*, 323-324.
- White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol* *76*, 616-633.
- Widdick, D.A., Eijlander, R.T., van Dijl, J.M., Kuipers, O.P., and Palmer, T. (2008). A facile reporter system for the experimental identification of twin-arginine translocation (Tat) signal peptides from all kingdoms of life. *J Mol Biol* *375*, 595-603.
- Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* *118*, 651-654.

- Yan, K., Pearce, K.H., and Payne, D.J. (2000). A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 387-392.
- Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2004). Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res* 3, 463-468.
- Zhang, J.J., Hu, F.M., Chen, N.Y., and Paulus, H. (1990). Comparison of the three aspartokinase isozymes in *Bacillus subtilis* Marburg and 168. *Journal of bacteriology* 172, 701-708.
- Zhou, H., and 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.
- Zukowski, M.M., Miller, L., Cosgwell, P., Chen, K., Aymerich, S., and Steinmetz, M. (1990). Nucleotide sequence of the *sacS* locus of *Bacillus subtilis* reveals the presence of two regulatory genes. *Gene* 90, 153-155.