

Les glycosyl hydrolases de la famille 12 chez les champignons filamenteux

Olivier Habrylo, Anne Forster et Vincent Phalip

Laboratoire d'enzymologie des interactions plantes / champignons

ESBS - Boulevard Sébastien Brant, 67 412 Illkirch Cedex

Les champignons filamenteux sécrètent un arsenal enzymatique capable de dégrader la paroi végétale. Ces enzymes, nommées sous l'acronyme CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes), présentent une expression dépendante de la source de carbone, une diversité à l'image de la complexité de la paroi et sont classées dans de nombreuses familles. Les glycosyl hydrolases de la famille 12 (GH12) dégradent le xyloglucane, composé prépondérant de l'hémicellulose chez les dicotylédones. Ces enzymes sont inhibées par des protéines produites par les plantes, impliquées dans les mécanismes de défenses hôte / pathogène. Il s'agit des XEGIP (Xyloglucan-specific EndoGlucanase Inhibitor Protein). Ainsi il est montré que des GH12 de *Fusarium graminearum* sont inhibées par deux des trois XEGIP du houblon (*Humulus lupulus*), nouvellement découvertes par notre équipe. Les enzymes de *F. graminearum* ont fait l'objet d'une étude plus approfondie visant à la caractérisation de celles-ci. Ces GH12 ont été produites en *E. coli*. Celles-ci diffèrent par l'expression de leur gène, leur activité enzymatique, leur comportement cinétique, leur spécificité de substrat et enfin par les produits formés après hydrolyse. De nombreux champignons sécrètent des GH12, certaines d'elles sont également inhibées par les XEGIP du houblon.

Une grande diversité de GH12 est ainsi mise en exergue, suggérant des réponses adaptées lors d'interactions plante / pathogène mais également des potentialités industrielles importantes.

Title: Is there a bacterial sink for plant emissions of chloromethane?

Authors: Muhammad Farhan Ul Haque, Thierry Nadalig, Françoise Bringel, Hubert Schaller & Stéphane Vuilleumier

Microbial adaptations and interactions in the environment, Molecular Genetics, Genomics, Microbiology (GMGM), UMR 7156 CNRS, Université de Strasbourg, France

Abstract

The contribution of microbes to the atmospheric burden of climate-relevant trace gases is still poorly understood, and a topic of increasing scientific and societal interest. Chloromethane is a toxic volatile organic compound responsible for a substantial part of stratospheric ozone destruction. Chloromethane is produced mainly from natural sources, in soils and decaying vegetation by abiotic mechanisms, and enzymatically by plants. In *Arabidopsis thaliana*, a methyltransferase gene (termed *HOL*, i.e. harmless to ozone layer) accounts for most chloromethane production. Methylophilic bacteria that grow with chloromethane have been isolated from various terrestrial environments including the phyllosphere, i.e. the aerial parts of vegetation, and are therefore likely key regulators of global exchanges of chloromethane between terrestrial ecosystems and the atmosphere. All investigated chloromethane-degrading strains isolated from terrestrial environments contain *cmu* (chloromethane utilisation) genes, including the conserved *cmuA* gene encoding the corrinoid-dependent methyltransferase of chloromethane dehalogenase.

The main objective of my PhD work is to investigate whether chloromethane-degrading bacteria act as a filter for plant emissions of chloromethane. In recent work, *HOL* gene expression in leaves of WT, *HOL* inactivated mutant and *HOL* overexpressor variants of *A. thaliana* was followed by RT-qPCR, and bacterial genes and transcripts for 16S rRNA and *cmuA* in the phyllosphere of these *A. thaliana* variants were measured by qPCR and RT-qPCR. In addition, pyrosequencing analysis of *cmuA* and 16S PCR products amplified from DNA isolated from the *A. thaliana* phyllosphere was performed. Current results and perspectives of this work will be presented.

Preferred presentation type: Oral presentation (English)

Nouvelle diversité détectée dans un Drainage Minier Acide par des approches culturelles

François Delavat, Marie-Claire Lett et Didier Lièvreumont

UMR 7156, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie (GMGM), équipe Ecophysiologie Moléculaire des Micro-organismes, Institut de Botanique, Strasbourg

Les Drainages Miniers Acides (DMAs) sont des environnements extrêmes caractérisés par un pH très acide et par de fortes concentrations en métaux. La flore microbienne du DMA de Carnoulès (Gard) a été précédemment caractérisée par différentes approches métagénomiques, permettant d'accéder aux micro-organismes non cultivés et d'élaborer un modèle de fonctionnement de la communauté basé sur l'analyse de l'ensemble des génomes majoritaires réassemblés.

Dans notre étude, la diversité bactérienne a été recherchée en combinant différentes techniques culturelles innovantes incluant des milieux à différents pH (de 3.5 à 9.8) et différentes concentrations en nutriments. Cette approche a permis l'isolement de 19 genres, dont 16 n'avaient pas été détectés précédemment par les approches moléculaires, permettant ainsi d'augmenter de 70% la diversité totale à Carnoulès et d'avoir accès à des rangs taxonomiques (sous-classe de *Actinobacteridae* ou ordre des Rhizobiales) non-détectés par approches moléculaires. De plus, l'approche cultivée permet de tester physiologiquement chacune de ces souches, pour attribuer des rôles à chacune d'entre elles et affiner le modèle de fonctionnement élaboré précédemment. Le rôle de recyclage de la matière organique par un isolat de Carnoulès appartenant au genre *Paenibacillus* sera brièvement présenté.

Cette étude montre la complémentarité des approches ainsi que l'importance de la culture pour la détermination au plus juste de la diversité, point de départ crucial pour déterminer le fonctionnement de la communauté.

Intra-specific variability of multidrug resistance in yeast populations

Cyrielle Reisser, Anne Friedrich, Jacky de Montigny, André Goffeau and Joseph Schacherer

Department of Genetics, Genomics and Microbiology, UMR7156, 28 rue Goethe, 67083, Strasbourg, France

Opportunistic fungal infections are a global health threat. Hence multidrug resistance is an emerging problem that can be explained by several mechanisms such as biofilm formation, modification of the antibiotic-target and expulsion of the antibiotic. For the latest mechanism, PDR transporters (Pleiotropic Drug Resistance) are among the most studied mechanisms for multidrug resistance. To have new insights on the genetic basis of multidrug resistance, we decided to explore the intra-specific variation. We focused on genetic and phenotypic variation in two different yeast species: *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea kluyveri*. Interestingly, *L. kluyveri* is a pre-duplicated *Saccharomycetaceae*, meaning that it diverged from the *S. cerevisiae* lineage prior to its ancestral whole-genome duplication.

Based on sequencing data, we first explored the intra-specific genetic diversity of 63 *S. cerevisiae* and 28 *L. kluyveri* strains. We noticed that some genes involved in multiple drug resistance are highly polymorphic in specific sub-populations. For example, the *PDR5* gene, which encodes a multidrug transporter, is highly polymorphic in *S. cerevisiae* clinical strains (4.3 SNPs per kb vs. 2.3 SNPs per kb in the other strains). To uncover the resistance variation, we also decided to check the resistance to several compounds such as fluconazole, itraconazole, ketoconazole and cycloheximide. Our results point out a broad phenotypic variation in both species. Moreover, the segregation of these phenotypes in F1 progeny clearly shows that multidrug resistance is a complex trait. The next and current step is obviously to map the genetic basis of the resistance to the studied compounds within those two yeast species.

Fluorescence labeling of proteins involved in pyoverdine-dependent iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*.

Laurent Guillon¹, Isabelle J. Schalk^{1*}.

¹ *Transport Membranaire Bactérien, UMR7242, Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.*

Iron is a trace element essential for almost all living organisms. Microorganisms acquire this poorly soluble metal by secreting and then reabsorbing siderophores, low molecular mass compounds with a very high affinity for iron ions. Siderophores, and the access to iron they provide, are crucial for the infection of animals and plants by bacteria. *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative bacterium responsible for severe infections in immunocompromised patients or suffering from cystic fibrosis, secretes a major fluorescent siderophore, the pyoverdine. The genomic data and the spectral properties of this siderophore helped to identify and characterize the proteins involved in both its biosynthesis and the acquisition of the ferric pyoverdine complex. Proteins located in all three compartments of the bacteria are involved. Despite the knowledge of their individual functions, very little is known concerning the overall organization as well as the dynamics of these complex membrane protein machines that span the outer and the inner bacterial membranes.

We constructed mutant strains expressing, in a native context, proteins involved in pyoverdine biosynthesis or uptake chromosomally fused with fluorescent proteins. We checked, using biochemical approaches, that the fusion proteins retained their wild type activities. Fluorescent techniques (fluorescence microscopy, FRAP) allowed gaining insights on the protein localizations and dynamics. We observed different protein mobilities that are related to the subcellular localization, but also dependent on the function of the labeled protein.

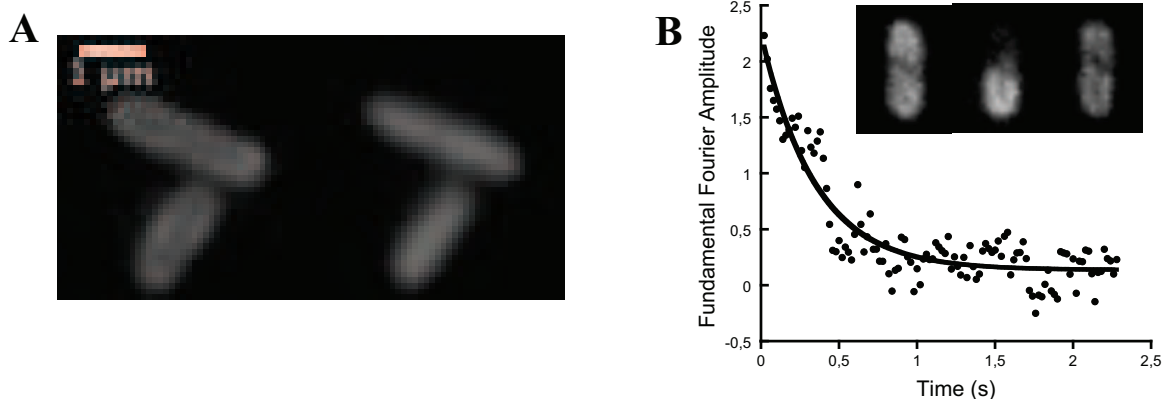


Figure 1: Characterization of PvdQ fused with mCHERRY at its C-terminus (PvdQ-mCHERRY) by fluorescence microscopy techniques. (A) Epifluorescence (left) and TIRF mode (right) images of strain expressing PvdQ-mCHERRY (B) Diffusion coefficient determination of PvdQ by FRAP experiments on PvdQ-mCHERRY expressing strain (inset: typical FRAP illustration; from left to right: pre-bleach, post-bleach, recovery).

*Correspondance : schalk@unistra.fr

Application de l'analyse protéomique comparative pour la sélection préliminaire des bactéries d'intérêt probiotique.

E. Hamon^{a,b}, P. Horvatovich^c, F. Bringel^d, E. Marchioni^a, D. Aoudé-Werner^b, S. Ennahar^a

^a*Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives, IPHC-DSA, UDS, CNRS, 67400 Illkirch.*

^b*Aérial, Parc d'Innovation, 67400 Illkirch.*

^c*Department of Analytical Biochemistry, University of Groningen, 9700 Groningen, The Netherlands.*

^d*Laboratoire de Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie, UDS, CNRS, 67083 Strasbourg.*

La directive européenne 1924/2006 exige que toute allégation santé soit étayée par des preuves scientifiques tangibles de nature clinique. Force est de constater que la majorité des fabricants de probiotiques actuellement sur le marché ne fournissent pas ces preuves, dans la mesure où les études cliniques sont onéreuses et où il y a un manque de méthodes satisfaisantes et abordables capables de discriminer les « vrais » probiotiques du reste de la flore microbienne.

Ces éléments montrent la pertinence de développer des outils analytiques fiables permettant d'une part, la sélection préliminaire des meilleurs candidats probiotiques en vue des essais cliniques, et d'autre part, la mise en évidence des mécanismes qui sous-tendent leurs activités. Parmi ces outils, la protéomique représente une approche prometteuse pour la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique.

Dans les présents travaux^{1,2}, cette approche a été appliquée à l'étude d'une propriété bactérienne couramment utilisée pour la sélection des probiotiques : la tolérance à la bile. Les profils protéomiques de souches de *Lactobacillus casei* et de *Lactobacillus plantarum* classées suivant leur niveau de tolérance à la bile ont ainsi été comparés. Des protéines clés potentiellement impliquées dans la tolérance de ces deux espèces aux sels biliaries ont pu être identifiées. Celles-ci interviennent dans la protection et la réparation des macromolécules, le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, le métabolisme central, et la détoxification cellulaire. Notamment, la diversité des protéines intervenant dans ce dernier processus et mises en évidence uniquement chez *L. plantarum* (AtpH, Bsh1, GshR1, GshR4) pourrait expliquer la tolérance plus élevée à la bile de cette espèce comparativement à *L. casei*. De plus, deux protéines (RfbC et OpuA), participant respectivement à la synthèse de la paroi et au transport des molécules toxiques, sont communes aux deux modèles et représentent ainsi des marqueurs inter-espèces potentiels de la tolérance à la bile chez les lactobacilles.

Ces travaux ouvrent la voie à l'utilisation de la protéomique comme outil de criblage de souches d'intérêt probiotique à travers l'identification de biomarqueurs bactériens de propriétés et d'activités particulières. A terme, cet outil doit permettre de sélectionner les souches les plus prometteuses et ainsi d'augmenter significativement les chances de succès des études cliniques.

¹Hamon et al. *BMC Microbiol.* 2011, 11:63

²Hamon et al. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 109-118

Impact de l'hétérogénéité des matrices alimentaires sur la croissance bactérienne de *Listeria monocytogenes*

R. Ferrier^{1,2}, A. Czarnecka¹, M. Ecosse², B. Hezard², F. Kuntz², A. Lintz², S. Oppici¹, V. Stahl², J.-C. Augustin¹

¹ Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité MASQ, 7 Avenue du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex, France (jcaugustin@vet-alfort.fr)

² Aérial, Parc d'Innovation, F-67412 Illkirch, France (r.ferrier@aerial-crt.com)

Il est établi que la prévision de croissance de micro-organismes pathogènes dans les aliments nécessite souvent une approche probabiliste en tenant compte du comportement des cellules individuelles des contaminants. Dans l'approche de modélisation basée sur l'individu, nous devons aussi décrire le microenvironnement des cellules bactériennes.

Le but de cette étude était de caractériser le microenvironnement physico-chimique des cellules bactériennes contaminant potentiellement la surface d'un fromage à pâte molle et croûte lavée afin d'évaluer l'impact de l'hétérogénéité de ce microenvironnement sur le comportement des bactéries.

Nous avons utilisé des microélectrodes pour les mesures permettant de cartographier le pH de surface. Un modèle décrivant la variabilité spatiale et temporelle du pH pendant l'affinage a été déterminé. La variabilité de croissance des cellules individuelles de la bactérie *Listeria monocytogenes* en fonction du pH et de l'activité de l'eau a également été déterminée. Les modèles probabilistes de croissance individuelle ont ensuite été combinés avec le modèle d'évolution du pH afin de prédire le comportement des cellules de *L. monocytogenes* à la surface du fromage au cours d'affinage. L'approche de modélisation basée sur l'individu a été comparée à des prévisions de croissance obtenues avec une population et une approche macroscopique. L'approche de modélisation basée sur l'individu était particulièrement pertinente pour prédire la probabilité de croissance de cellules de *L. monocytogenes* dans le fromage puisqu'elle permet de mieux décrire la réalité dans certaines conditions.

A sigmaB dependent regulatory RNA modulates biofilm and capsule formation in *Staphylococcus aureus*

Cédric ROMILLY^{1*}, Claire LAYS^{2*}, Efthimia LIOLIOU¹, Florence VINCENT², François VANDENESCH², Pascale ROMBY¹, Sandrine BOISSET^{2§} and Tom GEISSMANN^{2§}

¹ Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, Strasbourg, France. ² Pathogénie Bactérienne et Immunité Innée, Université de Lyon, INSERM U851, Lyon, France.

*equal first authorship; §equal senior authorship

Staphylococcus aureus is a remarkable versatile pathogen responsible of 30% of nosocomial infections, with dramatic outbreaks in immuno-compromised patients. The pathogenicity of the bacteria results from the production of a plethora of virulence factors. The expression of these factors is temporally regulated by complex networks including transcriptional regulators, two-component systems, and regulatory RNAs. Here, we have characterized the function of RsaA [1]. This 138 nucleotides non-coding RNA (ncRNA) is expressed upon stationary growth phase and is under Sigma B control, a transcriptional regulator involved in stress adaptation [2]. To investigate the function of RsaA, we used a differential proteomic analysis combined with prediction of stable RsaA/mRNA duplexes. This strategy led to the identification of two direct target mRNAs, *mgrA* and *yabJ-spoVG*. MgrA is a global transcriptional factor affecting multiple genes involved in virulence, biofilm and antibiotic resistance [3] while SpoVG is involved in *cap* operon regulation and affect capsule formation, an adaptive mechanism against phagocytosis [4].

Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, we have validated *mgrA* as a direct target of RsaA. *In vitro*, RsaA uses a C-rich motif to form an extended duplex with the Shine and Dalgarno sequence of the mRNA. A second interaction involves a loop-loop interaction with a hairpin located in the coding region. Binding of RsaA prevents the ribosome binding to inhibit the translation of *mgrA* mRNA. *In vivo*, we showed that RsaA mutants showed a delay in early biofilm formation. Moreover, RsaA deleted strain produces less biofilm. In addition, we showed that *rsaA* inactivation enhances the capsule production. These observations were confirmed in several genetic backgrounds. More surprisingly, deletion of *rsaA* causes some defects in the internalization of the bacteria by macrophages but the phenotype was different depending on the genetic background. We are presently analyzing the importance of RsaA in pathogenesis and host-pathogen interaction.

1. Geissmann T et al. (2009) *Nucleic Acids Res.*
2. Bischoff M. et al (2004) *J. Bacteriol.*
3. Luong TT et al. (2006) *J. Bacteriol.*
4. Meier S et al. (2007) *Infect. Immun.*

HIV-1 Vif protein oligomerizes in living cells: a FRET/FLIM approach

Julien Batisse, Santiago Guerrero, Serena Bernacchi, Valérie Goldschmidt, Ludovic Richert, Hugues de Rocquigny, Roland Marquet, & Jean-Christophe Paillart.

UPR 9002, Architecture & Reactivity of RNA, CNRS, IBMC, Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France.

The HIV-1 viral infectivity factor (Vif) is a small basic protein essential to viral fitness and pathogenicity. Vif allows productive infection of non-permissive cells (including most natural HIV-1 target cells) by counteracting the cellular cytosine deaminases APOBEC3G (A3G) and A3F. Vif has also been shown to be associated with the viral assembly complex and packaged into viral particles through interactions with the viral genomic RNA and the nucleocapsid (NC) domain of Gag. Recently, we showed that the oligomerization state of Vif influences its capacity to bind nucleic acids and its folding.

In order to better understand the role of Vif oligomerization in viral assembly in living cells, we used a FRET approach analyzed by FLIM (Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy). In a first set of experiments, by using two N-terminal tagged-versions of Vif (eGFP-Vif and mCherry-Vif), we showed for the first time that Vif-Vif interactions occur in living cells. This oligomerization is partly lost using a substitution mutant of Vif in the putative multimerization domain (¹⁶¹PLPP¹⁶⁴ to AALA), suggesting that regions outside this domain could also participate to Vif oligomerization. When Vif was co-expressed together with Gag, Vif was largely re-localized at the cell membrane where Vif oligomerization still occurs. Interestingly, we showed that the presence of A3G protein drastically interferes with Vif multimerization, suggesting a new mechanism for A3G to limit Vif functions. FCS experiments in living cells are in progress to validate these observations. The FRET/FLIM technology turns out to be a promising tool to study Vif trafficking during HIV-1 infection and analyze interacting partners of Vif in living cells.

This work is supported by a grant from the French National Agency for Research on AIDS (ANRS) to JCP, and by post-doctoral and doctoral fellowships from SIDACTION and ANRS to JB and SG, respectively.

LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing.

Valentin Le Douce^{1*}, Laetitia Redel^{1*}, Thomas Cherrier¹⁶, Georges Herbein³, Dominique Aunis¹, Olivier Rohr¹²⁵, Carine Van Lint⁴ & Christian Schwartz¹⁵

¹ University of Strasbourg, EA4438, Institute of Parasitology, Strasbourg, France

² Institut Universitaire de France, 103 Bd Saint Michel, Paris, France

³ UPRES EA 3186, Pathogens and Inflammation, CHU of Besançon, University of Franche-Comté, Department of Virology, 25030 Besançon, France

⁴ IBMM University of Brussels, Gosselies, Belgium

⁵ IUT de Schiltigheim, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France

⁶ Laboratory of Protein Interactions and Signaling, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics, Giga-Research, University of Liège, 1 avenue de l'hôpital, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

Abstract: Microglial cells are the main HIV-1 targets in the central nervous system (CNS) and constitute an important reservoir of latently infected cells. Establishment and persistence of these reservoirs rely on the chromatin structure of the integrated proviruses. We have previously demonstrated that the cellular cofactor CTIP2 forces heterochromatin formation and HIV-1 gene silencing by recruiting HDAC and HMT activities at the integrated proviral promoter. In the present work, we report that the histone demethylase LSD1 represses HIV-1 transcription and viral expression in a synergistic manner with CTIP2. Since LSD1 is required for CTIP2-mediated transcriptional repression, we show that recruitment of LSD1 at the HIV-1 proximal promoter is associated with both H3K4me3 and H3K9me3 epigenetic marks. Finally, our data also suggest that LSD1-induced H3K4 trimethylation is linked to hSet1 recruitment at the integrated provirus.

Mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par *Toxoplasma gondii*

Julie Brunet, Alexander W. Pfaff, Ghaidaa Kanjo, Marcela Sabou et Ermanno Candolfi
*Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, Faculté de Médecine.
Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France*

La toxoplasmose, pathologie parasitaire due à *Toxoplasma gondii* est l'une des infections les plus fréquentes en France : environ 50 % de la population adulte est infectée et on estime que 200 000 à 300 000 nouvelles infections surviennent chaque année dont 15 à 20 % sont symptomatiques. Dès lors que l'Homme est infecté, il héberge le parasite sous forme kystique toute sa vie durant dans des organes cibles comme les muscles, le cerveau ou l'œil. Il n'existe aucun traitement efficace visant les formes de latence du parasite et aucun vaccin. Dans les cellules infectées par *Toxoplasma gondii*, le parasite module une grande variété de gènes de l'hôte afin d'assurer sa prolifération et d'établir une infection persistante. Parmi les voies de signalisation modifiées par la présence parasitaire, nous avons montré que *T. gondii* induisait une dérégulation du cycle cellulaire des cellules infectées conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Cet arrêt est dû à un défaut d'expression de la cycline B dépendant d'UHRF1. Le facteur de transcription UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) est connu pour être l'un des principaux régulateurs du cycle cellulaire. Il présente des propriétés de « methyl-CpG-binding protein » qui lui confère un rôle crucial dans la réplication du code épigénétique lors de la prolifération cellulaire.

L'objectif de ce travail est d'étudier la régulation par UHRF1 de la cycline B lors de l'infection par *T. gondii*. UHRF1 étant un élément central dans les interactions épigénétiques, nous nous sommes également intéressés aux altérations épigénétiques induites par l'infection et impliquées dans la modulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées. Nous avons constaté que le parasite induisait, par le biais d'altérations épigénétiques UHRF1-dépendantes sur le gène de la *cycline B*, l'arrêt en G2 des cellules-hôtes infectées. UHRF1 est capable de recruter plusieurs enzymes responsables de modifications de la chromatine (Dnmt, HDAC...) favorisant la formation d'hétérochromatine et la répression du gène de la *cycline B*.

Ces résultats montrent une nouvelle dynamique d'interaction entre les cellules-hôtes et le parasite contribuant à une régulation de l'expression du gène de la *cycline B*. *T. gondii* est un parasite unique, capable de moduler l'expression des gènes en interférant avec deux modifications épigénétiques importantes que sont la méthylation et la modification des histones.

Cell entry factor dependency and resistance to neutralizing antibodies during hepatitis C virus infection *in vivo*

Catherine Fauvelle^{1,2}, **Samira Fafi-Kremer**^{1,2,3}, **Isabel Fofana**^{1,2}, **Muhammad Nauman Zahid**^{1,2}, **Marine Turek**^{1,2}, **Laura Heydmann**^{1,2}, **Michèle Bastien-Valle**^{1,2}, **Juliette Hayer**⁴, **Christophe Combet**⁴, **François-Loïc Cosset**⁵, **Thomas Pietschmann**⁶, **Ralf Bartenschlager**⁷, **François Habersetzer**^{1,2,8}, **Michel Dozzo**^{1,2,8}, **Zhen-Yong Keck**⁹, **Steven K.H. Fong**⁹, **Mirjam B. Zeisel**^{1,2}, **Françoise Stoll-Keller**^{1,2,3}, **Thomas F. Baumert**^{1,2,8}

¹Inserm, U748, 67000 Strasbourg, France, ²Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, ³Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, ⁴Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086, CNRS, Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 69367 Lyon, France, ⁵Inserm, U758, ENS Lyon, 69364 Lyon, France, ⁶Division of Experimental Virology, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, a joint venture between the Medical School Hannover and the Helmholtz Centre for Infection Research, 30625 Hannover, Germany, ⁷The Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University, 69120 Heidelberg, Germany, ⁸Pôle Hepato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, ⁹Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, 94304 California, USA

Corresponding author: Thomas F. Baumert, M. D., Inserm Unit 748, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; phone: (33) 3 68 85 37 02; fax: (33) 3 68 85 37 50, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr

A high density of cell surface-exposed CD81 is a key determinant for hepatitis C virus entry into host cells. Although several determinants for CD81-dependent entry have been identified, the functional relevance of these factors for virus-host interactions *in vivo* is poorly understood. Using transplant escape variants as a model we identified a novel residue, located outside the known CD81 binding sites, as relevant for CD81-dependent entry. This altered receptor dependency is accompanied by an enhanced entry and resistance to neutralization. Reverse genetics of viral genomes and functional analysis of HCV pseudoparticles (HCVpp) and HCV produced in cell-culture (HCVcc) expressing E1E2 envelope glycoproteins from an escape variant (VL) showing enhanced entry and resistance to neutralization and a variant (VA) showing lower infectivity and high sensitivity to neutralization, demonstrate that the residue F447 in envelope glycoprotein E2 is relevant for enhanced entry of the escape variant. Using Huh7.5 cells with silenced CD81 expression (shCD81-Huh7.5 cells), we demonstrate that this residue led to a marked and significant decrease of viral entry of the escape variant VL compared to VA, suggesting that enhanced entry of the escape variant is dependent on CD81 density. Residue F447 decreases markedly and significantly binding of E1E2 complexes of the escape variant to sh-CD81-Huh7.5 cells. Moreover, the residue F447 mediates broad resistance to antibody-mediated neutralization and to cross-neutralizing human monoclonal antibodies interfering with E2-CD81 interactions. Structural modelling indicates that the residue 447 is located in an E2 loop and suggests that the mutation at this position may change the accessibility of the loop and its interaction with CD81 or CD81-Claudin1 co-receptor complexes. Taken together, these data obtained with HCVpp and HCVcc systems identify a previously unknown E2 residue that modulates CD81 receptor dependency and confers resistance to neutralizing antibodies. Furthermore, our findings identify a novel and clinically important mechanism of viral evasion, where co-evolution simultaneously occurs between cellular entry factor usage and escape from neutralization.

Deciphering *Shigella* Type 3 Secretion System effectors function in *Drosophila melanogaster*.

François Bonnay, Magdalena Kawalec, Nicolas Matt, Jean-Marc Reichhart

UPR 9022 Equipe Génétique de la Réponse Immunitaire
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC)
15 rue René Descartes, 67084 STRASBOURG

Présentation orale

The innate immune response in insects relies mainly on two evolutionary conserved signalling cascades named Toll and IMD pathways. Upon recognition of Gram-negative bacteria the IMD pathway is activated and culminates in the nuclear translocation of the NF- κ B transcription factor Relish, which in turns activates hundreds of genes including the antimicrobial peptides (AMP) coding genes. A caspase-dependent cleavage of the NF- κ B transcription factor Relish, is required to enable Relish translocation into the nucleus. However, the molecular mechanism of this cleavage is still controversial.

Type III Secretion System (T3SS) effectors of *Shigella flexneri* (an enteropathogenic bacterium of primates) are known to modulate the innate immune response in mammals. To uncover the molecular targets of these virulence factors, we took advantage of *Drosophila* genetics. Our strategy consisted in over-expressing T3SS effectors outer *Shigella* proteins (OSPs), either in *Drosophila* eye (which is not essential for insect survival) or in an immortalized drosophila immune cell line and to find suppressors of their biological action. As a proof of concept we demonstrated that *S. flexneri* OSP1 and OSP2, interfere with the IMD pathway *in-vivo*. Moreover, epistatic analysis showed that OSP1 and 2 antagonize the cleavage of the NF- κ B factor Relish.

Identifying the interacting proteins of these virulence factors will simultaneously facilitate the understanding of *S. flexneri* OSP1 and 2 actions in human and lead to the identification of new members of the IMD pathway in *Drosophila*. Identification of the mammalian functional homologues of these new IMD pathway members will also bring more clarity into the complex NF- κ B signalling pathways underlying the mammalian innate immune response.

Microbiota enhances the starvation resistance in *Drosophila* by preventing autophagy

Arshad Ayyaz, Philippe Giammarinaro, Samuel Liégeois and Dominique Ferrandon

*UPR9022 du CNRS, Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, 15, rue R. Descartes,
67084 Strasbourg Cedex, France*

The *Drosophila melanogaster* feeds on decaying fruits and vegetables and, thus, regularly interacts with various microorganisms. Different categories of bacteria are recognized through their structural components followed by an immune response (1, 2). The Toll pathway is the major component of the host response against Gram-positive bacteria, however, our knowledge of intestinal immune defenses against this categories of bacteria remains limited. In an intestinal infection model with a Gram-positive bacterium *Staphylococcus xylosus* we discovered, however, that the *MyD88*, a main intracellular adaptor of Toll pathway, mutant flies survived better. Additional experiments confirmed that the flies actually died because of depletion of food resources and that the *MyD88* mutants were more resistant to starvation. Interestingly, starved *MyD88* flies were able to preserve their fat stores longer than wild-type flies, an observation correlated to the absence of autophagy during the first 24 hours. When TOR pathway activity in *MyD88* flies was blocked by the treatment with rapamycin, the starvation phenotype was lost suggesting that the TOR activity was required for the *MyD88* starvation phenotype. Surprisingly, the observation appeared to be initiated by the microbiota. *MyD88* mutants retained higher amounts of *Lactobacillus plantarum* after one day of starvation, as compared to the wild-type controls. We thus propose that *L. plantarum* induces the TOR activity on its own during starvation, an observation published recently (3), preventing a premature onset of autophagy in *MyD88* flies. This conserves the fat stores for longer time thus enhancing the fly survival during starvation.

Nanodiamants : des bijoux pour la biologie. (Présentation orale).

Sébastien Josset, Vincent Pichot, Loïc Schmidlin, Denis Spitzer

UMR 3208 ISL/CNRS

Nanomatériaux pour des Systèmes Sous Sollicitations Extrêmes (NS3E)

Institut franco-allemand de recherches de Saint-Louis (ISL)

5, rue du Général Cassagnou BP 70034

68301 Saint-Louis Cedex France

L'objectif de cette présentation est d'introduire les nanodiamants produits par détonation (DND) dans le monde de la biologie. En effet, bien que ces particules de la famille des nanocarbone aient été synthétisées par explosion d'un mélange de deux explosifs dès les années soixante en U.R.S.S., la découverte de leur potentiel en biologie est beaucoup plus récente.¹ Comme leurs homologues macroscopiques, les DND ainsi synthétisés (taille de l'ordre de 5 nm) ont des propriétés extraordinaires puisqu'ils combinent des propriétés inorganiques issues de leur nature cristalline à celles de molécules organiques de par leur chimie de surface, tout en étant parfaitement biocompatibles.²⁻⁴

En effet, il est possible de créer des défauts dans leur réseau cristallins, lesquels, associés par exemple à la présence d'azote, peuvent induire des propriétés de fluorescence inégales puisque contrairement à d'autres fluorophores moléculaires, la fluorescence des DND est permanente et intense (pas de photobleaching). De plus, contrairement aux Q-dots qui s'avèrent cytotoxiques à plus ou moins long terme, les DND sont biocompatibles, ce qui permet des études longues avec un minimum d'interférences.^{5,6} La présence de fonctions oxygénées en surface permet d'y greffer aisément des molécules d'intérêt selon des réactions classiques de biochimie, y compris des biomolécules dont l'activité est maintenue. En plus de ces aspects de marquage, les DND peuvent aussi servir de vecteurs thérapeutiques transmembranaires.⁷

1 Shenderova, O. A. & Ciftan Hens, S. A. (ed Dean Ho) 79-116 (Springer US, 2010).

2 Hartl, A. *et al.* Protein-modified nanocrystalline diamond thin films for biosensor applications. *Nat. Mater.* **3**, 736-742 (2004).

3 Liu, K. K., Cheng, C. L., Chang, C. C. & Chao, J. I. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell. *Nanotechnology* **18** (2007).

4 Schrand, A. M., Hens, S. A. C. & Shenderova, O. A. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **34**, 18-74 (2009).

5 Zhu, Z.-J. *et al.* Stability of quantum dots in live cells. *Nature Chem.* **3**, 963-968 (2011).

6 Faklaris, O., Botsoa, J., Sauvage, T., Roch, J. F. & Treussart, F. Photoluminescent nanodiamonds: Comparison of the photoluminescence saturation properties of the NV color center and a cyanine dye at the single emitter level, and study of the color center concentration under different preparation conditions. *Diamond Relat. Mater.* **19**, 988-995 (2010).

7 Xing, Y. & Dai, L. M. Nanodiamonds for nanomedicine. *Nanomedicine* **4**, 207-218 (2009).

Drosophila as a model to study intestinal infections

Kwang-Zin Lee, Samuel Liégeois, Stefanie Limmer, Matthieu Lestradet, Samantha Haller, Richard Bou Aoun, Ayyaz Arshad, Dominique Ferrandon

IBMC-CNRS, UPR9022, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, FRANCE

Beside important roles in nutrition and water balance, the gut epithelium serves also as the first line of defense against ingested pathogens. Defense mechanisms include the epithelial expression of antimicrobial peptides (AMP) and an induction of reactive oxygen species (ROS) production and release.

Complementing the host response, the tightly regulated maintenance of homeostasis is ultimately of major importance for the survival of the fly. This maintenance of homeostasis in the midgut, which we call endurance (tolerance), is our main interest.

We use an oral infection model with the entomopathogenic Gram(-) bacteria *Serratia marcescens*. A genome wide RNAi screen (Cronin, Science 2009) established the importance of endurance during oral infection, with the identification of some 150 genes involved in several biological processes. The exact function of most of those genes and the cognate mechanisms underlying endurance remains to be elucidated.

We report the existence of at least two phases of the infection. A striking alteration of the epithelium occurs in an early phase. This phase was followed by a steady-state phase, in which the midgut appears normal. We applied correlative electron microscopy to study the effects of *Serratia* during the early phase of infection on an ultrastructural level. Preliminary results indicate an important role of the secreted pore-forming toxin hemolysin, a major virulence factor of pathogenic bacteria.

We also study by deep sequencing the transcriptional response of the midgut after different time points of *Serratia* infection. Our approaches will allow us to better understand the cellular and molecular bases of regenerative homeostasis events after oral infection.

Genetic dynamics in Tandemly Arrayed Genes in yeasts

Samuil Ivanov^{1,2}, Laurence Despons¹, Serge Potier¹, Jean-Luc Souciet¹, Véronique Leh Louis¹ and Anna Kujumdzieva²

¹ - *University of Strasbourg, Laboratory of molecular genetics, Genomics and Microbiology UMR7156 CNRS*

28 “Goethe” Str., 67083 Strasbourg Cedex, France, Email : vleh@unistra.fr

² - *Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Biology, Department of General and Industrial Microbiology, 8 “Dragan Tzankov” Str., 1164 Sofia, Bulgaria, Email : kujumdzieva@biofac.uni-sofia.bg*

Gene duplication, a natural process for creating new genes within genomes, is one of the most important driving forces for genome evolution (*Evolution by gene duplication*, S. Ohno, 1970). It creates genetic novelties by accumulation of mutations in one copy, the other maintaining the original function (Land and Murray, 2011; Lynch and Conery, 2000).

TAGs (Tandem Arrayed Genes) are found in every sequenced genomes so far. They represent genetic structures of multiple copies of a gene placed next one to the other. The sequence similarity between these gene copies and the frequent presence of other repeated elements in their vicinity (like LTRs) explain probably why those genetic areas are “Hotspots” of chromosomal rearrangements (Leh-Louis, 2004; Despons, 2010; 2006).

So far, these reshaping events have been only detected by bioinformatical methods, based on the available DNA sequence of eukaryotic genomes (Despons, 2011).

To estimate the frequencies of rearrangements and point mutations in TAG, we developed a genetic approach in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Two selective markers were introduced within the largest TAG of the baker’s yeast. Results of fluctuation assays confirm that this structure is a “Hotspot” of spontaneous mutation accumulation and chromosomal rearrangements. The characterization of mutants reveals also a large panel of genomic events.

Bibliography

- Lang and Murray (2011) *Gen. Biol. Evol.* 3:799-811; (2008) *Genetics* **178**, 67-82;
Despons L. *et al.* (2011) *C. R. Biologies* **334**, 639-646; (2010) *BMC Genomics* **11**:56; (2006) *Trends Genet.* **22**, 10-15;
Leh-Louis V. *et al.* (2004) *Genetics* **167**, 1611-19;
Lynch and Conery (2000) *Science* **290**, 1151-55.

Etude de l'action photocatalytique du TiO₂ sur *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*

G. Carré^{1,2}, J. Peluso⁴, C.D. Muller⁴, N. Keller², M.-C. Lett³, V. Keller², J.-P. Gies¹ et Ph. André¹

¹Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS/UdS, ²Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse, UMR 7515 CNRS/UdS, ³Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR 7156 CNRS/UdS, ⁴Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR 7200 CNRS/UdS

La photocatalyse est un phénomène d'oxydation avancée qui sous l'action d'une illumination de longueur d'onde adéquate met en œuvre des réactions redox à la surface d'un catalyseur, qui est le siège de réactions d'oxydation. Le catalyseur généralement utilisé est le dioxyde de titane (TiO₂), qui exposé au rayonnement UV-A, génère la production de ROS (Reactive Oxygen Species) qui vont dégrader des molécules chimiques ou biologiques [1]. Cette technique peut être utilisée pour la désinfection des liquides, des surfaces ou de l'air. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'efficacité de désinfection de l'eau contaminée par *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*, germes fréquemment impliqués dans les infections nosocomiales. Elle a été réalisée par cytométrie en flux à l'aide du kit live/dead (Invitrogen).

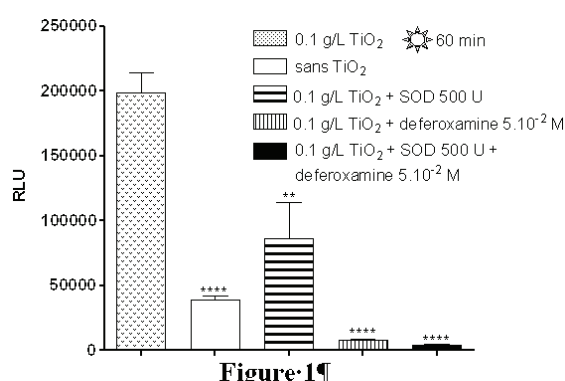
Le **Tableau** ci-contre présente les réductions logarithmiques de la population bactérienne obtenue sur TiO₂ P25 (Evonik) en fonction du temps de rayonnement. Une

	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
TiO ₂ 0.8 g/L; 0 min	<1 log	<1 log	<1 log
TiO ₂ 0.8 g/L; 30 min UV-A	2-3 log	2 log	2-3 log
TiO ₂ 0.8 g/L; 60 min UV-A	3-4 log	2-3 log	2-3 log

diminution dose-dépendante (données non présentées) de 2-3 log est obtenue pour tous les germes à partir de 30 min de rayonnement. Parallèlement les ROS générées au cours du processus photocatalytique conduisant à la dégradation d'*E.coli* ont pu être identifiées par chimiluminescence (CL) en présence de luminol, via l'utilisation de scavengers [2-3].

La **Figure 1** montre les effets de la déféroxamine (DF) (scavenger de OH° et ¹O₂) et de la SOD (O₂°⁻) sur la CL émise par le TiO₂.

La DF et la SOD réduisent très fortement la CL émise dans le cas de TiO₂ à 0.1 g/L, montrant ainsi l'implication des radicaux OH°, ¹O₂ et O₂°⁻ dans le processus de photocatalyse. Des études de restauration de la viabilité bactérienne en présence de scavengers ont montré au laboratoire l'implication de O₂°⁻ dans l'effet bactéricide induit par la photocatalyse du TiO₂.



[1] S. Josset, N. Keller, M. C. Lett, M. J. Ledoux, V. Keller *Chem Soc Rev* 37 (2008) 744-55.

[2] P. André, C. Metzger, S. Petey, D. Muller, D.J.-M. Vidon *FEMS Microbiol. Lett.*, 245 (2005) 123-129.

[3] M.Oosthuizen, and D. Greyling *Redox Report*, 4 (1999) 277-90.

Inhibiteurs de la machinerie TonB : Vers des antibiothérapies à large spectre ?

**Bénédicte Pesset,^a Laurent Guillon,^a Ahmed Meksem,^a Karl Brillet,^a Gabrielle Zeder-Lutz,^b
Didier Rognan,^c Isabelle Schalk,^a Gaëtan Mislin^a**

*Equipe « Transports Membranaires Bactériens »,^a Equipe « Biocapteurs »^b UMR7242
CNRS/Université de Strasbourg, ESBS, Boulevard Sébastien Brant 67400 Illkirch.
« Chémoinformatique Structurale », UMR 7200, CNRS – Université de Strasbourg.^c*

La résistance aux antibiotiques est un phénomène particulièrement inquiétant. Il trouve ses origines à la fois dans l'usage abusif des bactéricides en santé humaine (ou animale) et dans le nombre finalement très restreint de familles d'antibiotiques utilisées. Il y a donc une urgente nécessité à valider de nouvelles cibles biologiques et à développer des inhibiteurs performants de ces cibles.¹ Le fer est un élément essentiel à la grande majorité des êtres vivants. Les bactéries n'échappent pas à cette règle et ont besoin de ce nutriment essentiel qui intervient dans des processus biologiques cruciaux (synthèse de l'ADN, métabolisme, etc.). Les mécanismes permettant aux bactéries de s'approvisionner en fer sont donc des cibles particulièrement intéressantes, et peu exploitées, pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Chez un hôte eucaryote, la concentration en fer(III) biodisponible n'est que de 10^{-18} M alors qu'une concentration de 10^{-6} M est en général nécessaire pour une prolifération bactérienne optimale. Pour subvenir à leur besoin en fer, les bactéries Gram-négatives ont développé des systèmes d'assimilation particulièrement performants.² Ainsi les bactéries, pour transporter les sources fer extracellulaires (hème, transferrine, sidérophore-ferrique) à travers l'enveloppe bactérienne, expriment des transporteurs de membranes externes chargés de reconnaître spécifiquement et de transporter le fer sous ses différentes formes. Le transport est possible grâce à l'énergie fournie par la machinerie TonB, un complexe de trois protéines (TonB, ExbB, ExbD), commun à l'ensemble des mécanismes de transport du fer mais aussi d'autres nutriments cruciaux.³ Une bactérie n'exprimant pas la machinerie TonB pousse mal et prolifère difficilement. TonB est en outre présente avec un fort taux d'identité chez de très nombreux pathogènes et il n'existe pas de protéine homologue chez l'Homme. L'ensemble de ces données confirment que TonB est une cible prioritaire pour le développement d'antibiothérapies à large spectre. Nous présentons ici les approches envisagées et les résultats préliminaires obtenus dans ce domaine.

1. Mitscher, L.A. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 497–509.

2. Hider, R.C. ; Kong, X.-L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 637–657.

3. Schauer, K.; Rodionov, D.A.; De Reuse, H. *Trends Biochem. Sc.* **2008**, 33, 330-338.

Caractérisation d'une interaction spécifique entre l'ARNIII de *Staphylococcus aureus* et la protéine Tex

Delphine Parmentier¹, Pierre Fechter¹, Sandrine Boisset², Jean-Luc Cortay², Maria Possedko¹, Alain Jacquier³, François Vandenesch² & Pascale Romby¹

¹UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg Cedex, France,

²Pathogénie des Staphylocoques INSERM-U851 Faculté de Médecine Laennec 7 Rue Guillaume Paradin 69372 Lyon cedex 08, ³URA2171-CNRS-Génétique des Interactions Macromoléculaires, Paris Cedex, France

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène opportuniste. Son pouvoir pathogène implique la synthèse d'un grand nombre de facteurs de virulence, dont l'expression est régulée de manière temporelle grâce à l'action coordonnée de systèmes à deux composants, de facteurs de transcription et d'un ARN régulateur, l'ARNIII. Cet ARN est induit par le système *agr* qui répond à la densité cellulaire. Il réprime la synthèse de protéines de surface et active celle d'exotoxines. L'ARNIII agit notamment comme un ARN antisens répresseur, s'appariant aux séquences Shine et Dalgarno de ses ARNm cibles. La formation des complexes ARNIII - ARNm inhibe la traduction et induit la dégradation des ARNm qui est initiée par l'endoribonucléase III (RNase III), spécifique des ARN en double brin. Mis à part cette RNase, aucune autre protéine participant au mécanisme de régulation par l'ARNIII n'a été caractérisée. Cependant, une nouvelle protéine appelée Tex interagissant avec l'ARNIII a été isolée par chromatographie d'affinité. Cette protéine, qui interagit avec les acides nucléiques est l'orthologue de la protéine eucaryote Spt6, qui fait le lien entre la transcription et la dégradation des ARN mal épissés. Ainsi, il se pourrait que Tex puisse être impliquée dans le métabolisme des ARN et par son interaction avec l'ARNIII, créerait un lien entre le métabolisme des ARN et la virulence.

Nous avons entrepris d'analyser l'interaction de Tex avec l'ARNIII. Des expériences de gel retard ont permis de montrer que Tex se fixe à l'ARNIII selon un mode coopératif et que le domaine central de l'ARNIII servirait d'ancrage à la fixation de Tex. Cette interaction est spécifique car elle n'est pas déplacée par ajout d'ARNt ou d'un autre ARN régulateur. L'empreinte de Tex à l'ARNIII, définie par cartographie en solution, révèle que Tex se lie préférentiellement à des régions en simple brin, riches en adénines et uraciles. Nous étudierons ensuite le rôle de ce complexe sur la régulation de l'expression des gènes de virulence. A plus long terme, le régulon de Tex sera étudié pour définir l'ensemble des cibles et des fonctions de cette protéine.

From *in silico* analysis of yeast tandem gene arrays to mechanisms of genome evolution

Zlatyo Uzunov^{1,2}, Jean-Luc Souciet², Anna Kujumdzieva¹ and Laurence Despons²

1 – Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Biology, Department of General and Industrial Microbiology, 8 “Dragan Tzankov” Str., 1164 Sofia, Bulgaria

2 – University of Strasbourg, Laboratory of molecular genetics, Genomics and Microbiology, UMR 7156, 28 Goethe Str., 67083 Strasbourg Cedex, France

Tandem duplicated genes have an important role in the evolutionary process of all genomes. Broad comparative characterisation and analysis of tandem gene arrays (TGAs) have been conducted in the genomes of several multicellular eukaryotes (1). 622 TGAs have also been identified and characterised in the completely sequenced genomes of 11 hemiascomycetous yeast species (2, 3). In the current study we extend the *in silico* analyses on the yeast TGA set. Through the help of a Python script and a genome annotation database we examined the intergenic distances, the distribution of the neighbouring features on each chromosome, and the mean protein sequence identity by TGA. Genes in TGAs have significantly higher intergenic distances and their proportion in parallel orientation is greater compared to that of non-TGA genes. The distribution of pseudogenes, rRNA genes, transposons, and tRNA genes seems to be shifted towards TGA neighbouring areas. The analysis of the mean protein identity by TGA reveals a dispersed distribution of values without distinctive separate clusters. The main goal of these analyses is to put on evidence patterns in the TGA organisation in the genome that could facilitate the understanding of TGA formation and evolution.

1. Shoja, V. & Zhang, L. A roadmap of tandemly arrayed genes in the genomes of human, mouse, and rat. *Molecular biology and evolution* 23, 2134 (2006).

2. Despons, L. et al. Genome-wide computational prediction of tandem gene arrays: application in yeasts. *BMC genomics* 11, 56 (2010).

3. Despons, L., Uzunov, Z. & Louis, V. L. Tandem gene arrays, plastic chromosomal organizations. *Comptes Rendus Biologies* 334, 639–646 (2011).

Modular architecture of eukaryotic RNase P and RNase MRP revealed by
electron microscopy

Claire Batisse¹, Katharina Hipp, Kyriaki Galani, Simone Prinz and Bettina Böttcher.

Structural and Computational Biology Unit, EMBL, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany.

¹ *Current address : IGBMC, équipe Schultz, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch.*

Ribonuclease P (RNase P) and RNase MRP are closely related ribonucleoprotein enzymes, which process RNA substrates including tRNA precursors for RNase P and 5.8S rRNA precursors, as well as some mRNAs, for RNase MRP. The structures of RNase P and RNase MRP have not yet been solved, so it is unclear how the proteins contribute to the structure of the complexes and how substrate specificity is determined. Using electron microscopy and image processing we show that eukaryotic RNase P and RNase MRP have a modular architecture, where proteins stabilize the RNA fold and contribute to cavities, channels and chambers between the modules. Such features are at strategic positions for substrate recognition by shape and coordination of the cleaved-off sequence. These are also the sites of greatest difference between RNase P and RNase MRP, highlighting the importance of the adaptation of this region to the different substrates.

Metal transfer from contaminated soils to plants:
the siderophore-producing bacteria connection

**Claire Ferret¹, Jean-Yves Cornu², Thibault Sterckeman³, Karine Jézéquel²,
Thierry Lebeau², Isabelle Schalk¹ et Valérie Geoffroy¹**

¹*Equipe Transport Membranaire Bactérien, Université de Strasbourg - IREBS/CNRS UMR 7242, - ILLKIRCH, France*

²*Equipe Dépollution Biologique des Sols, Université de Haute-Alsace - LVBE (EA 3991) - COLMAR, France*

³*Laboratoire Sols et Environnement, INPL (ENSAIA/INRA) - NANCY, France*

It has been shown in the literature that bioaugmentation with siderophore-producing bacteria increase heavy metals extraction by plants but the role of siderophore was not demonstrated. In contaminated soil, metals can be found in accessible form when adsorbed on mineral or less biodisponible when included in crystallized minerals.

The aim of this study was to better understand interactions between smectite, a clay mineral, and siderophores produced by fluorescent *Pseudomonas* for their ability to chelate iron and other metals n smectite. Smectites contain iron in their structure, an essential element for bacterial growth. To sustain their iron requirement, bacteria synthesized efficient iron chelator, called siderophores, which bind Fe^{3+} with a high affinity and can also interact with several others metals albeit with reduced affinity (Ni, Cd, Zn, ...). This work analysed the capacity of siderophores to chelate iron but also to solubilize other metals adsorbed on smectite. The final goal of this work is to use siderophore-producing bacteria as potential candidates for microbe-assisted phytoremediation of soil contaminated by metals.

Firstly, we tested the ability of siderophore to complex iron and metals such as nickel or cadmium adsorbed on smectite. If pyoverdine was able to solubilize iron but also Ni, it was not the case for Cd. This difference could be due to a different affinity or a different metal adsorption on smectite. Moreover, in the presence of *bacteria*, smectite grains were progressively englued in exopolysaccharides produced by the bacteria to form a biofilm stained by the yellow-green siderophore pyoverdine.

In this study, we have also demonstrated that pyoverdine didn't increase the heavy metals uptake of tomato plants when they are adsorbed on smectite. Indeed, after 2 days of exposition, no significant difference was observed in the Ni or Cd uptake by the plant compared to the assay without siderophore. Many bacterial factors could promote metal incorporation from the rhizosphere. A similar experiment is currently underway with siderophore-producing bacteria.

In conclusion, our hypothesis of siderophore promoting metal incorporation in plant seems to be more complex, involving other parameters such as biofilm formation playing a significant role in the contact between mineral-bacteria-plant interactions.

Isolement, caractérisation et activités antimicrobiennes de souches d'Actinomycètes à partir de zones arides du Sahara Algérien

SOUAGUI Yasmina¹, KECHA Mouloud¹, GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine², ROHMER Michel².

¹ *Laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A.), Université A . Mira de Bejaia. Algérie.*

E-mail : yasouagui@hotmail.fr

² *Université Louis Pasteur/CNRS-UMR 7123, Institut Le Bel, Strasbourg. France.*

L'émergence de la résistance des bactéries et des champignons pathogènes aux antibiotiques communément utilisés, constitue actuellement un problème très épineux. Pour combattre cette situation alarmante, de nouvelles biomolécules sont nécessaires. Les antibiotiques d'origine naturelle sont produits en majorité par les micro-organismes, en particulier par les actinomycètes.

Les actinomycètes sont des bactéries à GRAM positif dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, ils présentent des caractéristiques morphologiques et chimiques spécifiques. Les actinomycètes sont les producteurs prolifiques des produits naturels bioactifs (les antibiotiques, herbicides, antiviraux, anticancéreux...) d'un point de vue diversité en structure chimique.

Notre objectif principal, est l'exploitation des zones arides et des environnements hostiles du sol Saharien pour l'isolement de souches rares d'actinomycètes et leur criblage pour des activités antibiotiques.

Des souches d'actinomycètes (14 souches) isolées de trois régions d'Algérie (zones arides) (Ghardaïa, El-Djelfa et Boussaâda), sur cinq milieux de cultures différents; ces souches ont fait l'objet d'une sélection sur la base de leurs activités antibactériennes vis-à-vis de 08 germes cibles pathogènes (Gram+ et Gram-) et antifongiques vis-à-vis de 15 germes cibles pathogènes (moisissures). Elles ont montré, pour la plupart, une excellente activité antifongique vis-à-vis de tous les germes cibles, une activité antibactérienne remarquable contre les à G-, cependant, elles possèdent de faibles activités vis-à-vis les à G+.

La caractérisation macro et micro morphologique a révélé que certaines de ces souches appartiennent à des genres rares d'actinomycètes à savoir : *Saccharothrix*, *Nocardiopsis*...

Des cultures sur milieu liquide (M2) ont été réalisées et le meilleur solvant d'extraction a été choisi pour certaines souches et début de purification des molécules bioactives.

Mots clés : Actinomycètes, caractérisation, antifongiques, zones arides, Sahara.

Arsenic effects on metabolism and motility in *Rhizobium* sp. NT-26

L. Geist¹, J. Andres¹, J. Santini², F. Arsène-Ploetze¹, P.N. Bertin¹

¹ *Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR7156 CNRS & Université de Strasbourg, Strasbourg, 67083, France*

² *Division of Biosciences, Institute of Structural and Molecular Biology, University College London, London, UK*

Arsenic is widespread in the environment and its effects on the physiology of bacteria are multiple. To study the bacterial response to arsenic, *Rhizobium* sp. NT-26 (Santini *et al.*, 2000) has been used as a model organism because of marked phenotypes and the availability of genetic tools. Microarrays, differential proteomics (Weiss *et al.*, 2009), random mutagenesis (Tang *et al.*, 1999) and physiological tests were performed to study the effects of arsenic on this organism. The results suggest a possible link between arsenite oxidation and motility. According to these observations, arsenic stress induces many metabolic pathways and has an impact on colonization processes. A more detailed study of the various mutants we obtained will lead to a better understanding of the motility regulation in the presence of arsenic. As motility is closely linked to biofilm formation, experiments will be performed to test the impact of arsenic on this process.

References:

Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., and Macy, J.M. (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* **66**: 92-97.

Weiss, S., C. Carapito, J. Cleiss, S. Koechler, E. Turlin, J. Y. Coppee, M. Heymann, V. Kugler, M. Stauffert, S. Cruveiller, C. Médigue, A. Van Dorsselaer, P. N. Bertin & F. Arsène-Ploetze, (2009) Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data. *Biochimie* **91**: 192-203.

Tang, X., Lu, B.F., and Pan, S.Q. (1999) A bifunctional transposon mini-Tn5*gfp-km* which can be used to select for promoter fusions and report gene expression levels in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 37-42.

Quantification of the PCB-degrading bacteria *Burkholderia xenovorans* LB400 in contaminated soils by a real-time PCR (RT-PCR) targeting an ITS sequence.

Secher C., Norini M.P., Lollier M., Jezequel K., Cornu J.Y., Lebeau T.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are toxic pollutants used in many industrial applications until 1978. Unfortunately various environments were regularly contaminated by these compounds. Due to their lipophilic properties, PCBs accumulate in biota and food chain. They are dangerous for humans and have to be removed. Several physicochemical treatments commonly used to decontaminate polluted soils include thermal desorption and reductive dechlorination. However, these treatments are highly energy-consuming and produce a lot of wastes. Low-cost biological treatments like bioaugmentation can be implemented *in situ* and allows maintaining the physicochemical properties of porous matrices to be cleaned-up (soil, sediment).

Many studies showed that *Burkholderia xenovorans* LB400 is one of the most successful bacteria for organic compound degradation including PCBs (Rodrigues *et al.*, 2006). Coupling these bacteria with plants (plant-assisted bioremediation) used as exudate suppliers may be relevant to stabilize the *in situ* degrading activity in spite of the spatial and temporal variability of open ecosystems (Mackova *et al.*, 2007). As a result it could be used for soil or sediment cleaning-up.

Soil or sediment colonization by inoculated bacteria must be monitored after inoculation in the aim at estimating their survival which is correlated with PCBs degradation. Several methods are available (e.g., *gfp*-tagged bacteria), but only real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) allows to accurately count the inoculated microbial population without introducing genetically modified bacteria.

In this study, a RT-PCR method targeting an internal transcribed spacer (ITS) sequence located between the 16S DNAr and the 23S DNAr genes and specific to *B. xenovorans* LB400 was developed. RT-PCR has been tested with several strains belonging to *Burkholderia* genus and bacteria living in soil (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, etc) and amplification products have been sequenced. Only *B. xenovorans* LB400 was amplified. This method will allow us to quantify this strain after its inoculation in PCBs-contaminated soils.

Mackova *et al.* (2009). Environ. Sci. Pollut. Res., 16:817 – 829

Rodrigues *et al.* (2006). Appl. Environ. Microbiol., 72 :2476 - 2482

HlgC/HlgB and PVL Induce Calcium Influx In hPMNs Through Different Pathways.

Mira Tawk¹, Emmanuel Jover², Benoît-Joseph Laventie¹, Raymonde Girardot¹, Bernard Poulain², Gilles Prévost¹

¹ *Institut de Bactériologie, Université de Strasbourg, Physiopathologie et Médecine Translationnelle EA-4438; 3 rue Koeberlé ; F-67000 Strasbourg*

² *INCI – UPR-CNRS 3212 ; Neurotransmission et sécrétion neuroendocrine ; 5, rue Blaise Pascal ; F-67084 Strasbourg cedex*

The gamma-hemolysin HlgC/HlgB and the Panton and Valentine leukocidin are two pore-forming toxins secreted by *Staphylococcus aureus*. These bicomponent leukotoxins bind to the human PMNs cell membrane and form an octameric prepore before the pore formation. The prepores are sufficient to induce a calcium influx regardless to the pore formation. The aim of our study is to identify the calcium entry pathways activated by these leukotoxins by using different inhibitors of calcium channels and immunocytochemistry. The structural similarities between these two leukotoxins suggested that their mode of action would be similar (1). But surprisingly, the use of the different inhibitors shows that HlgC/HlgB and PVL activate different Ca²⁺ entry pathways. The rise of the free intracellular calcium induced by the leukotoxins is monitored by using Fura-2 calcium probe. First, the origin of the Ca²⁺ influx due to the leukotoxins seems to be intracellular and extracellular. The use of drugs targeting the refilling of intracellular Ca²⁺ stores (Thapsigargin, Ionomycin) and antagonists of the store operated Ca²⁺ entry (SOCE) complex (2APB, Gd³⁺) suggested that the endoplasmic reticulum (ER) and SOCE complex play a role for the two leukotoxins while the ionomycin-sensitive acidic stores seems to be involved only in the case of HlgC/HlgB. Confocal analysis of immunolabelled hPMNs revealed the internalization of the two leukotoxins and their co-localisation in internal compartment with STIM-1 (Stromal interacting molecule), which senses the depletion of Ca²⁺ from ER and induces the activation of ORAI1 channels in the SOCE complex (2)(3). However, when the SOCE complex was blocked, it was obvious that some other channels remained involved in the Ca²⁺ influx. These channels could be the arachidonic acid sensitive channels (ARC) (4), a combination of ORAI1 and ORAI3 proteins. Our results suggest that the two leukotoxins are not identical, that the SOCE complex is implicated in the Ca²⁺ influx and that the leukotoxins are internalized and co-localize with STIM1.

(1) Gauduchon et al, *Infect Immun* (2001) 69(4): 2390-2395.

(2) Liou J et al, *Curr Biol* (2005) 15, 1235- 1241.

(3) Roos J et al, *J Cell Biol* (2005) 169, 435- 445.

(4) Shuttleworth et al, *Cell Calcium* (2007) 42: 183-191

Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in a non-hepatic cell line

Daniel Da Costa^{1,2}, Marine Turek^{1,2}, Erika Girardi³, Sébastien Pfeffer³, Ralf Bartenschlager⁴, Mirjam B. Zeisel^{1,2} and Thomas F. Baumert^{1,2,5}

¹*Inserm, U748, Strasbourg, France ;* ²*Université de Strasbourg, Strasbourg, France ;* ³*Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Strasbourg, France ;* ⁴*The Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany;* ⁵*Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France*

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health burden. To date, no vaccine is available and current antivirals are limited. HCV is a small enveloped positive-strand RNA virus. *In vivo*, HCV infects only humans and chimpanzees. The liver is the primary target organ of HCV, and the hepatocyte is its primary target cell. The human hepatoma cell line Huh7 and its derivatives are the only cell lines supporting the entire HCV life cycle *in vitro*. While tremendous progress has been made over the past years in deciphering the HCV life cycle in these cells, the factors restricting HCV infection to human hepatocytes have not been defined yet. Using the knowledge about the host factors required for HCV-hepatocyte interactions and HCV non-permissive human kidney-derived cells, we reconstituted the entire HCV life cycle in the non-hepatic cell line 293T. Indeed, expression of the four main HCV entry factors CD81, OCLN, CLDN-1 and SR-B1 in 293T cells rendered these cells highly permissive to HCV entry. Further expression of the microRNA 122, a key HCV replication factor, allowed robust replication of HCV RNA in 293T cells. Finally, the subsequent expression of the known assembly factor apolipoprotein E allowed the completion of the viral life cycle as demonstrated by assembly and release of infectious viral particles from 293T cells. Taken together, this study shows for the first time a true and robust HCV infection of non-hepatic cells and highlight key host factors required for the liver tropism of HCV.