

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement



Annabelle Merieau
Olivier Lesouhaitier

LMSM EA 4312
University of Rouen – Evreux, France
www.lmsm.fr



- **1987-2008 : Laboratoire de Microbiologie du Froid (LMDF)**

Adaptation de bactéries à la température, plus spécifiquement au froid.



- **2008-2011 Laboratoire de Microbiologie du Froid
Signaux et Micro-Environnement (LMDF-SME)**

*Impact du micro-environnement et des signaux bactériens et eucaryotes
sur l'adaptation microbienne*

- **2011-2016 Laboratoire de Microbiologie Signaux et Micro-Environnement
(LMSM)**

*Rôle de la communication et des facteurs environnementaux ou eucaryotes dans
l'adaptation et la virulence bactériennes*



Situé à Evreux sur le site de l'IUT

Composition de l'Unité (effectif moyen 40 personnes)

14 Enseignants - Chercheurs (dont 6 titulaires de PEDR/PES)

4 techniciens et personnel administratif (dont 1 seul Titulaire)

5 Chercheurs Post-Doctorants contractuels

5 CDD contractuels 1 à 3 ans (Contrats ANR, FUI, FEDER...)

→ + 2 ATER début 2013

12 Doctorants

2 Allocations MNESR

6 Allocations Régionales (GRR ou co-financées)

1 CIFRE

2 Contrats Doctoraux (supportés par contrat FUI)

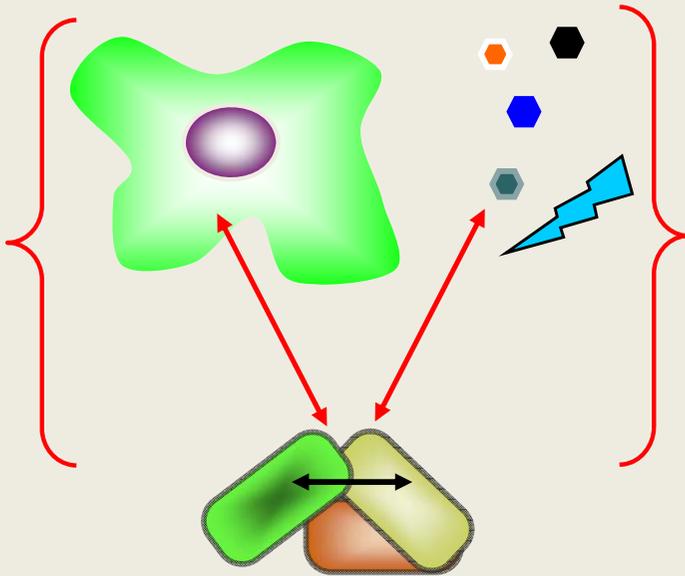
1 Allocation étranger

2 Doctorants en co-direction

4 Stagiaires M1 et M2

Bactéries et microenvironnement

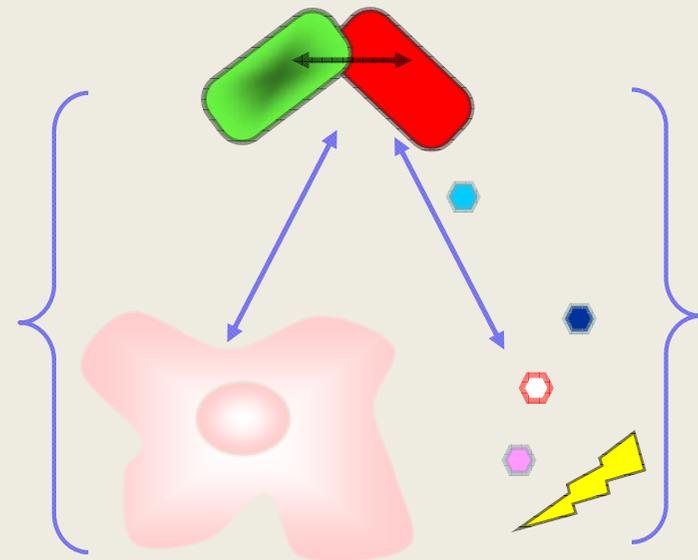
Microenvironnement 1



Adaptation

Mort

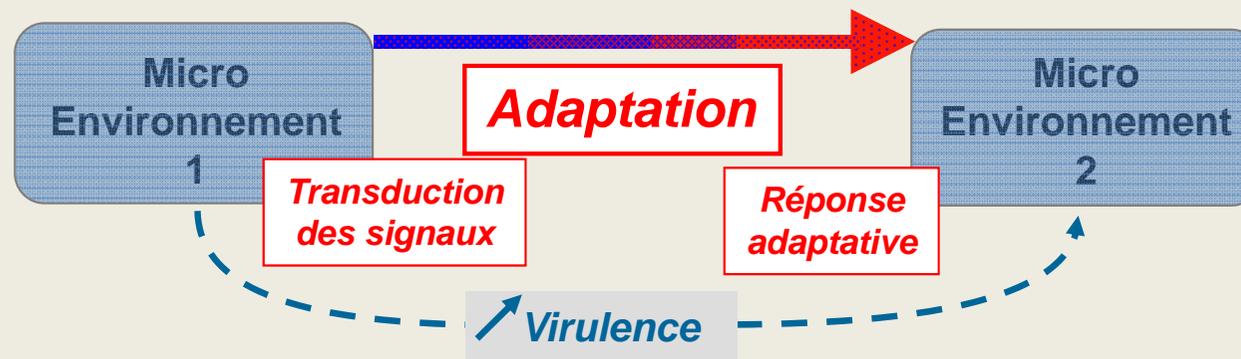
Microenvironnement 2



Une bactérie est indissociable de son Micro-environnement et en est une composante: système dynamique non linéaire

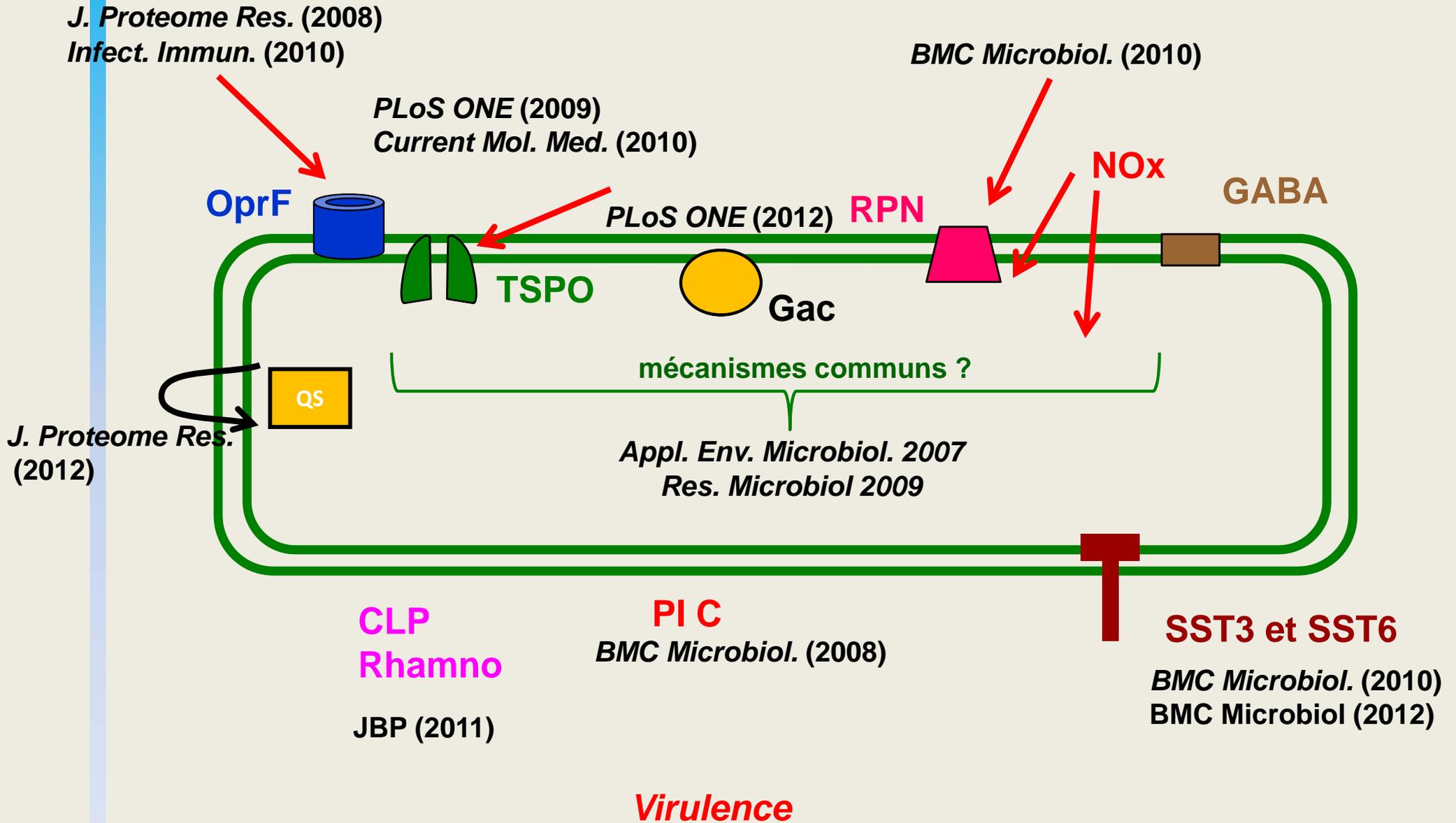
Thématique:

Rôle de la communication et des facteurs environnementaux ou eucaryotes dans l'adaptation et la virulence bactériennes

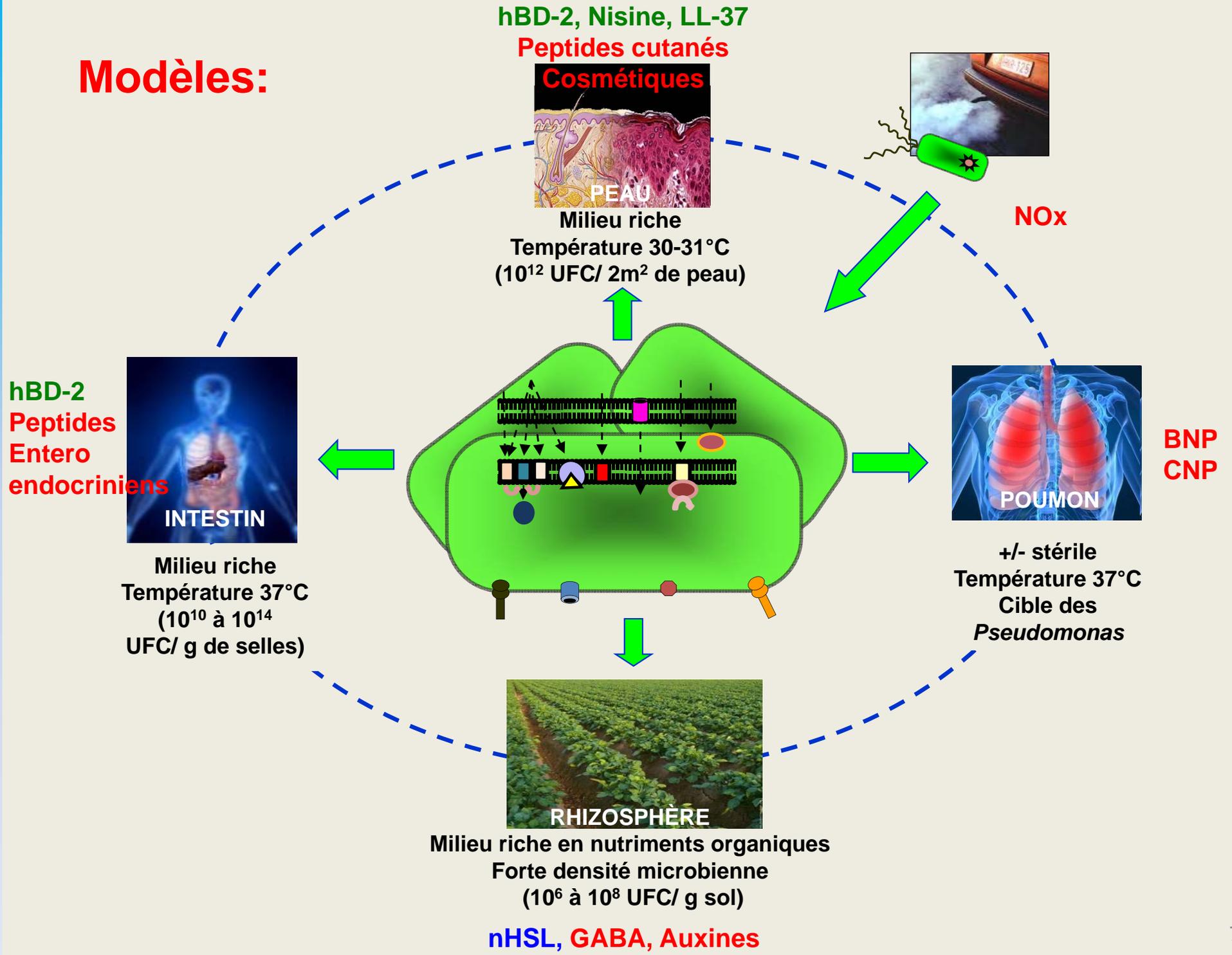


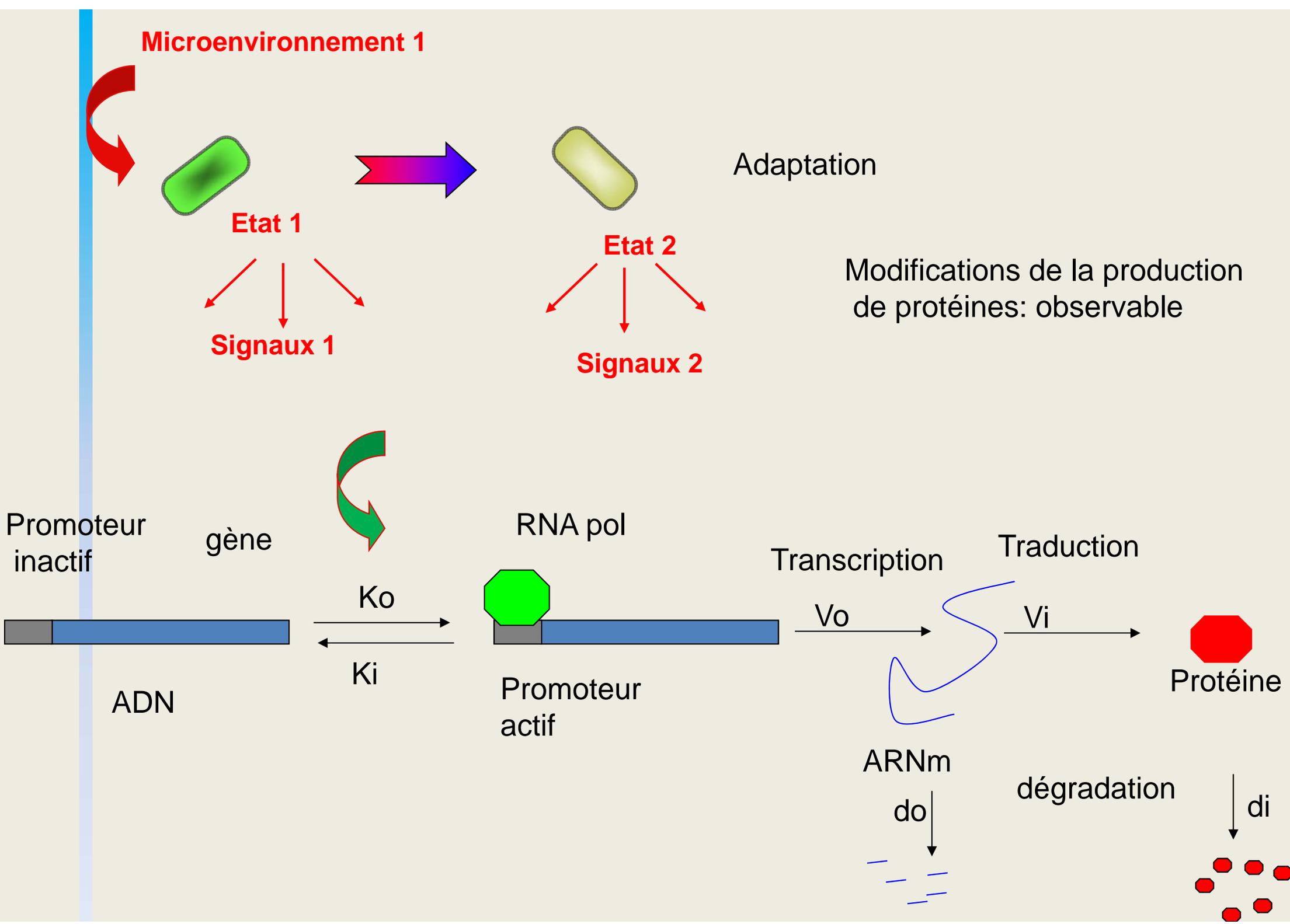
- ***Adaptation des bactéries à leur environnement***
- ***Interactions bactéries-cellules eucaryotes***
- ***Senseurs et protéines membranaires dans la communication***
- ***Sécrétion, matrice extracellulaire et adaptation***

Transduction des Signaux du Microenvironnement



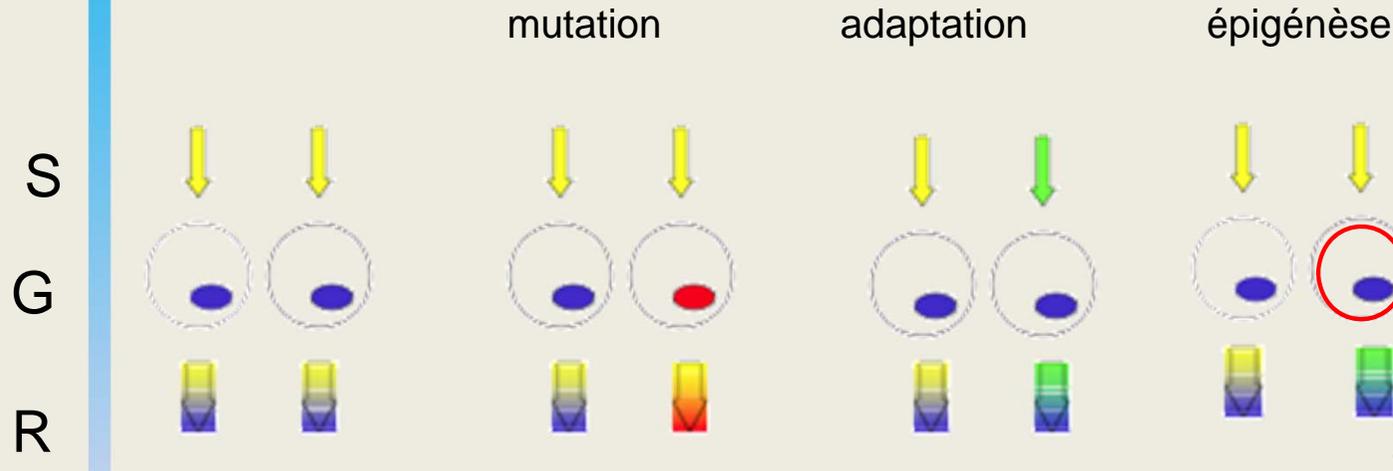
Modèles:





épigénèse

Déterminisme: Spécificité de réponse à un signal donné pour un génotype donné



Existence de plusieurs états stables pour une bactérie à génome constant dans un environnement

Causes de la multistationnarité?

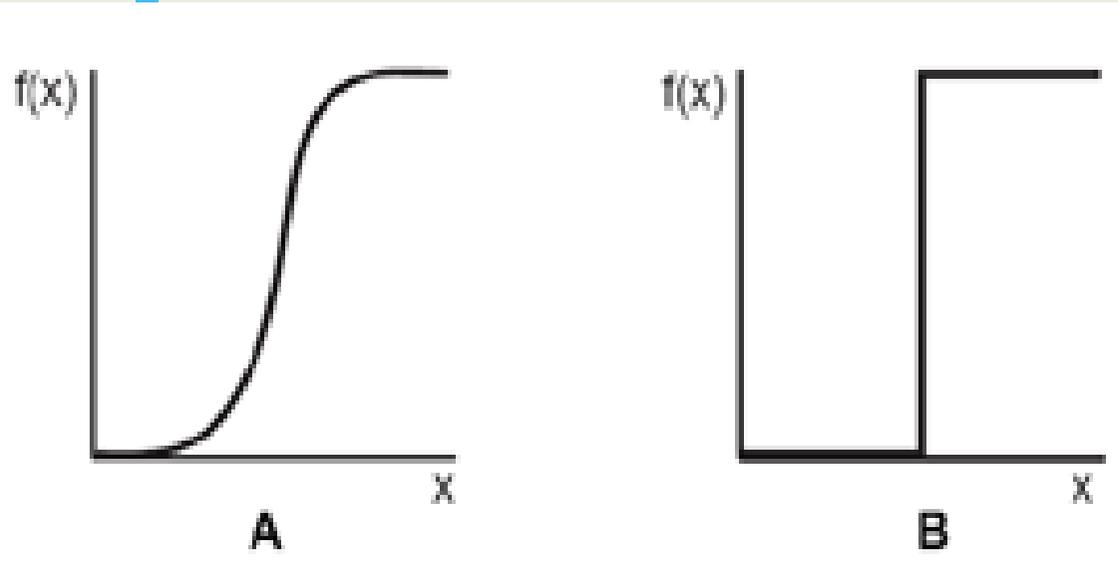
KB

œuf

Elle ne se produit que dans un système dynamique non linéaire

Elle nécessite **qu'un circuit de rétroaction positive** se produise parmi les interactions (condition nécessaire mais non suffisante de R.Thomas). Cela dépend de la valeur des paramètres.

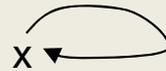
La majorité des réactions mises en jeu dans les réseaux de régulation génétiques (protéine/ADN, protéine/protéine) sont sigmoïdes



on peut donc simuler un réseau de régulation à l'aide d'un automate cellulaire fonctionnant avec les règles de l'algèbre booléenne

(A) Interaction non linéaire (dans ce cas une sigmoïde) simplifiée (B) en une fonction en escalier. $f(x)$ est le taux d'expression d'un gène régulé, tracé en fonction de x , la concentration du régulateur positif.

Exemple d'une autorégulation positive



x est le produit d'un gène

Si x est présent : $x=1$, si x est absent : $x=0$

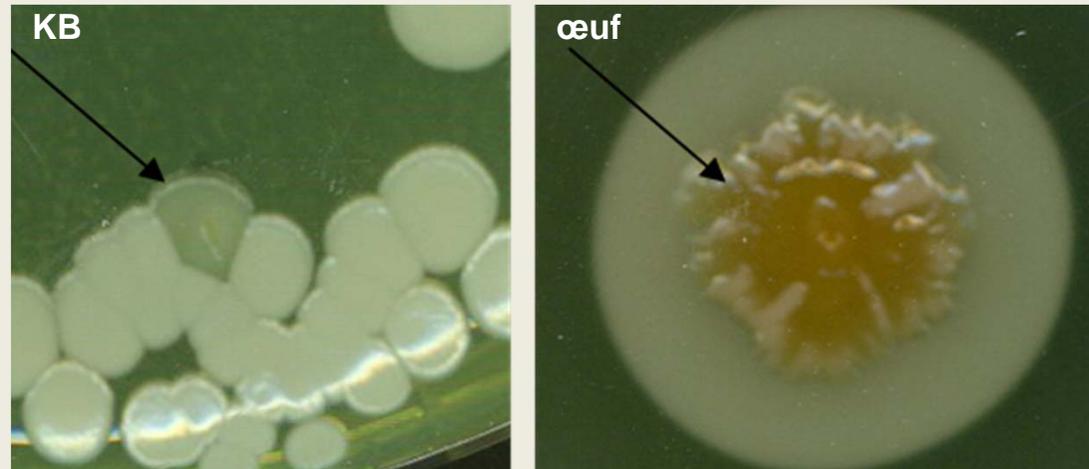
X production de x : $X = f(x) = k_i \cdot x$ avec k_i fonction booléenne = 1

x	X
0	0
1	1

Deux états stables = Multistationnarité = épigénèse

Exemple de la régulation des Biosurfactants chez *Pseudomonas fluorescens*

Variants phénotypique chez MFN1032



Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. Rossignol G, Merieau A, Guerillon J, Veron W, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ and Orange N. BMC Microbiology 2008, 8:189

Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032. Rossignol G, Sperandio D, Guerillon J, Duclairoir Poc C, Soum-Soutera E, Orange N, Feuilloley MG, Merieau A. Res Microbiol. 2009 Jun;160(5):337-44.

Boolean models of biosurfactants production in *Pseudomonas fluorescens*. Richard A, Rossignol G, Comet JP, Bernot G, Guespin-Michel J, Merieau A. PLoS One 2012 7(1): e24651

- Figure 3. A minimal consistent Boolean network with 4 components.

4-components consistent network

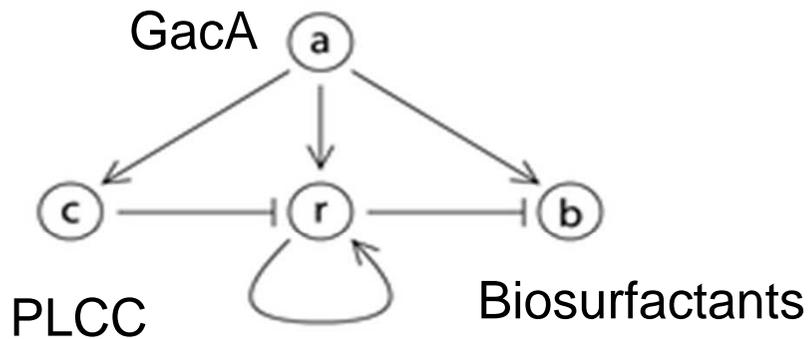
$$f_a(x) = 1$$

$$f_c(x) = x_a$$

$$f_r(x) = x_a \text{ AND } ((\text{NOT } x_c) \text{ OR } x_r)$$

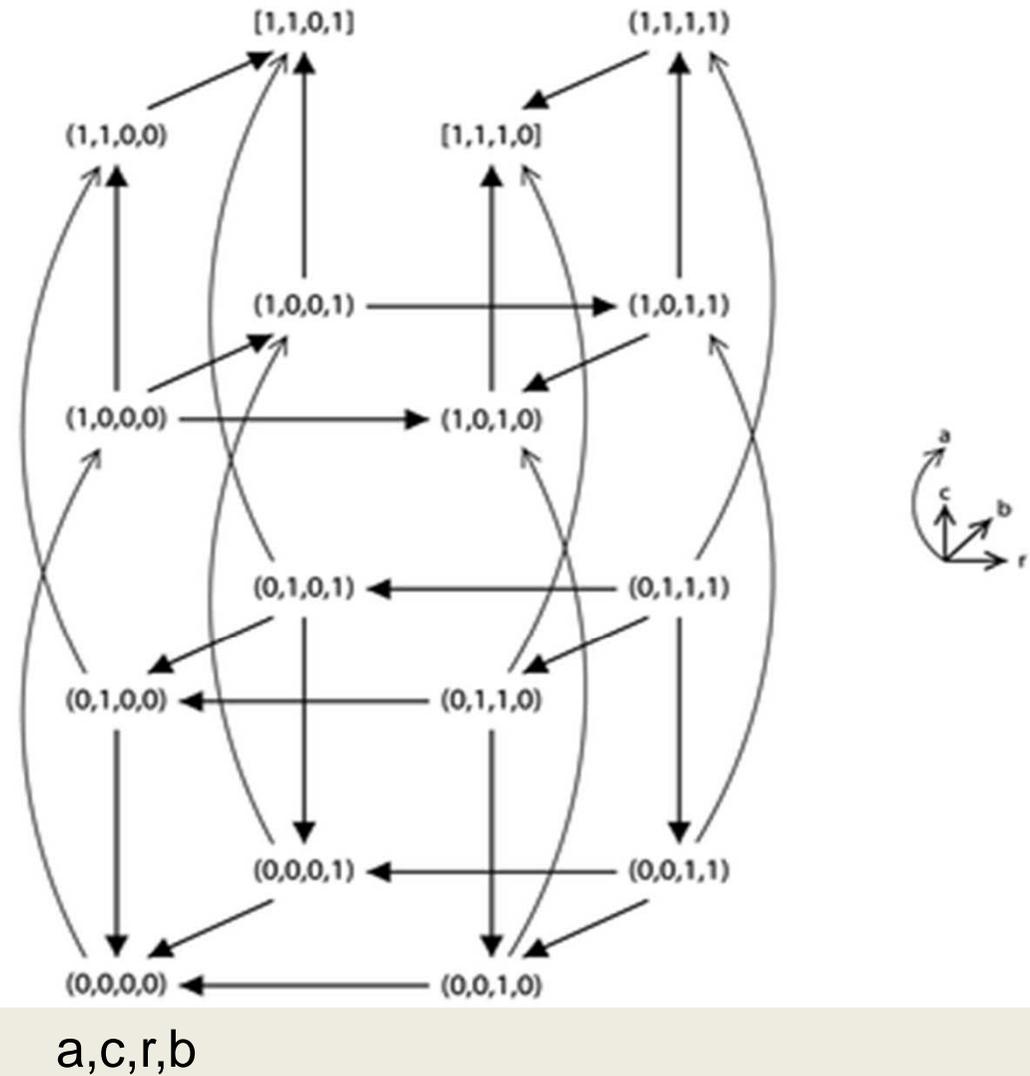
$$f_b(x) = x_a \text{ AND } (\text{NOT } x_r)$$

Interaction graph

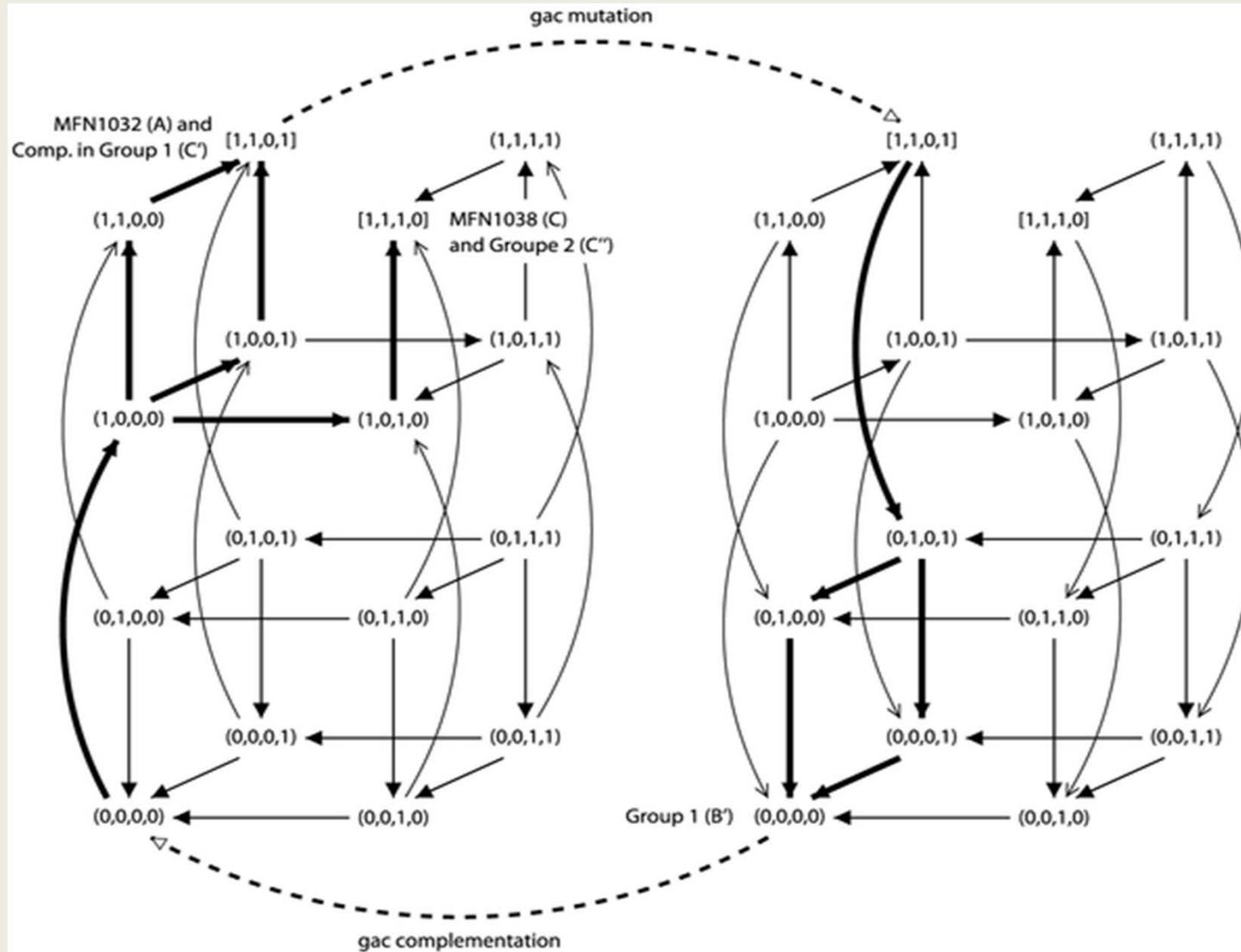


Variants groupe 1

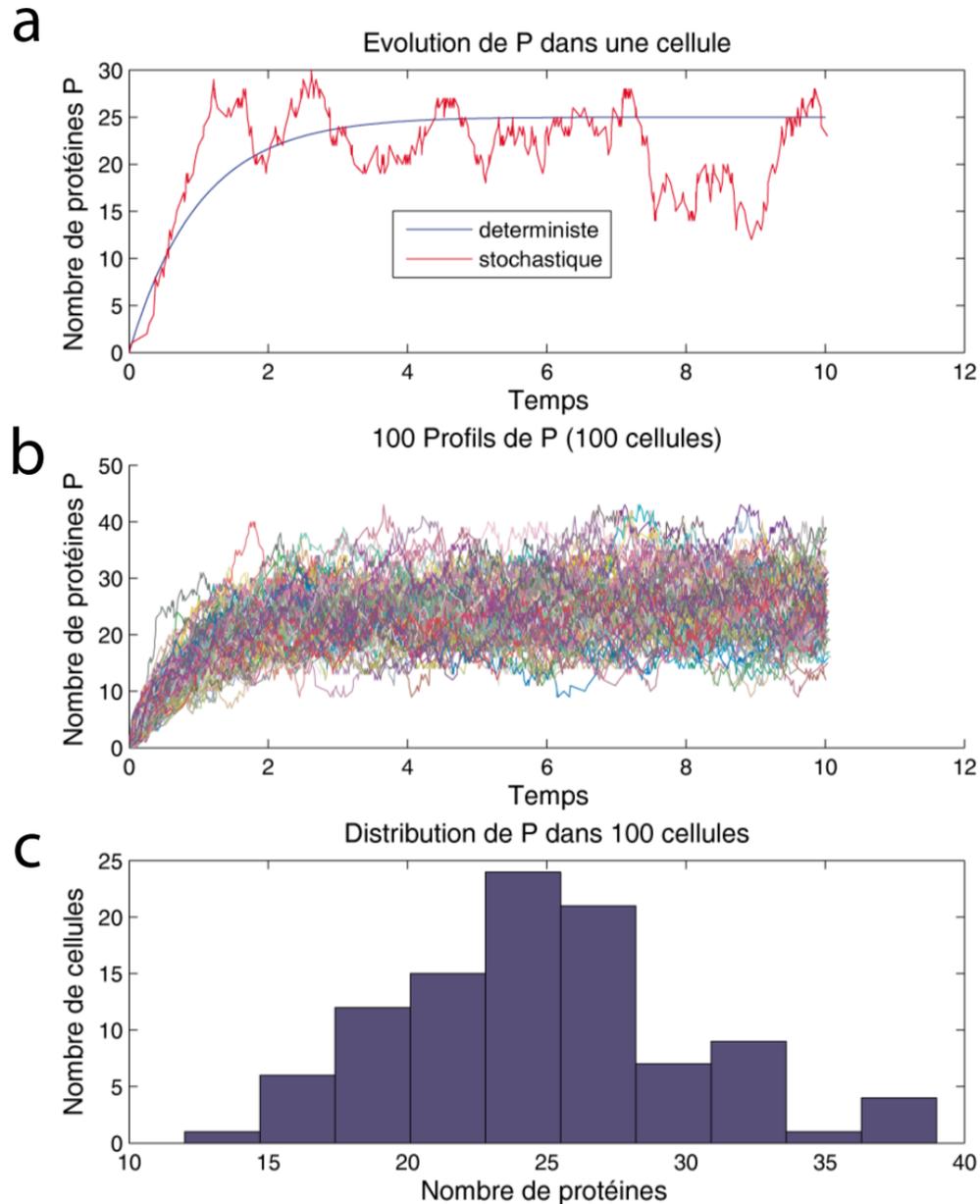
Asynchronous state graph



- Figure 5. Illustration of property

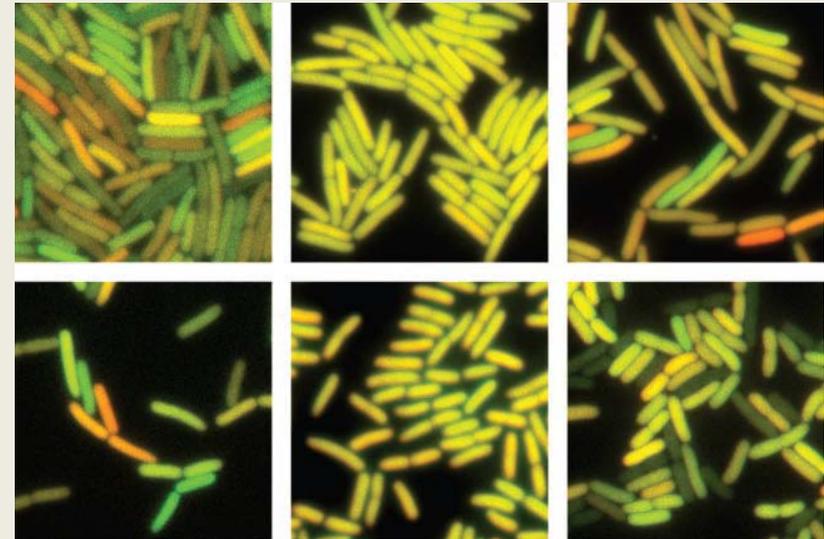


Simulation stochastique réalisée à l'aide de l'algorithme de Gillespie



Reste à caractériser R: plusieurs candidats comment trier?

- Molécule en faible concentration
- Variation stochastique d'expression, bruit fort:
- Distribution bimodale
- Utilisation de gènes rapporteurs
- Kolmogorov-Smirnov test



Tests statistiques de survie

Objectif

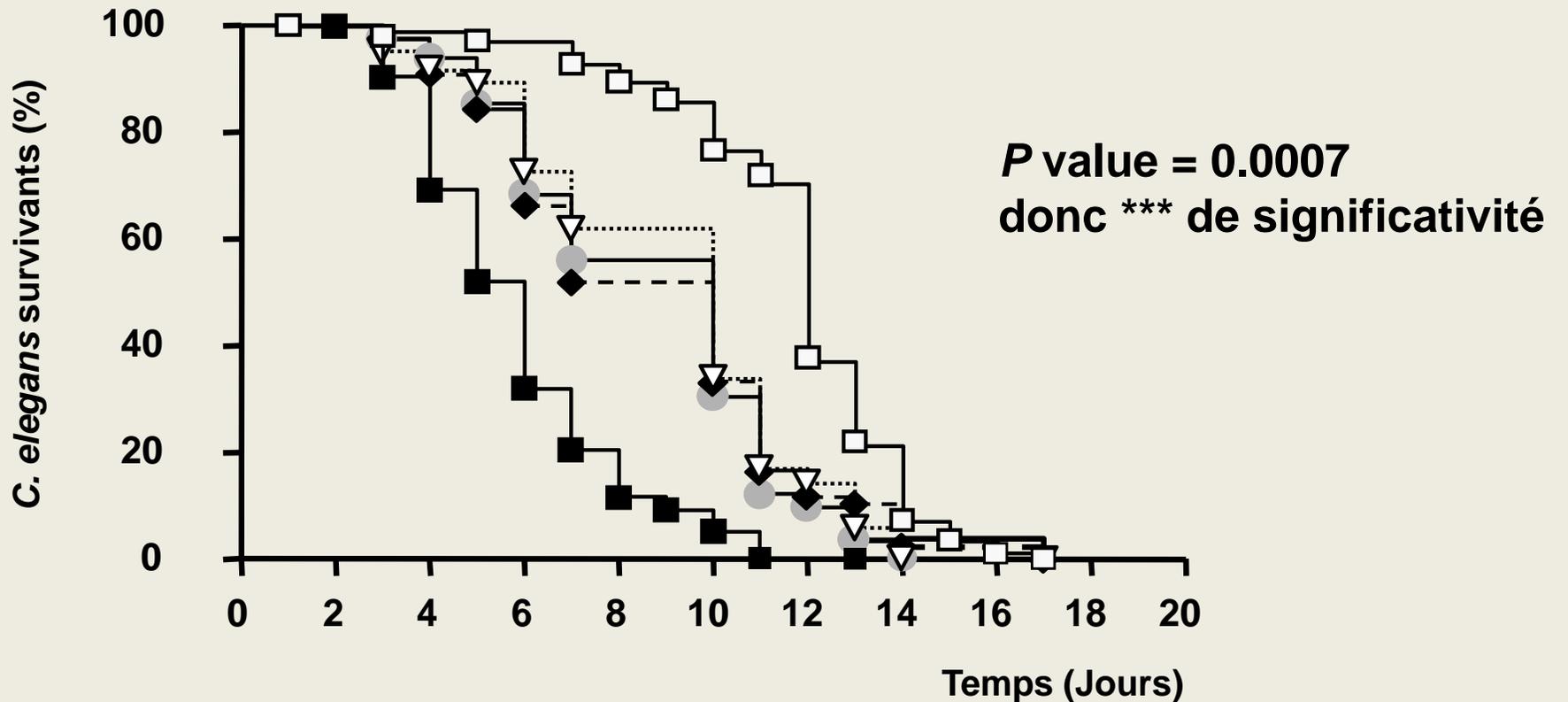
Déterminer l'effet « mortel » de bactéries vis-à-vis d'un animal (*C. elegans*) et comparer cet effet entre différentes bactéries

Outils

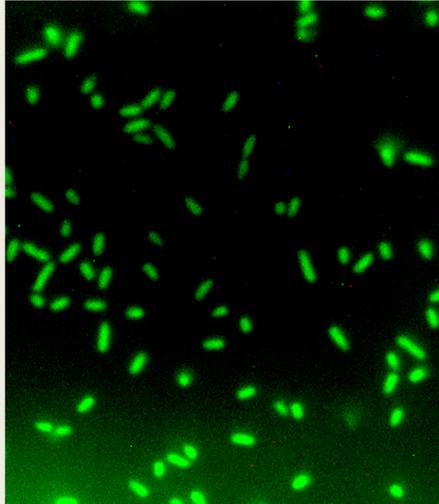
Log Rank Test (déjà utilisé grâce à Vlad Barbu).

Spearman's rank test ou encore Fisher's exact test????

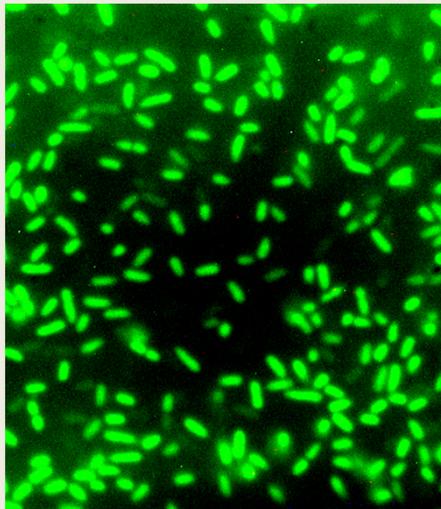
Résultats



Adhésion des bactéries sur lame de verre (2 h)



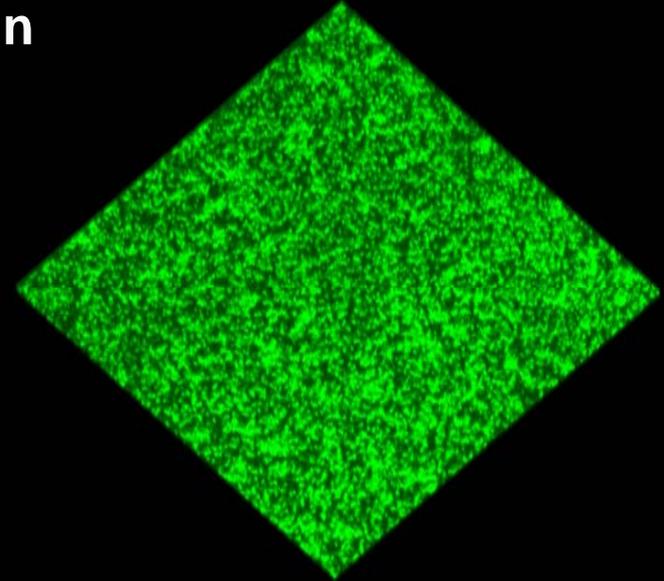
PAO1



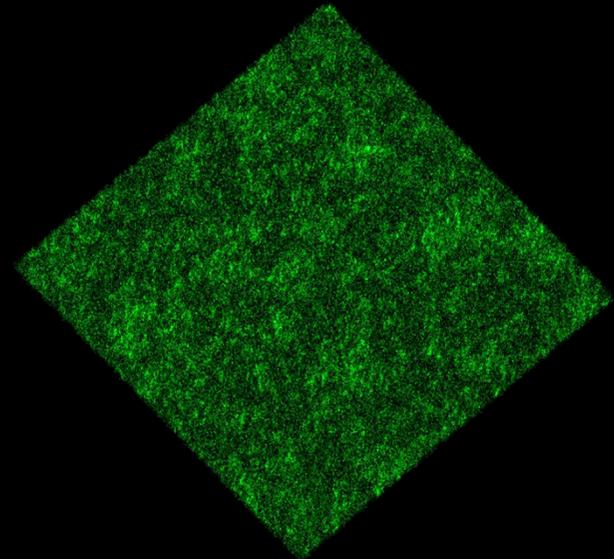
PAO1 + CNP

Adhésion des bactéries sur lame de verre (24h)

Témoin



CNP



Interfaces avec mathématiques:

- Modélisation des interactions ligand-senseur
(séquences et structures 3D connues)
Etude de liaison *In-silico* entre protéine senseur hypothétique de molécule de communication (calcul K_d/K_a théoriques)
Etude des liaisons *In-silico* protéines/proteines ou protéines/ADN
(exploration des mécanismes de régulation)
- Modélisation des états stables potentiels d'une même protéine
Existence de plusieurs configurations métastables selon environnement
- Modélisation de flux/échanges de gènes dans une population bactérienne
- Etude de boucles de régulation positives
- Traitement de l'image (imagerie confocale, imagerie MALDI)

Mathematical Models for Infectious Disease Dynamics

4-15 February 2013

[Wellcome Trust Genome Campus](#), Hinxton, Cambridge, UK

Course summary

modelling of infectious diseases, including:

Population dynamics

Deterministic and stochastic models

Network analysis

Within-host dynamics of viral and bacterial infections

Mathematical review (calculus, probabilities...)

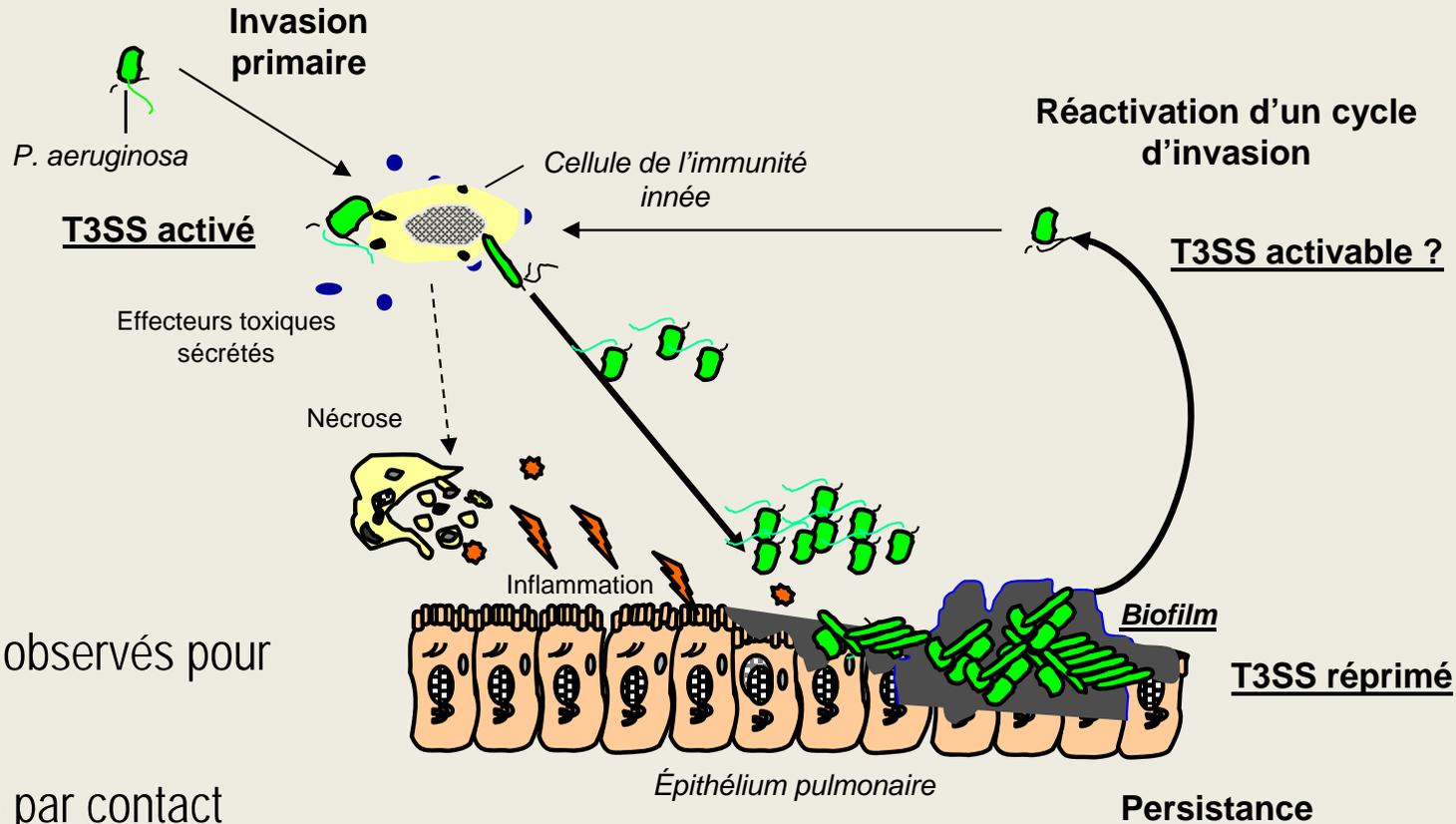
Applied programming with R

Statistical modelling

Computer-based simulations

Merci de votre attention

Modèle d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*



Deux phénotypes observés pour le T3SS

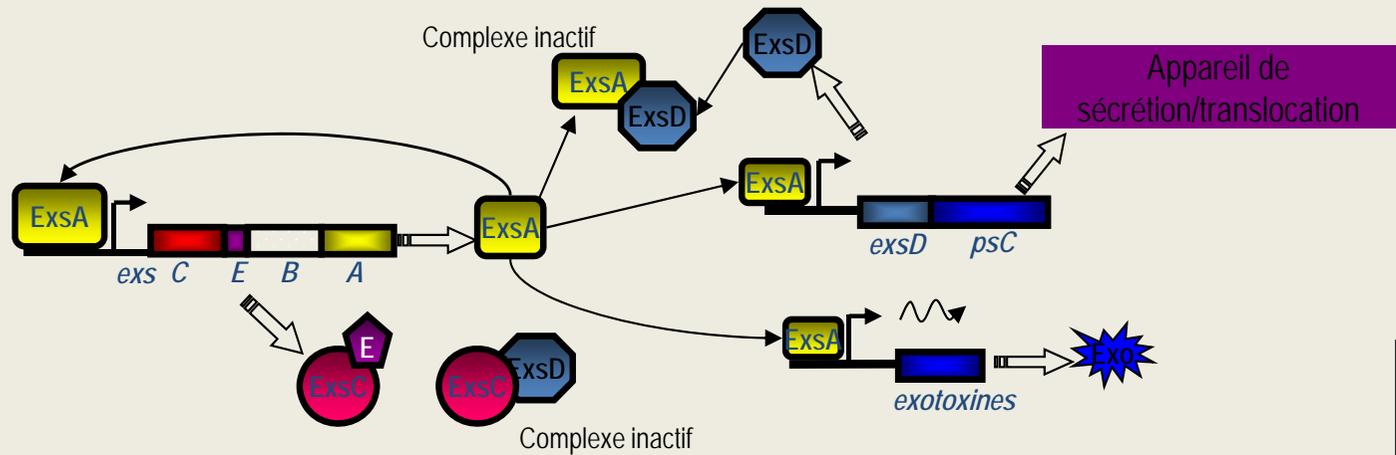
- T3SS inductible par contact cellulaire ou par la déplétion calcique.

- T3SS non inductible

Population Bactérienne

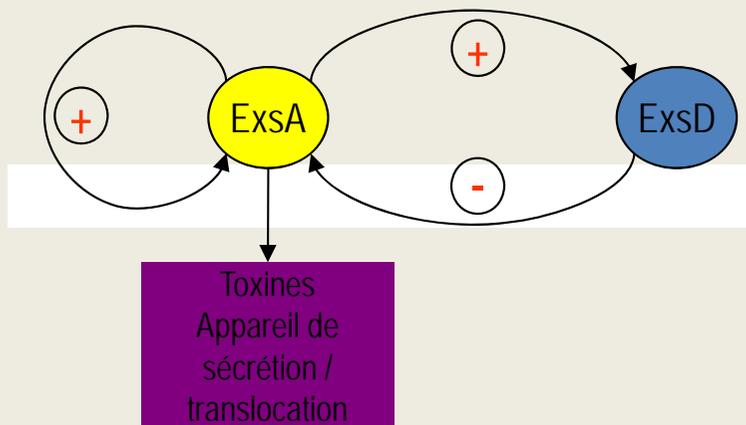


Modélisation de la régulation du T3SS (1) : logique généralisée

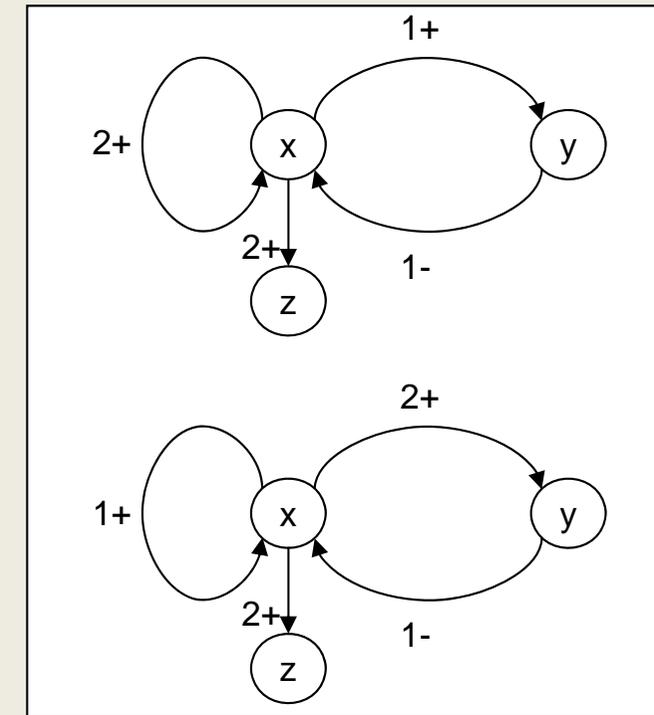


x = ExsA
 y = ExsD
 z = Toxines
 Appareil de sécrétion /translocation

Modèle restreint supportant l'hypothèse épigénétique



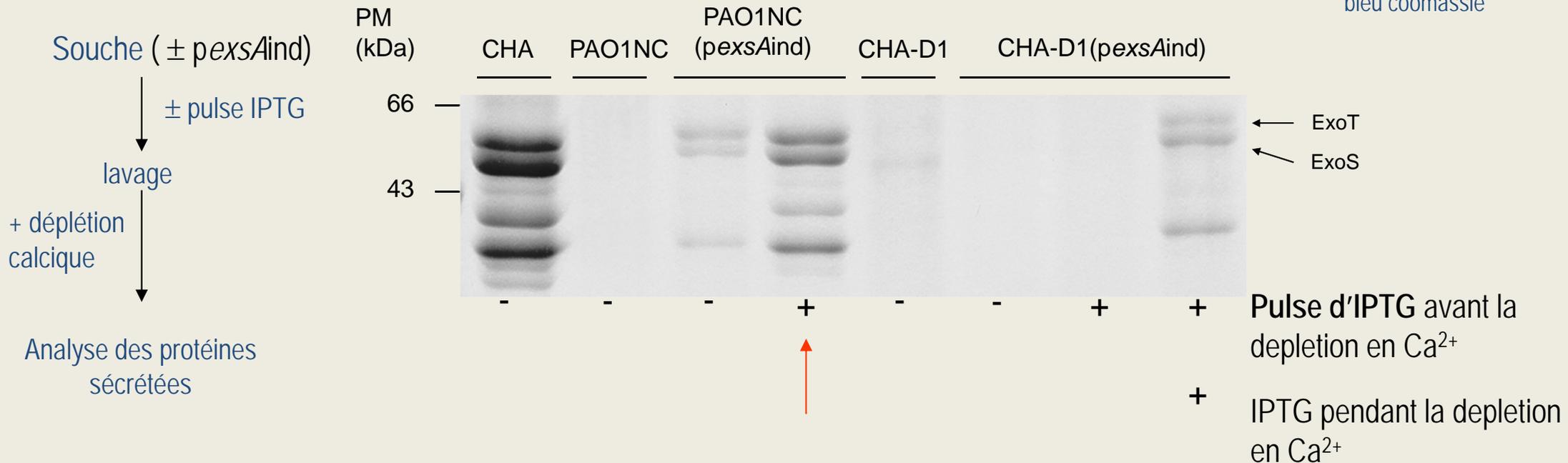
Sensibilité à ExsA différente selon les promoteurs
 Deux niveaux ou concentrations d'action d'ExsA



T3SS et modification épigénétique

Profil de sécrétion après une expression transitoire d'ExsA

SDS PAGE - coloration bleu coomassie



→ Une surexpression transitoire d'ExsA permet de basculer le phénotype de la souche PAO1NC de non inductible à inductible

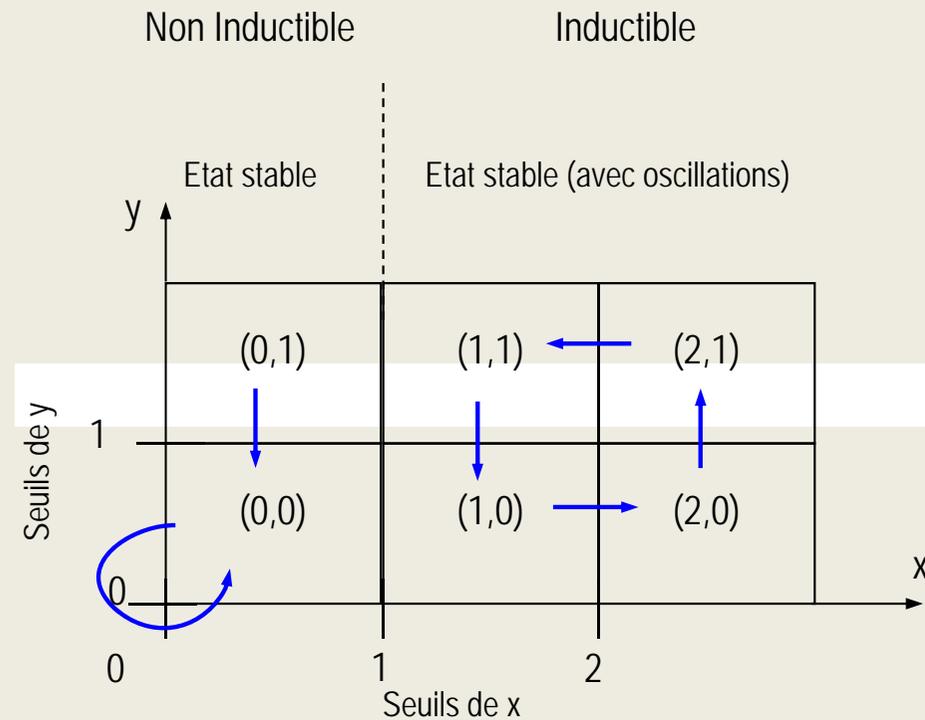
→ PAO1NC n'est pas mutée au niveau du gène *exsA*

La boucle de rétroaction positive est bien la cause de l'inductibilité

→ L'hypothèse épigénétique pour l'inductibilité du T3SS est validée

x = ExsA
y = ExsD
z = Toxines
Appareil de sécrétion
/translocation

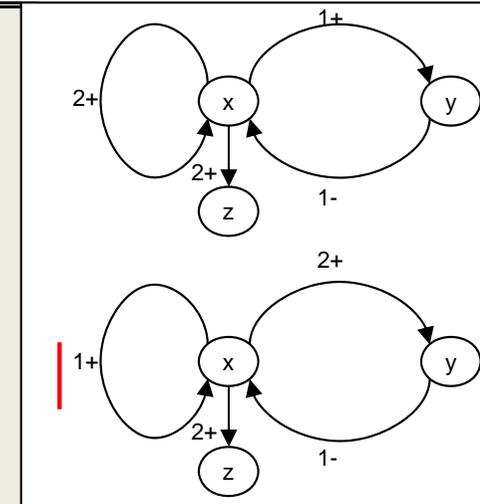
Phénotype du T3SS



Graphe d'état

Table 3

xy	XY
00	0 0
0 $\bar{1}$	00
0 $\bar{1}$	00
10	20
1 $\bar{1}$	10
20	21
2 $\bar{1}$	11



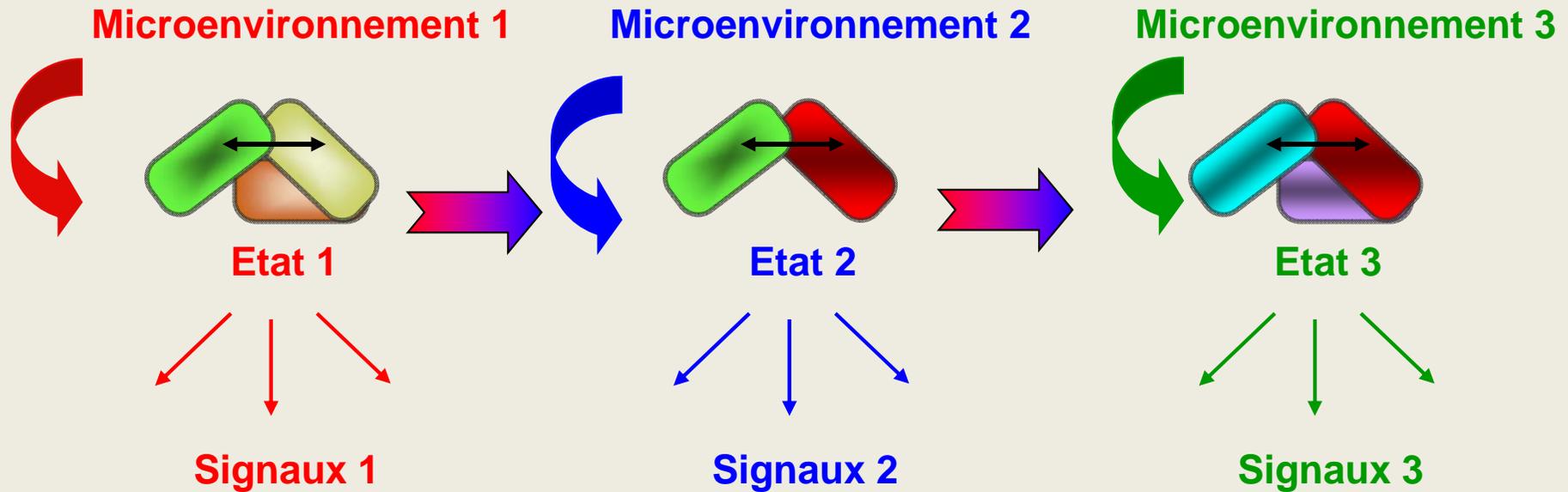
Deux états stables possibles pour une des dynamiques du modèle du T3SS

La modification du niveau de y ne permet pas le passage de l'un à l'autre

Seule la modification du niveau de x même de courte durée permet de basculer d'état

➔ Un phénomène de bistabilité peut exister pour ce modèle du T3SS

Le microenvironnement, moteur de l'évolution bactérienne



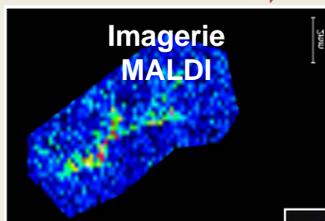
→ Un échange constant entre bactérie et microenvironnement
→ Co-adaptation / Co-evolution

Principaux équipements

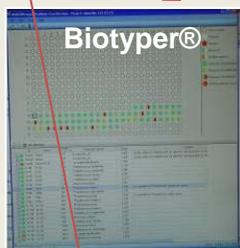


MALDI-TOF/TOF
(Autoflex III TOF/TOF 200 Bruker)

Protéomique
Lipidomique



**Imagerie
MALDI**



Biotyper®



**Couplage SPR
MALDI**



Microscope Confocal à Balayage Laser
(ZEISS LSM 710)
(Upgradé Diode 405 nm)



Résonance Plasmonique de Surface
(SPRi-Plex II Horiba-Jobin Yvon)



Incubateur/lecteur continu
thermostaté multimodal
(Fix-Xenius XM SAFAS)

Incubateur/lecteur continu
(Bioscreen)



Tensiomètre thermostaté
(Krüss)

Séquenceur ADN megaBACE
(Amersham)