

Université du Québec

Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

ROLE DE LA NUCLEASE SIMPLE-BRIN SSNA DANS LA RELATION HOTE-BACTERIE

Lola Cusin-Panit

Mémoire pour l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En Sciences expérimentales de la Santé bidiplomation avec U. Clermont-Ferrand

Programme offert conjointement par l'INRS et l'Université Clermont Auvergne

Président du jury et examinateur interne

Philippe Constant

INRS Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examinateur externe

Marylise Duperthuy

Université de Montréal

Directeur de recherche

Frédéric Veyrier

INRS Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Directrice de recherche externe

Mahchid Bamdad

IUT – Université Clermont Auvergne

RÉSUMÉ

L'étude de l'évolution des espèces bactériennes est essentielle pour comprendre les mécanismes de pathogénicité et d'adaptation, offrant ainsi des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de gestion des infections bactériennes. L'identification d'une nucléase simple brin dans le génome de *Neisseria meningitidis* a ouvert la voie à une meilleure compréhension de la régulation de la compétence naturelle, mécanisme de transfert horizontal de gènes majeur chez les bactéries du genre *Neisseria*. Ce rapport explore l'importance de la nucléase simple brin SsnA dans la variation antigénique de la protéine piline *pilE* par recombinaison homologue afin de faciliter la colonisation de l'hôte.

Cette enzyme, potentiel effecteur de la pathogénicité et favorisant l'évasion immunitaire, est retrouvé dans l'ensemble du domaine bactérien questionnant sur l'existence d'autres fonctions biologiques. Afin d'initier l'étude de son rôle chez *Rhizobium leguminosarum*, un symbiote d'une plante légumineuse, la mise en place d'un modèle de culture était nécessaire pour suivre la croissance bactérienne au cours du temps dans les racines de son hôte. Ce travail présente les résultats préliminaires d'un modèle de suivi de la colonisation bactérienne racinaire par mesure de la luminescence.

Mots-clés : Microbiologie ; Évolution ; Nucléase ; *Neisseria meningitidis*, *Rhizobium leguminosarum*

ABSTRACT

The study of the bacterial evolution is essential to understand the mechanisms of pathogenicity and adaptation, offering prospects for the development of new therapeutic and management strategies for bacterial infections. The identification of a single-stranded nuclease in the genome of *Neisseria meningitidis* has paved the way for a better comprehension of the regulation of natural competence, a major mechanism of horizontal gene transfer in bacteria of the *Neisseria* genus. This report explores the importance of the single-stranded nuclease SsnA in antigenic variation of the pilin *pilE* protein by homologous recombination in order to facilitate host colonisation.

This enzyme, a potential effector of pathogenicity and immune evasion, is found throughout the bacterial domain, raising questions about the existence of other biological functions. In order to begin studying its role in *Rhizobium leguminosarum*, a symbiont of a leguminous plant, it was necessary to set up a culture model to monitor bacterial growth over time in the roots of its host. This paper presents the preliminary results of a model for monitoring bacterial root colonisation by measuring luminescence.

Key words : Microbiology; Evolution; Nuclease; *Neisseria meningitidis*, *Rhizobium leguminosarum*

AVANT-PROPOS

Ce projet de recherche a été réalisé dans le cadre d'une formation bidiplômante entre le master Ingénierie de la santé de l'Université de Clermont-Auvergne (France) et la maîtrise en Sciences expérimentales de la santé de l'Institut National de la Recherche Scientifique. La première année de cette maîtrise a été réalisée en France avec un stage en recherche clinique en hématologie pédiatrique au CHU de Bordeaux. Le rapport de ce stage étant confidentiel, il ne sera pas présenté dans ce mémoire. Ainsi, le projet détaillé ci-dessous a été réalisé en un an.

Une première partie de ce projet a porté sur des tests de transformation dans *Neisseria gonorrhoeae*. L'objectif de ces expériences étaient de reproduire les résultats de transformation obtenus chez *Neisseria meningitidis* sauvage, SsnA KO (Δ ssnA) et SsnA Complémentée (Chenal, 2024). Malheureusement, ces essais n'ont pas pu être mis en place de manière reproductible et ne seront donc pas présentés dans ce mémoire. En conséquence, seulement le second volet du projet impliquant l'étude du gène *ssnA* chez *Neisseria meningitidis* en conditions *in vitro* et chez *Rhizobium leguminosarum* sera présenté dans ce rapport.

L'un des objectifs principaux de ce projet était de développer une méthode efficace de culture et d'ensemencement de *Vicia sativa* par *Rhizobium leguminosarum* dans un milieu gélosé. Cet aspect du projet revêtait une importance particulière car aucun membre du laboratoire ne possédait d'expertise préalable en la matière. Ainsi, ce travail ne se contente pas de contribuer à la compréhension scientifique de la transformation et de la culture des bactéries, mais il apporte également une nouvelle compétence technique précieuse au laboratoire.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pr. Frédéric Veyrier, pour m'avoir laissé l'opportunité d'intégrer son laboratoire de recherche et ainsi réaliser ma seconde année de master au sein de l'Institut National de la Recherche Scientifique. J'ai eu l'occasion au cours de cette année de développer une méthodologie scientifique et un regard critique sur mon travail grâce à ses conseils.

Je remercie Ève Bernet, doctorante du laboratoire, pour ses précieux conseils et son soutien qui a contribué à mon épanouissement au sein du laboratoire. Je tiens également à remercier Alex Riverat-Millot, post-doctorant dans le laboratoire, pour ses explications et sa disponibilité lors de mes questionnements. Je remercie tous les membres du laboratoire de m'avoir accueillie et permis de conduire mon projet dans une bonne ambiance au cours de cette année.

Je remercie également ma famille et mon conjoint de m'avoir soutenue au cours de cette année pleine de défis professionnels et personnels .

Finalement, je remercie la région Auvergne-Rhône-Alpes pour le soutien financier qui m'a été accordé dans le cadre de ma mobilité internationale.

Table des matières

RÉSUMÉ	2
ABSTRACT	3
AVANT-PROPOS	4
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
1.1. Nucléases	12
1.1.1. Fonctions biologiques chez les procaryotes	13
1.1.2. Famille des endonucléases GIY-YIG	15
1.1.3. Identification et caractérisation de la NTS et de SsnA (Chenal, 2024)	18
1.2. <i>Neisseria</i> spp et impact sur la santé publique	22
1.2.1. Genre <i>Neisseria</i>	22
1.2.2. Évolution et adaptation des <i>Neisseria</i> pathogènes	23
1.2.3. Pathogénèse des <i>Neisseria</i> et enjeu de santé publique	24
1.2.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence des <i>Neisseria</i>	26
1.2.5. Compétence naturelle	29
1.2.6. Données préliminaires de SsnA chez <i>Neisseria meningitidis</i>	31
1.3. Une bactérie symbiote de la plante : <i>Rhizobium leguminosarum</i>	35
1.3.1. Le genre <i>Rhizobium</i>	35
1.3.2. Nucléases du genre <i>Rhizobium</i>	38
1.3.3. Données préliminaires de la nodulation chez <i>Vicia sativa</i> (Pini et al., 2017)	39
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	41
MATÉRIELS ET MÉTHODES	42
1.4. Souches et Milieux	42
1.4.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	42
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	43

1.4.3.	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	44
1.4.4.	Plasmides.....	44
1.5.	Tests de virulence.....	45
1.6.	Étude d'un homologue de SsnA chez un symbiote de la plante.....	47
1.6.1.	Création d'une souche de <i>Rhizobium leguminosarum</i> luminescente	47
1.6.2.	Délétion de SsnA dans <i>Rhizobium leguminosarum lux</i>	48
1.6.3.	Culture de <i>Vicia sativa</i> en milieu gélosé	50
1.6.4.	Ensemencement de <i>Vicia sativa</i> par <i>R. leguminosarum lux</i>	52
	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	53
1.7.	Rôle de SsnA dans la variation antigénique de <i>pilE</i> CHEZ <i>Neisseria meningitidis</i>.....	53
1.7.1.	Dénombrement des colonies	53
1.7.2.	Séquençage de la région <i>pilE</i>	54
1.8.	Mise en place d'un modèle de culture <i>Rhizobium leguminosarum/Vicia sativa</i>.....	58
1.8.1.	Création de la souche luminescente	58
1.8.2.	Création d'un mutant <i>R. leguminosarum ΔssnA</i>	58
1.8.3.	Protocole de germination des semences de <i>Vicia sativa</i> :.....	60
1.8.4.	Protocole de culture de <i>Vicia sativa</i> :	61
1.8.5.	Ensemencement de <i>R. leguminosarum lux</i>	64
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	69
	RÉFÉRENCES :	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents types de nucléases.....	12
Figure 2 : Analyse de comparaison de séquence de la super-famille des nucléases GIY-YIG .	16
Figure 3 : Modèle proposé de l'interaction de SsnA avec NTS.....	19
Figure 4 : Phylogénie des homologues de SsnA sur l'ensemble du domaine bactérien	20
Figure 5 : Alignement des séquences homologues <i>ssnA</i> de <i>Neisseria meningitidis</i> et <i>Rhizobium leguminosarum</i>	21
Figure 6 : Représentation schématique de la recombinaison homologue de gènes de la cassette <i>pilS</i> dans le locus <i>pilE</i>	28
Figure 7 : Mécanisme d'import d'ADN par transformation naturelle dans le genre <i>Neisseria</i>	30
Figure 8 : Tests de transformation de plasmides porteurs ou non de NTS.....	32
Figure 9 : Infections systémiques de souris avec <i>Nm LNP20553 lux</i> WT, Δ <i>ssnA</i> et Compl.....	34
Figure 10 : Modèle de la fixation symbiotique de l'azote dans les légumineuses par les rhizobia	38
Figure 11 : Modèle de suivi de la colonisation bactérienne dans les racines du pois par bioluminescence de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	40
Figure 12 : Plasmide pKOSsnA Rh:: <i>Ery</i>	49
Figure 13 : Double recombinaison homologue dans le génome de <i>R. Leguminosarum</i>	50
Figure 14 : Méthodes de culture des semences dans les géloses Fåhraeus agar	52
Figure 15 : Dénombrement de <i>N. meningitidis</i> dans le sang de souris après infection	53
Figure 16 : Migration des ADN extraits sur gel agarose 1%	55
Figure 17 : Alignement des séquences <i>pilE</i> des séquences de clones de <i>Neisseria meningitidis</i>	56
Figure 18 : Analyse de la recombinaison homologue des gènes <i>pilS</i> dans le locus <i>pilE</i>	57
Figure 19 : Création de la souche <i>R. leguminosarum</i> luminescente.....	58
Figure 20 : Création du mutant <i>R. leguminosarum</i> Δ <i>ssnA</i>	59
Figure 21 : Test de deux protocoles de germination des semences de <i>Vicia sativa</i>	60
Figure 22 : Comparaison de trois volumes de milieu de culture	62
Figure 23 : Comparaison du positionnement de la semence dans le milieu.....	63
Figure 24 : Mesure de la luminescence de <i>Vicia sativa</i> au cours du temps.....	64
Figure 25 : Comparaison de deux méthodes d'ensemencement avec <i>R. leguminosarum lux</i> ..	66
Figure 26 : Quantification de la luminescence après ensemencement de <i>Vicia sativa</i> par <i>R. leguminosarum lux</i>	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans ce projet	42
Tableau 2 : Concentration en antibiotiques des milieux de culture	44
Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés dans ce projet	45
Tableau 4 : Primers utilisées dans ce projet.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Apyrimidine ou apurine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
BER	Réparation par excision de base
bv	Biovar
CAMP	Peptides antimicrobiens cationiques
Cas	Protéine associée aux CRISPR
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigenrelated cell-adhesion molecule</i>
Cm	Chloramphénicol
Compl	Complémentation
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DAP	<i>5-diaminopimelic acid</i>
DNase	Nucléase ciblant l'ADN
DO600	Densité optique à 600
dRS3	Séquence répétée directe 3
DUS	<i>DNA-Uptake Sequence</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Ery	Erythromycine
GCB	Milieu de base Gonococcique
HEase	Endonucléase de homing
HGT	Transfert horizontal de gènes
Hup	<i>Hydrogen uptake</i>
J	Jours
Km	Kanamycine
KO	Knock-out, délétion
LB	Milieu LuriaBertani Miller
LOS	Lipooligosaccharide
MTase	Méthyltransférase
MulDi	<i>Multicellular Longitudinally Dividing</i>
NER	Réparation par excision de nucléotide
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
ns	Non significatif
NTS	<i>Neisseria transformation sequence</i>
OE	<i>Over-expressed</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PFU	Unité de formation de plaque (virus)
REase	Endonucléases de restriction
RLU	Relative Luminescente Unit

RNase	Nucléase ciblant l'ARN
Str	Streptomycine
SsnA	<i>Specific Single-strand Nuclease</i>
Tet	Tétracycline
TY	Milieu Triptone Yeast
TFP	Pili de type 4
UFC	Unité Formant Colonie
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCTION

1.1. NUCLEASES

Les nucléases sont des enzymes capables de dégrader les acides nucléiques en clivant leurs liaisons phosphodiester. Les désoxyribonucléases ou DNases sont spécifiques de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les ribonucléases ou RNases sont spécifiques de l'acide ribonucléique (ARN).

Il existe deux catégories de nucléases : les endonucléases et les exonucléases (**Figure 1**). Les exonucléases sont des nucléases qui dégradent les acides nucléiques un nucléotide à la fois à partir de l'extrémité 5' ou 3' de la séquence nucléotidique. Les 5'-3' exonucléases dégradent à partir de l'extrémité 5' de la chaîne polynucléotidique et les 3'-5' exonucléases dégradent à partir de l'extrémité 3'. Les exonucléases peuvent également agir sur des acides nucléiques simple ou double brin. Certaines nucléases peuvent également posséder ces deux propriétés.

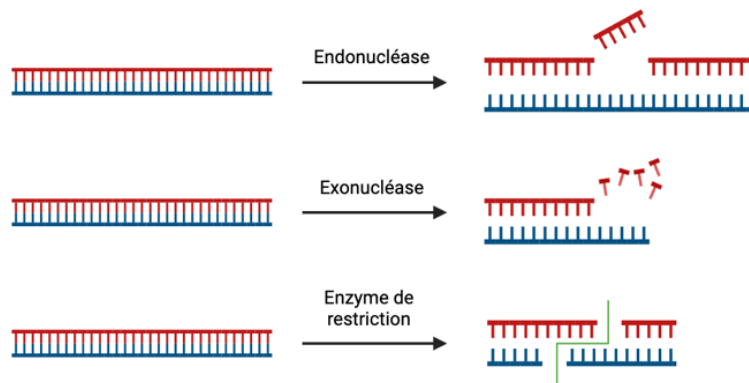


Figure 1 : Les différents types de nucléases

L'endonucléase clive l'ADN au milieu du brin. L'exonucléase dégrade la séquence nucléotidique à partir des extrémités du brin d'ADN. L'enzyme de restriction reconnaît et réalise une coupure spécifique dans une séquence précise de l'ADN. Image créée avec Biorender.com

À l'inverse de la plupart des DNases et des RNases qui dégradent l'ADN et l'ARN sans spécificité de séquence ou de structure, les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent une séquence spécifique de quatre à huit nucléotides

sur l'ADN étranger et clivent l'ADN double brin pour former deux séquences distinctes. Elles sont capables de cliver dans des sites internes de la chaîne d'acides nucléiques simple ou double brin. Ces enzymes sont notamment utilisées en biologie moléculaire afin de permettre le clonage de certains fragments d'ADN spécifiques. Initialement, ces enzymes de restrictions ont été isolées de souches bactériennes, où elles contribuent à la défense de l'hôte contre l'ADN étranger (Felice et al., 2019).

Certaines DNases sont capables de cliver des séquences d'ADN simple brin. La première nucléase simple-brin mise en évidence est une phosphodiesterase hydrolysant les acides nucléiques monocaténaire retrouvée chez *Escherichia coli* (Lehman & Nussbaum, 1964). Appelée ExoI, elle dégrade spécifiquement l'ADN simple brin à partir de l'extrémité 3' et est impliquée dans des voies de réparation de l'ADN (Yang, 2011). D'autres nucléases d'ADN simple brin ont été identifiées et mieux caractérisées par la suite comme la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae* (Wiegand et al., 1975). Ces nucléases sont impliquées dans des mécanismes de réparation, de recombinaison et de réplication de l'ADN. Elles sont utilisées comme outils d'analyse en biologie moléculaire pour déterminer notamment la structure des acides nucléiques ou pour cartographier certaines mutations (Desai & Shankar, 2003).

1.1.1. Fonctions biologiques chez les procaryotes

Réparation de l'ADN : Dans les complexes de réparation, les nucléases jouent un rôle important dans l'élimination des nucléotides endommagés ou incompatibles. Ainsi, pour réparer l'ADN abimé, les nucléases ont recours à différents mécanismes. Elles sont capables de retirer les bases endommagées par un mécanisme appelé excision de bases (BER). Certaines enzymes sont capables de cliver la liaison phosphodiester d'un site abasique, plus particulièrement les sites apyrimidine ou apurine (AP). *Escherichia coli* possède notamment deux endonucléases AP : l'endonucléase IV (endoIV) et l'exonucléase III (exoIII) (Shida, 1995). La réparation par excision de nucléotides (NER) élimine les lésions importantes de l'ADN en clivant de part et d'autre de la lésion. Chez les bactéries, le complexe UvrB-UvrC procède à deux incisions, du côté 5' et du côté 3' pour éliminer une courte séquence contenant le nucléotide endommagé (Nishino & Morikawa, 2002). Finalement, le système protéique MutSLH des procaryotes répare les

mésappariements en reconnaissant et en se liant aux fragments de base incompatibles de l'ADN (Bayliss et al., 2002).

Réplication de l'ADN : Lors de la réplication de l'ADN pour préparer la division cellulaire, l'ADN polymérase peut produire des erreurs en synthétisant le brin d'ADN complémentaire. Si un nucléotide incorrect est incorporé, l'activité exonucléase 3'- 5' de la polymérase ou d'une sous-unité protéique associée élimine le nucléotide incorrect à l'extrémité de l'amorce (Clark & Pazdernik, 2013). La RNaseH, présente chez tous les organismes vivants permet, quant à elle, l'élimination des fragments d'Okasaki nécessaires pour initier la polymérisation de l'ADN (Nishino & Morikawa, 2002).

Recombinaison de l'ADN : Le transfert horizontal de gènes (HGT) et la recombinaison homologue (HR) sont deux mécanismes impliqués dans l'évolution et la diversité génétiques des bactéries. Ils assurent l'adaptation à de nouvelles niches écologiques et l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence. Le complexe enzymatique RecBCB a été identifié comme une nucléase bactérienne impliquée dans ce processus en agissant de pair avec la recombinase RecA. Elle possède trois activités nucléases différentes : une activité exonucléase dépendante de l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'ADN double-brin, sur l'ADN simple-brin et une activité endonucléase indépendante de l'ATP sur l'ADN simple-brin. Dans le cadre de la recombinaison homologue, ce système génère des extrémités simple-brin sur l'ADN donneur et recrute ensuite la recombinase RecA. Celle-ci peut donc se lier à l'ADN simple-brin et l'apparier à une séquence d'ADN double-brin homologue (Julin, 2017). Ce phénomène est notamment observé chez *Bacillus subtilis* qui exprime le gène *recA*, induit à la suite de dommages à l'ADN afin de permettre la réparation des brins endommagés par recombinaison (Michod et al., 2008).

Défense contre l'ADN étranger : Pour se protéger de l'ADN étranger qui pénètre dans une cellule bactérienne, souvent à la suite d'une infection virale, les bactéries ont mis au point leurs propres systèmes de défense naturels pour empêcher l'infection. Les bactéries produisent des nucléases pour détruire l'ADN étranger et se protéger des infections par les bactériophages. Le système Restriction-Modification (RM) de la cellule-hôte

constituent un premier mécanisme de défense grâce aux méthyltransférases (MTase) qui protège l'ADN endogène et permet aux enzymes de restriction de reconnaître et cliver uniquement des séquences de l'ADN étranger non-méthylé. Le système de défense bactérien de type CRISPR-Cas contient également des nucléases qui clivent les génomes des phages par des mécanismes spécifiques. Présent dans de nombreux génomes bactériens, le locus CRISPR est composé de répétitions et des séquences d'origine étrangère appelées *spacers* et d'un opéron de gène *cas*. Les *spacers* d'origine viral permettent la reconnaissance de séquences spécifiques des phages lors d'infection et leur inactivation par le complexe formé par Cas9. Ce système constitue la seule forme d'immunité adaptative décrite chez les procaryotes (Egido et al., 2021).

Apport métabolique : Certaines bactéries tels que *E. coli* peuvent utiliser l'ADN comme sources de carbone et d'azote pour répondre à leurs besoins nutritionnels. La protéine EndA, une endodésoxyribonucléase, est notamment surexprimée dans des conditions de culture avec l'ADN comme sur source énergétique permettant la digestion de celui-ci (Huang et al., 2022). En effet, l'ADN est une source de carbone et d'azote mais également de désoxyribonucléotides permettant la réplication du propre génome de la cellule. La synthèse de novo de nucléotides étant coûteuse en termes d'énergie et de constituants moléculaires, l'absorption d'ADN intact est un moyen plus efficace d'obtenir des nucléotides (Finkel & Kolter, 2001).

1.1.2. Famille des endonucléases GIY-YIG

La superfamille GIY-YIG regroupe des nucléases caractérisées par la présence d'un domaine typique d'environ 100 acides aminés, avec deux motifs courts "GIY" et "YIG" dans la partie N-terminale, suivis d'un résidu Arginine au centre et d'un résidu Acide Glutamique dans la partie C-terminale (**figure 2**) (Kowalski et al., 1999).

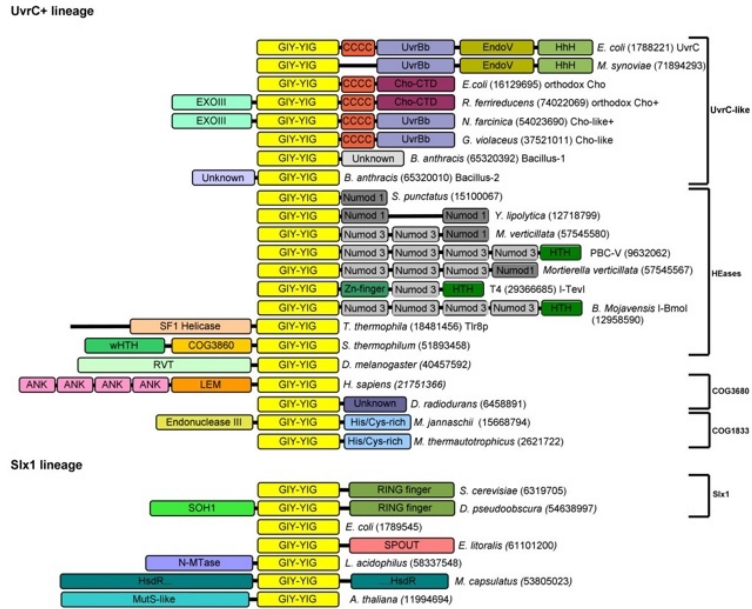


Figure 2 : Analyse de comparaison de séquence de la super-famille des nucléases GIY-YIG
(Dunin-Horkawicz et al., 2006)

Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes. Les premières protéines découvertes avec un domaine GIY-YIG sont des endonucléases de type « homing » (HEases). Ces endonucléases sont des enzymes bactériennes qui mobilisent leurs propres cadres de lecture en clivant l'ADN double brin sur des sites spécifiques du génome. Elles n'ont pas de séquences de reconnaissance strictement définies et tolèrent généralement des changements de base uniques ou même multiples. L'activité de ces protéines conduit à des événements de recombinaison spécifique à un site pouvant entraîner l'insertion, la délétion, la mutation ou la correction de séquences d'ADN (Stoddard, 2011).

Une grande partie des nucléases de cette famille joue un rôle dans la recombinaison et la réparation de l'ADN. C'est notamment le cas de l'endonucléase UvrC qui est une sous-unité du complexe bactérien de réparation de l'ADN. Ce complexe composé de l'ATPase de type ABC UvrA et de l'hélicase UvrB est impliqué dans la réparation par excision de nucléotides (NER). L'endonucléase UvrC incise le brin d'ADN endommagé des deux côtés de la lésion (Lin & Sancar, 1992). Elle utilise son domaine GIY-YIG N-terminal pour cliver la liaison phosphodiester du côté 3' d'une base d'ADN

endommagée tandis qu'un domaine non apparenté situé à l'extrémité C-terminale est impliqué dans le clivage du côté 5' (Verhoeven et al., 2000). Chez la levure, la sous-unité d'une endonucléase hétérodimère Slx1 présente possède un domaine nucléase GIY-YIG et fait partie d'un complexe protéique nécessaire pour résoudre les intermédiaires de recombinaison qui surviennent en réponse à des lésions de l'ADN (Mullen et al., 2001). Elle génère des cassures double brin de l'ADN afin d'induire une recombinaison ciblée au niveau des fourches de réplication arrêtées. Avec sa structure conservée au cours de l'évolution, elle joue un rôle important dans le maintien de l'ADN ribosomique (Coulon et al., 2004). Chez les procaryotes, une grande famille d'homologues de Slx-1 serait impliquée dans la réparation de l'ADN (Aravind & Koonin, 2001). Les protéines des familles COG3680 retrouvées chez les bactéries et COG1833 retrouvées chez les archées et les bactéries ne sont pas caractérisées fonctionnellement et ne sont pas annotées. Toutefois, une étude d'homologie les a identifiés comme parent du domaine GIY-YIG de la famille UvrC. Les membres de COG3680 seraient des nucléases, éventuellement impliquées dans la réparation ou la recombinaison de l'ADN, tandis que les membres COG1833 seraient impliqués dans la réparation par excision de bases (BER) ou dans une autre voie de réparation de l'ADN (Dunin-Horkawicz et al., 2006).

Pour finir les nucléases GIY-YIG peuvent dégrader l'ADN exogène. Cette fonction est caractéristique des endonucléases de restriction (REase) qui dégradent l'ADN étranger en clivant des sites cibles spécifiques qui sont des séquences d'ADN généralement palindromiques, en utilisant Mg^{2+} comme cofacteur. Les REases de type II de la superfamille GIY-YIG ne contiennent pas de domaines supplémentaires. Toutefois, la taille de leur domaine nucléase est augmentée par des insertions et des extensions terminales au noyau commun. Cette structure permettrait vraisemblablement au site de liaison à l'ADN de reconnaître des séquences courtes avec une très haute spécificité (Dunin-Horkawicz et al., 2006). Leurs séquences d'acides aminés étant extrêmement diverses, il est donc difficile de les classer phylogénétiquement. Toutefois, un sous-groupe comprenant seulement trois REases, Eco29kl, MraI and NgoMIII, ciblant toute la même séquence, a été récemment mis en évidence et seraient étroitement liées à la superfamille GIY-YIG (Bujnicki et al., 2001). L'endonucléase II codée par le phage T4

(Endo II), un autre membre non-spécifique de la superfamille GIY-YIG dégrade également l'ADN bactérien, ce qui permet la réutilisation des bases de l'hôte pour la synthèse de l'ADN du phage (Carlson & Wiberg, 1983). Dans le même temps, le génome du phage est protégé du clivage par modification chimique par hydroxyméthylation et/ou glucosylation des bases cytosines (Dunin-Horkawicz et al., 2006).

1.1.3. Identification et caractérisation de la NTS et de SsnA (Chenal, 2024)

Notre équipe a récemment mis en évidence l'existence d'une nucléase d'ADN simple brin interagissant avec une courte séquence répétée de 25 pb (Chenal, 2024). Cette séquence est retrouvée en 759 copies dans le génome de *Neisseria meningitidis* 8013 2C4.3, mais est également présente chez *Neisseria gonorrhoeae* et en quelques dizaines de copies chez les *Neisseria* commensales. Elle possède des similarités de séquences avec dRS3, une séquence avec un noyau variable flanqué de séquences palindromiques formant une structure secondaire en épingle à cheveux (tige-boucle). Nommée NTS pour *Neisseria transformation sequence*, la séquence consensus est CGTCATTCCCGCGMAVGCGGGAATCYRG, avec une région palindromique soulignée. Il est donc possible de prédire la formation de cette séquence comme une structure en épingle à cheveux. Cette séquence est retrouvée dans le génome de nombreuses espèces bactériennes et à certains endroits précis du génome de *N. meningitidis*, s'accumulant notamment dans les régions intergéniques. La NTS étant plus abondante chez les deux pathogènes du genre *Neisseria*, il est possible de s'interroger sur son potentiel rôle dans la virulence de ces espèces.

En étudiant sa répartition par analyse bioinformatique, il a été constaté qu'elle flanque notamment en au moins deux copies un gène de 285 paires de base chez *N. meningitidis* 2C4.3. Ce gène code pour une protéine de 95 acides aminés et a été nommé *ssnA* pour *Specific Single-strand Nuclease*. Il est traduit en une nucléase avec un unique domaine fonctionnel appartenant à la superfamille d'endonucléases GIY-YIG. SsnA possède en effet la tyrosine du motif « GIY », la seconde partie du motif « YIG » ainsi que des sites actifs conservés, et un acide glutamique (E) prédit comme étant un site de liaison au magnésium. Cependant, sa séquence ne permet pas de la classer dans l'une des

familles connues, elle pourrait donc être membre d'une nouvelle famille d'endonucléases GIY-YIG encore mal définie.

L'activité nucléase de SsnA a été évaluée sur divers substrats tel que des séquences d'ADN double-brin linéaire et circulaire contenant ou non la séquence NTS. Cette étude a finalement révélé qu'il s'agit d'une endonucléase spécifique d'ADN simple-brin clivant en présence de la séquence NTS dans une orientation spécifique. Afin de vérifier la spécificité de SsnA, l'activité de liaison et de clivage a été testé en substituant un nucléotide à la fois de la séquence NTS indiquant que le site de liaison de la nucléase et le site de clivage différent.

Ainsi, la nucléase SsnA interagit avec la NTS en se liant spécifiquement au pied de la tige boucle formé par la NTS. Elle reconnaît la structure tige-boucle caractéristique et clive trois nucléotides en amont du palindrome (**figure 3**).

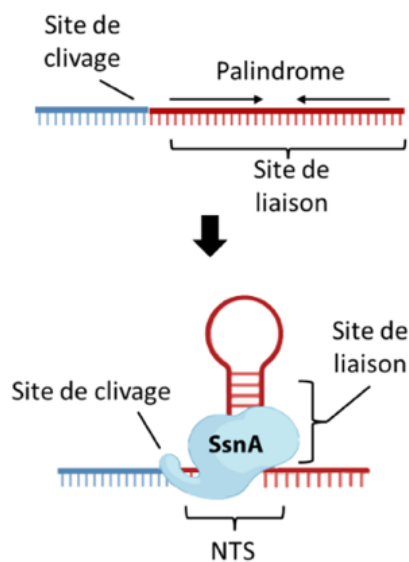


Figure 3 : Modèle proposé de l'interaction de SsnA avec NTS
(Chenal, 2024)

1.1.3.1. Homologues du gène

La séquence NTS est présente chez les bactéries du genre *Neisseria* mais est également retrouvée dans d'autres espèces plus ou moins éloignées de la famille des *Neisseriaceae*. Des copies de la séquence sont retrouvées à proximité des gènes codant pour des homologues de SsnA identifiés dans plusieurs espèces très diverses (**figure 4**). Ces derniers sont des endonucléases simple-brin distribués sur l'ensemble du domaine

bactérien en majorité chez les bactéries à GRAM négatif. SsnA est donc présente chez des espèces pathogènes, commensales, environnementales, dont certaines qui ne sont pas naturellement compétentes. Il est encore impossible de définir clairement les fonctions chez ces homologues. Il est toutefois possible de supposer qu'ils aient un potentiel rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou dans le transfert horizontal de gène (HGT) par transformation.

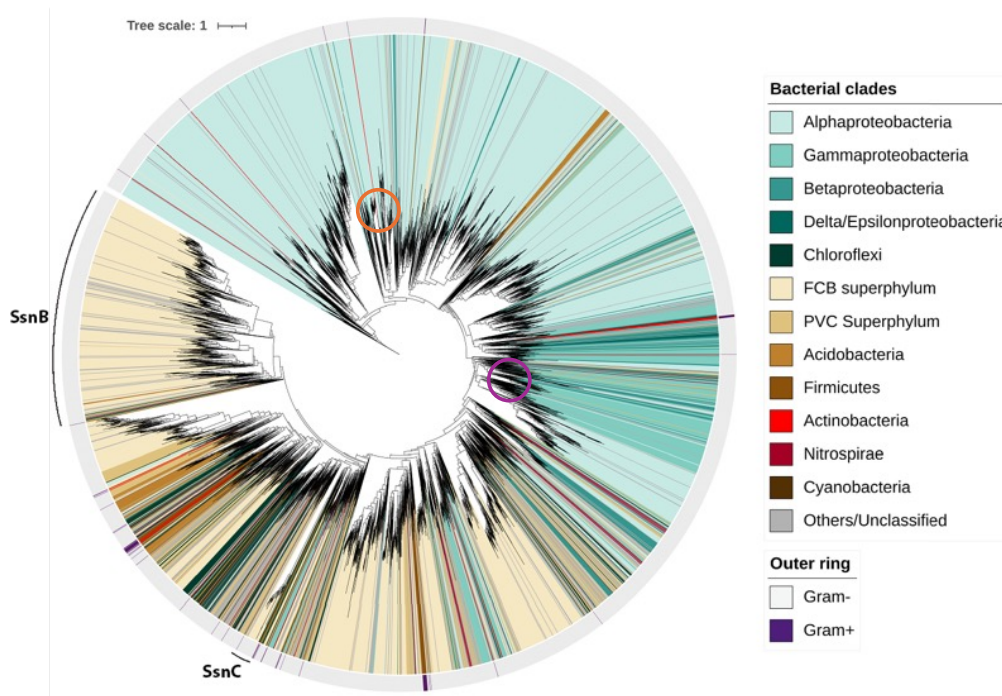


Figure 4 : Phylogénie des homologues de SsnA sur l'ensemble du domaine bactérien
Figure adaptée de Chenal (2024)

Les protéines considérées comme homologues sont les séquences de moins de 150 acides aminés possédant au moins 50% d'identité avec la séquence du SsnA de *N. meningitidis*.

Le cercle violet sur la figure correspond au genre *Neisseria*, et le cercle orange correspond au genre *Rhizobium*.

Dans ce travail, deux bactéries serviront de modèle d'études pour SsnA : *Neisseria meningitidis*, bactérie chez laquelle le gène *ssnA* a été identifié, et *Rhizobium leguminosarum*, une bactérie fixatrice de l'azote et symbiote de la plante possédant un homologue de SsnA encodé dans son génome.

L'alignement des séquences nucléotidiques des deux gènes homologues *ssnA* de *N. meningitidis* et de *R. leguminosarum* met en évidence une conservation notable entre les deux séquences, particulièrement dans certaines régions. Les différentes substitutions

entre les deux séquences peuvent résulter de l'adaptation des gènes dans différents environnements ou pressions évolutives spécifiques aux deux genres bactériens. Une autre différence majeure entre les deux séquences est la présence d'une insertion de 75 paires de bases au début de la séquence du gène *ssnA* de *R. leguminosarum* et la délétion d'une séquence de 197 paires de bases à la fin du gène. Les gènes homologues *ssnA* des deux bactéries de genres différents ont probablement évolué à partir d'un ancêtre commun. Les régions hautement conservées entre les deux séquences pourraient correspondre à des domaines essentiels à la fonction du gène, tandis que les variations pourraient indiquer des adaptations à des niches écologiques spécifiques de chaque espèce (**figure 5**).

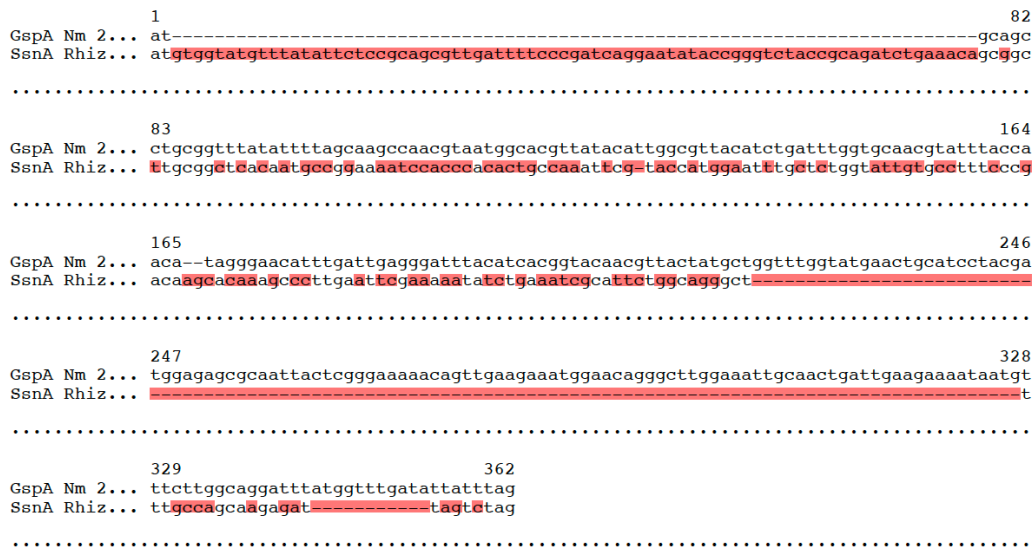


Figure 5 : Alignement des séquences homologues *ssnA* de *Neisseria meningitidis* et *Rhizobium leguminosarum*

Les séquences *ssnA* de *N. meningitidis* (en haut) et de *R. leguminosarum* (en bas) ont été alignées pour mettre en évidence les zones de conservation et les différentes mutations entre elles. Les bases surlignées en orange indiquent les insertions, les délétions et les substitutions.

1.2. NEISSERIA SPP ET IMPACT SUR LA SANTE PUBLIQUE

1.2.1. Genre *Neisseria*

Le genre *Neisseria* est un groupe de β -protéobactéries à GRAM négatives et oxydase positives de la famille des *Neisseriaceae*. Elles appartiennent à la même famille que d'autres genres d'importance médicale tels que *Kingella* et *Eikenella*.

Les bactéries du genre *Neisseria* peuvent être diplocoques (comme *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*) ou de forme bacilles tel que *N. elongata* ou *N. bacilliformis* (Bøvre & Holten, 1970 ; Han et al., 2006 ; Veyrier et al., 2015). D'autres bactéries de la famille des *Neisseriaceae* présentent une morphologie assez atypique appelé MulDi (*Multicellular Longitudinally Dividing*) (Nyongesa et al., 2022). Cette diversité morphologique témoigne des divergences au cours de l'évolution pour favoriser l'adaptation des bactéries à différentes niches écologiques.

Le genre est identifié comme un des composants majeurs du "microbiome central" sain de la cavité buccale humaine (Zaura et al., 2009). En effet, la majorité des *Neisseria* a été isolée des surfaces muqueuses et dentaires humaines mais certaines proviennent également des cavités orales et nasopharyngées d'autres mammifères. *Neisseria macacae* a été mise en évidence comme nouvelle espèce dans l'oropharynx du macaque rhésus (Vedros et al., 1983). La salive et la plaque dentaire de chiens sains ont été échantillonnées et *N. canis* et *N. weaveri* ont été identifiées comme des membres du microbiote orale de l'espèce (Elliott et al., 2005).

La plupart des membres du genre ne sont pas, ou très rarement, pathogènes mais le genre contient deux agents pathogènes : *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. *N. meningitidis* est responsable de la méningite bactérienne et de septicémies tandis que *N. gonorrhoeae* est l'agent causatif de la gonorrhée, une infection sexuellement transmissible. *Neisseria gonorrhoeae* fut la première bactérie du genre à avoir été observée. En effet, Alfred Neisser identifia en 1879 des diplocoques dans des cellules provenant d'exsudats urétraux d'hommes et femmes atteints de gonorrhée (Neisser, 1879). *Neisseria meningitidis* fut isolé par Weichselbaum en 1887 à partir du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la méningite (Weichselbaum, 1887).

La plupart des *Neisseria* sont des commensaux du microbiote oral de l'homme. Toutefois certaines peuvent occasionnellement déclencher des maladies chez les individus immunodéficients ou provoquer des infections systémiques chez des individus en bonne santé, souvent à la suite de morsures d'animaux. Même si elles sont généralement moins virulentes que *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*, certaines *Neisseria* commensales peuvent devenir des pathogènes opportunistes chez l'Homme. *N. mucosa* a par exemple été identifié comme responsable d'au moins 21 cas d'endocardite (Pilmis et al., 2014)

En revanche, certaines *Neisseria* commensales semblent jouer un rôle protecteur contre les *Neisseria* pathogènes. Notamment, le commensal *Neisseria lactamica* a suscité un vif intérêt en raison de son potentiel de protection contre *N. meningitidis* (Evans et al., 2011). La présence de *N. lactamica* dans les fosses nasales est associée à une diminution du risque d'infection par *N. meningitidis*, probablement grâce à l'induction d'anticorps à réaction croisée qui contribuent au développement d'une immunité naturelle (Gold et al., 1978).

1.2.2. Évolution et adaptation des *Neisseria* pathogènes

Les communautés bactériennes existent depuis environ 3,5 milliards d'années (Noffke et al., 2013) et présentent une grande diversité en ce qui concerne leur matériel génétique, leur séquence nucléotidique et leur organisation. Cette diversité a été engendrée par plusieurs facteurs : les mutations cumulées au fil du temps, les réarrangements et réorganisations au sein de leur génome et le transfert horizontal de gènes (HGT) entre bactéries qui n'ont pas d'ancêtre commun immédiat.

L'analyse des génomes issus d'isolats représentatifs de chaque espèce connue de *Neisseria* a révélé une similitude globale dans leur composition, leur taille et leur architecture, bien que des variations significatives existent au niveau nucléotidique entre les espèces (Bennett et al., 2010). De plus, les *Neisseria* pathogènes sont étroitement liés sur le plan génétique et physiologique, mais présentent des différences dans la manifestation de la maladie.

La prévalence de nombreuses espèces de *Neisseria* dans les mêmes niches écologiques du corps humain offre une opportunité d'échange d'ADN. En effet, une

grande partie des gènes de virulence des *Neisseria* pathogènes est également retrouvées chez les *Neisseria* commensales, tout comme les gènes pour la sécrétion et l'absorption de l'ADN, ainsi qu'une abondance de DUS (DNA-Uptake Sequence), essentielle pour la transformation génétique. Cette observation suggère que les commensaux agissent comme des réservoirs de nouveaux allèles de virulence (Marri et al., 2010). Toutefois, les *Neisseria* commensales et pathogènes occupent les mêmes niches, il est donc souvent difficile de différencier les facteurs de colonisation des facteurs de virulence nécessaires pour provoquer des dommages chez l'hôte.

Un modèle proposé suppose qu'un ancêtre précoce a évolué vers les 11 espèces de *Neisseria* colonisant obligatoirement l'homme et qu'un clone de cet ancêtre se serait également relocalisé et adapté au tractus urogénital, menant à l'émergence de *N. gonorrhoeae* (Priniski & Seifert, 2018).

Le transfert horizontal de gènes est l'un des mécanismes les plus efficaces pour l'évolution et l'acquisition de nouveaux phénotypes par les espèces du genre *Neisseria*. Le phénotype acquis le plus répandu est la résistance aux antibiotiques, conduisant à des problèmes de multirésistance chez certaines souches bactériennes. Un plasmide conjugatif pConj conférant une résistance à la tétracycline a évolué chez *N. meningitidis* et a été échangé à plusieurs reprises avec l'autre pathogène du genre, *N. gonorrhoeae*. Celui-ci, désormais très répandu dans différentes lignées de *N. gonorrhoeae*, empêche aujourd'hui le traitement de la gonorrhée par la tétracycline (Yee et al., 2023).

1.2.3. Pathogénèse des *Neisseria* et enjeu de santé publique

La méningite bactérienne avec une transmission par aérosols est une préoccupation majeure pour la santé mondiale, avec environ 500 000 cas annuels dans le monde et au moins 50 000 décès. La septicémie méningococcique fulminante, ou syndrome de Waterhouse-Friderichsen, a été initialement observée chez un nourrisson de 8 mois en 1911 (Waterhouse, 1911). Entre 5 et 20 % de la population peut être porteuse asymptomatique de *N. meningitidis*, avec des taux potentiellement plus élevés en période d'épidémie. Cependant, chez les individus malades, un traitement antibiotique rapide garantit généralement un bon pronostic (Cartwright et al., 1992).

Les maladies à méningocoques incluent deux syndromes distincts. La méningite, principalement associée à *N. meningitidis*, se caractérise par l'invasion des méninges et du liquide céphalorachidien, pouvant entraîner la mort sans traitement et laisser des séquelles graves chez les survivants. La septicémie méningococcique, plus grave que la méningite, résulte de la propagation rapide du méningocoque dans le sang, provoquant des lésions tissulaires étendues, un choc septique et des complications telles que l'amputation de membres.

La variation intra-espèces des méningocoques a d'abord été étudiée par des analyses sérologiques, portant initialement sur les sérogroupes, définis par le polysaccharide capsulaire (Vedros, 1987). Parmi les sérogroupes responsables de la majorité des maladies méningococciques figurent les sérogroupes A, B, C, W, X et Y. Les capsules polysaccharidiques des sérogroupes H, E, L, I, K et Z, bien que présentes chez certains isolats de *N. meningitidis*, sont rarement associées à des maladies invasives et sont plus courantes chez les porteurs asymptomatiques. Des recherches ultérieures ont identifié des variations antigéniques supplémentaires dans les protéines de la membrane externe et les lipopolysaccharides à chaîne courte, menant à une classification en sérotypes, sérosous-types et immunotypes (Frasch et al., 1985 ; Poolman et al., 1995). La capsule est cruciale pour la virulence des méningocoques, étant à la fois un déterminant clé de la maladie et un composant essentiel des vaccins antiméningococciques (Tan et al. 2010).

La gonorrhée, causée par *N. gonorrhoeae*, est la deuxième infection bactérienne sexuellement transmissible (IST) la plus courante. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 82,4 millions de personnes ont été nouvellement infectées par la gonorrhée en 2020. Elle engendre des infections génitales et extragénitales, aussi bien symptomatiques qu'asymptomatiques. *N. gonorrhoeae* est reconnu comme un pathogène humain, et déclenchant souvent une réaction inflammatoire locale. Les symptômes de cette infection incluent un écoulement, une dysurie et une inflammation des tissus urétraux et cervicaux. Une intervention tardive peut conduire à des conséquences graves, telles que la stérilité et les maladies inflammatoires pelviennes (Bennett et al., 2014).

Autrefois, les infections causées par *N. gonorrhoeae* étaient considérées comme facilement traitables. Cependant, au fil du temps, elles ont développé une résistance

croissante aux antibiotiques couramment utilisés, comme la pénicilline, la ciprofloxacine et l'azithromycine. En conséquence, cette bactérie est maintenant classée parmi les agents pathogènes multirésistants aux antibiotiques, avec la ceftriaxone comme seule option disponible pour le traitement empirique initial.

Malgré différents essais cliniques sur quatre vaccins potentiels dans les années 1990, le développement d'un vaccin efficace contre *N. gonorrhoeae* s'est avéré être complexe. En effet, *N. gonorrhoeae* est capable d'échapper au système immunitaire grâce la variabilité des antigènes gonococciques mais également par la production d'anticorps « bloquants » contre les antigènes gonococciques conservés. Toutefois, d'autres protéines immunogènes sont étudiées comme cibles vaccinales tel que les protéines de liaison à la transferrine TbpAB ou encore la porine de la membrane externe PorB (Edwards et al., 2016).

1.2.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence des *Neisseria*

Un facteur de virulence est une molécule issue d'un gène permettant à un micro-organisme d'établir une infection, de survivre et persister dans son hôte d'une espèce particulière et d'accroître son potentiel pathogène (Mrsny, 2009). La virulence de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* est influencée par de multiples facteurs comme (mais pas limité à) l'expression du polysaccharide de la capsule, l'expression des protéines adhésives de surface tel que les pili, les molécules d'adhésion Opa et Opc, et l'endotoxine (lipopolysaccharide, LPS). Les deux pathogènes ont également développé des mécanismes de variation de phase à haute fréquence et de variation antigénique, ce qui permet à l'organisme de s'adapter avec succès aux surfaces des muqueuses et d'envahir l'hôte.

Capsule : Certaines souches de *N. meningitidis* sont encapsulées, d'autres ne le sont pas. Toutefois, les souches de *N. meningitidis* responsables de maladies invasives et isolées d'échantillons de patients symptomatiques tels que le sang ou le LCR sont presque toujours encapsulées. La capsule est essentielle à la survie de l'organisme bactérien dans le sang puisqu'elle permet à la bactérie de résister à l'immunité de l'hôte médiée par les anticorps et le système du complément et inhibe la phagocytose (Uria et

al., 2008). Il existe un mécanisme appelé « commutation de capsule » qui résulte d'un échange horizontal par transformation et recombinaison dans le locus des gènes de biosynthèse de la capsule spécifiques au sérotype (Swartley et al., 1997). Ceci permet un changement de la capsule et donc l'échappement à l'immunité protectrice naturelle de la population ou induite par un vaccin. La capsule est le constituant de base des vaccins méningococciques conjugués polysaccharidiques.

Lipooligosaccharides (LOS) : Le LOS méningococcique compose la membrane externe de l'enveloppe cellulaire sous-capsulaire. Le LOS joue un rôle dans l'adhérence du méningocoque et dans l'activation du système immunitaire inné. Il est constitué de trois parties : le lipide A, un oligosaccharide central et des résidus d'heptose, ainsi que de courts oligosaccharides très variables. La grande partie de l'activité biologique et de la toxicité de l'endotoxine du méningocoque est médiée par le lipide A. Le LOS de *N. meningitidis* est directement impliquée la gravité de la maladie méningococcique. Il peut entraîner des lésions endothéliales et des fuites capillaires en induisant une réponse inflammatoire et en augmentant la sécrétion de cytokines tel qu'IL-6 ou TNF- α (Braun et al., 2002). Il confère également à la bactérie une résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (CAMP) présents dans les macrophages et les neutrophiles grâce aux structures phosphoéthanolamine du lipide A. Ces peptides jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections microbiennes grâce à leur action de destruction non oxydative et à leurs fonctions de signalisation (Rouphael & Stephens, 2011).

Adhésines : Les deux espèces pathogènes du genre *Neisseria* sont capables de se lier aux cellules épithéliales de la muqueuse humaine grâce à leurs propriétés adhésives médiées par les pili. Les pili sont des structures filamenteuses composées de la sous-unité majeure du pilus (piline, PilE) et d'une protéine associée à l'adhérence (PilC) située à l'extrémité du pilus et également à l'intérieur de la membrane bactérienne. La rétraction du pilus est nécessaire à une forme de mouvement appelée « motilité de torsion », qui assure la médiation du mouvement bactérien vers la surface de la cellule hôte et le passage de la bactérie à travers la couche de mucus épithéliale et la formation de micro-colonies. En plus des propriétés adhésives, elles confèrent aux bactéries la capacité de

capter de l'ADN présent dans le milieu et de l'absorber au sein de la cellule par compétence naturelle. La sous-unité majeure du pilus-PilE, protéine de piline, subit une variation antigénique par recombinaison non réciproque durant laquelle des gènes de piline silencieux (*pilS*) sont transférés dans le locus de *pilE* par un mécanisme dépendant de RecA (**figure 6**) (Proft & Baker, 2008). La recombinaison homologue dans le locus *pilE* par les gènes de la cassette *pilS* permet la colonisation de nombreux types cellulaires au sein de l'organisme mais également l'évasion immunitaire aux défenses de l'hôte rendant complexe le développement d'un vaccin contre les pathogènes du genre (Hill & Davies, 2009).

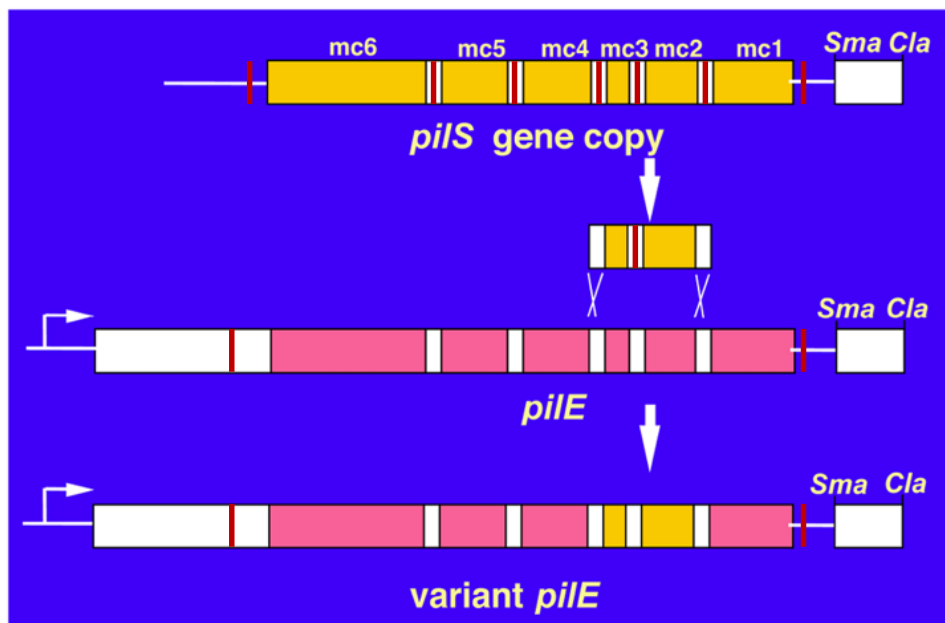


Figure 6 : Représentation schématique de la recombinaison homologue de gènes de la cassette *pilS* dans le locus *pilE*

Les bandes rouges indiquent la présence des séquences NTS autour de *pilE* et des gènes de la cassette *pilS*.

Figure adaptée de Hill & Davies, 2009)

Les souches de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* expriment également deux types de protéines d'opacité de la membrane externe, Opa et Opc. *N. gonorrhoeae* peut posséder dans son génome jusqu'à 12 gènes *opa*, tandis *N. meningitidis* code généralement pour trois à quatre protéines Opa. Opc n'est exprimée que par *N. meningitidis* et codée par un seul gène. L'expression de l'Opa dépend des variations antigéniques et de phase qui permet rapidement et réversiblement de changer le statut d'expression d'un gène (on/off). Le groupe de protéines Opa a été identifié par sa capacité

à médier l'attachement et l'invasion de *N. gonorrhoeae* à plusieurs lignées cellulaires épithéliales telles que les cellules de carcinome du col de l'utérus (Hauck, 2003). Opa interagit avec plusieurs membres de la famille CEACAM (*carcinoembryonic antigen related cell-adhesion molecule*) qui sont surexprimés durant l'inflammation. Cette augmentation de l'expression des CEACAM facilite les interactions avec Opa et donc l'attachement et l'invasion cellulaire (Proft & Baker, 2008)

1.2.5. Compétence naturelle

Certaines bactéries, dont les bactéries du genre *Neisseria*, sont capables d'importer activement des fragments d'ADN de leur environnement à travers leur enveloppe jusqu'à leur cytoplasme et d'incorporer l'ADN dans leur génome par recombinaison homologue.

Les bactéries à GRAM négatif absorbent l'ADN exogène en deux étapes : l'absorption de l'ADN à travers la membrane externe et la translocation de l'ADN à travers la membrane interne. L'absorption de l'ADN n'est pas spécifique à une séquence. Toutefois, il a été mis en évidence que deux familles éloignées de bactéries à GRAM négatif, les *Pasteurellaceae* et les *Neisseriaceae* montrent de fortes préférences pour les régions d'ADN contenant des séquences courtes qui sont fortement surreprésentées dans leur propre génome. Cette séquence répétée de 10-bp (5'-GCCGTCTGAA-3') appelée DUS (DNA-Uptake Sequence), est retrouvée dans le génome de *Neisseria gonorrhoeae* et présente chez d'autres espèces de *Neisseria*. On retrouve notamment jusqu'à huit séquences variantes de DUS au sein de la famille des *Neisseriaceae*. Ces variantes appelées dialectes DUS présentent une séquence centrale commune mais qui diffèrent parfois de quelques nucléotides permettent de réguler efficacement la recombinaison interspécifique chez *N. meningitidis*, et chez d'autres espèces de la famille des *Neisseriaceae*. Le degré de similarité entre le dialecte DUS de l'espèce receveuse et l'ADN du donneur est lié à la capacité de transformation mais également à la liaison et à l'absorption de l'ADN (Frye et al., 2013). Pouvant représenter jusqu'à 1% du génome entier des bactéries, cette séquence DUS permet la transformation de plasmides non-transformables (Elkins et al., 1991). Chez *N. gonorrhoeae*, l'absorption spécifique de séquences porteuses de DUS est médiée par une pseudopiline ComP (Aas et al., 2002).

1.2.5.1. Import de l'ADN

Toutes les bactéries compétentes naturellement possèdent à leur surface des pili de type IV (Tfp) ou des protéines similaires. Il s'agit de structures composées de la piline majeure PilE et de plusieurs pilines mineures dont ComP et PilV. L'expression de ces structures est nécessaire à l'absorption et à la transformation de l'ADN.

L'absorption se produit par rétraction de PilT afin d'attirer l'ADN dans le périplasma à travers les pores de sécrétine PilQ de la membrane externe. La protéine soluble périplasmique ComE se lie à l'ADN entrant et permet sa translocation de la membrane externe vers le périplasma. Finalement, un seul brin d'ADN accède au cytosol à travers le pore de la membrane interne ComA avec son extrémité 3' en tête. Le brin qui n'est pas transloqué est dégradé à la surface de la membrane en nucléotides, qui peuvent ensuite être déphosphorylés et repris par des transporteurs de nucléosides (Krüger & Stingl, 2011) (**figure 7**).

Une fois dans le cytoplasme, l'ADN simple brin est pris en charge par diverses enzymes tel que RecA et la voie RecBCD, indispensable pour la recombinaison homologue et l'intégration de la séquence étrangère au sein du génome (Hamilton & Dillard, 2005).

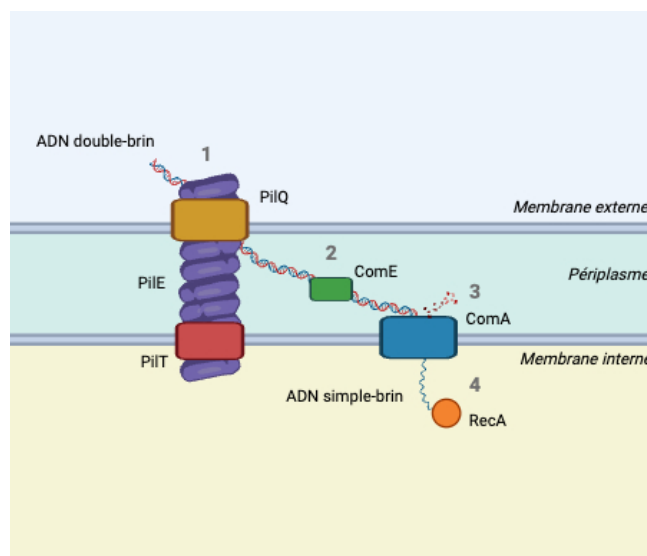


Figure 7 : Mécanisme d'import d'ADN par transformation naturelle dans le genre *Neisseria*

1. Entrée de l'ADN étranger double-brin via le pore de la membrane externe PilQ et par rétraction de PilT.
2. Liaison à la protéine ComE dans le périplasma.
3. Translocation d'un seul brin de l'ADN par le pore de la membrane interne ComA, entrée dans le cytosol.
4. Prise en charge du brin par RecA pour la recombinaison homologue.

Figure adaptée de Krüger and Stingl (2011) et créée sur Biorender.com

L'absorption de l'ADN dépend des besoins nutritionnels de la cellule, de la présence de dommages à l'ADN, et de la capacité de l'ADN entrant à se recombiner avec l'ADN chromosomique.

La transformation naturelle permet l'insertion et la délétion de grandes séquences qui se transforment bien si elles sont flanquées de séquences d'homologie chromosomique. L'homologie à une seule extrémité d'un segment hétérologue peut suffire à favoriser la recombinaison. Ces insertions de séquences homologues peuvent promouvoir la diversification génétique en conférant aux bactéries des avantages évolutifs sur le long terme. La transformation naturelle est un mode de transfert horizontal de gène décrit pour la première fois dans les travaux de Frederick Griffith publié en 1928. Une souche de *Streptococcus pneumoniae* non-virulente est devenue virulente après co-inoculation dans des souris avec une souche de *Streptococcus pneumoniae* pathogène virulente tué par la chaleur. Ce mécanisme génétique permet ainsi l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence mais également la transmission de résistances aux antibiotiques et donc un avantage sélectif (Blokesch, 2016).

1.2.6. Données préliminaires de SsnA chez *Neisseria meningitidis*

1.2.6.1. Rôle de SsnA dans la compétence naturelle

Afin de tester le rôle de SsnA dans la compétence naturelle et la recombinaison, des souches de *N. meningitidis* ont été utilisées pour effectuer des tests de transformation quantitatifs (Chenal, 2024). Les souches utilisées dans ces tests sont la souche sauvage *N. meningitidis* 8013 2C4.3 et deux souches mutantes générées dans le laboratoire. La première possède le gène *ssnA* inactivé par l'insertion d'un gène de résistance à l'érythromycine : SsnA KO (Δ *ssnA*) et la deuxième appelée SsnA Compl a été créée à partir de cette dernière en réintroduisant *ssnA* ailleurs dans le génome sous un promoteur fort. Ces tests de transformation ont permis de mesurer la fréquence d'intégration de marqueurs de sélection au chromosome. Pour cela, des plasmides intégratifs comprenant des régions homologues au chromosome ont été construits en intégrant des gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs de sélection.

Le premier test de recombinaison consistait en l'utilisation de plasmides intégratifs contenant une cassette de résistance au chloramphénicol (Cm), flanquée de séquences homologues au génome receveur et ne contenant aucune NTS (**figure 8A**). Pour la souche Δ *ssnA*, peu ou pas de diminution du taux de transformation n'était observée, contrairement à la souche *SsnA* Compl chez qui l'intégration du marqueur de sélection par recombinaison homologue était plus marquée. Cependant, ce résultat n'était pas observé avec toutes les constructions sans NTS.

Le second test a été réalisé avec des plasmides intégratifs avec des régions d'homologie au génome contenant des NTS (**figure 8B**). Cette fois-ci, un phénotype reproductible, inverse au premier test, montre qu'en l'absence de *SsnA*, l'intégration de la cassette antibiotique dans le génome est beaucoup plus fréquente que dans la souche sauvage. À l'inverse, dans la souche complémentée surexprimant *ssnA*, une réduction importante du taux de transformation est observée.

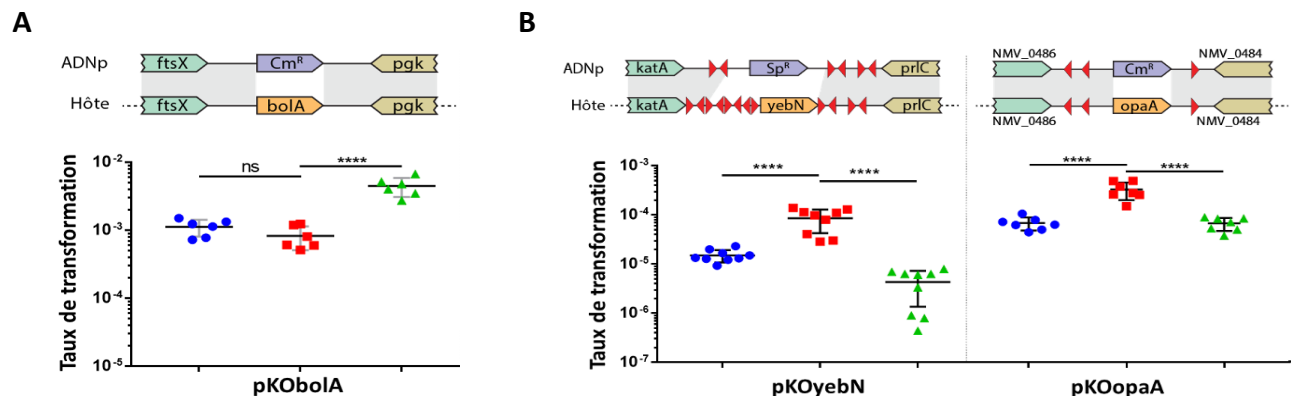


Figure 8 : Tests de transformation de plasmides porteurs ou non de NTS

(Chenal, 2024)

A. Transformation dans *Neisseria meningitidis* d'un plasmide intégratif contenant une cassette de résistance au chloramphénicol (Cm) et n'abritant aucune NTS. **B.** Transformation de deux plasmides intégratifs contenant un marqueur de sélection flanqué de séquences homologues au génome de l'hôte avec plusieurs copies de la NTS. Pour A et B, les taux de transformation représentent le ratio de UFCs ayant acquis la résistance sur le nombre total de UFCs. Chaque point correspond à une réaction de transformation distincte provenant d'au moins trois expériences indépendantes dont la moyenne et l'écart-type sont montrés. Des ANOVA unilatérales avec comparaisons multiples de Tukey ont été utilisées comme tests statistiques. ns : non significatif, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Ces résultats montrent que SsnA diminue fortement l'intégration de l'ADN transformant contenant des NTS. SsnA semble agir comme un médiateur de la transformation ou de la recombinaison exerçant son activité nucléase sur l'ADN transformant juste avant sa recombinaison avec le chromosome (Chenal, 2024).

1.2.6.2. Infections *in vivo*

À partir d'un modèle d'infection de souris par *N. meningitidis*, il a été possible d'obtenir une infection systémique similaire à la méningococcie chez l'humain sans utiliser de souris humanisées ou transgéniques. Des souris ont été infectées avec une dose sous-létale de virus influenza une semaine avant de procéder à la surinfection avec *N. meningitidis*. De plus, l'inoculum bactérien a été supplémenté de transferrine humaine au moment de l'infection afin de fournir la source de fer spécifiquement retrouvée chez l'humain et absente chez les souris. Celles-ci ont été infecté par des souches hyperinvasives luminescentes de *N. meningitidis*, permettant le suivi en temps réel de l'infection de façon très précise. L'objectif ici était d'étudier le potentiel rôle de SsnA dans la virulence de *N. meningitidis* dans des conditions biologiques *in vivo*.

Le potentiel pathogène des souches *N. meningitidis* LNP20553 *lux* sauvage, Δ *ssnA* et SsnA Compl a été évalué *in vivo* (**figure 9**). Malgré un début d'infection similaire chez toutes les souris, les différences de signal lumineux, indicatif de la charge bactérienne, apparaissent 24h après l'infection. Les souris infectées par la souche Δ *ssnA* montrent une réduction drastique de la luminescence par rapport à celles infectées par la souche sauvage, un effet réversible pour la souche Compl.

Les différences significatives de signal lumineux sont observées dès la douzième heure après l'infection. Une augmentation rapide de la charge bactérienne et une dissémination systémique sont notées initialement, suivies d'une diminution probable due à la réponse immunitaire de l'hôte. Au-delà de 24 heures post-infection, l'infection par la souche $\Delta ssnA$ est presque éliminée, tandis que les souches sauvages et Compl montrent encore une forte infection et des symptômes cliniques graves.

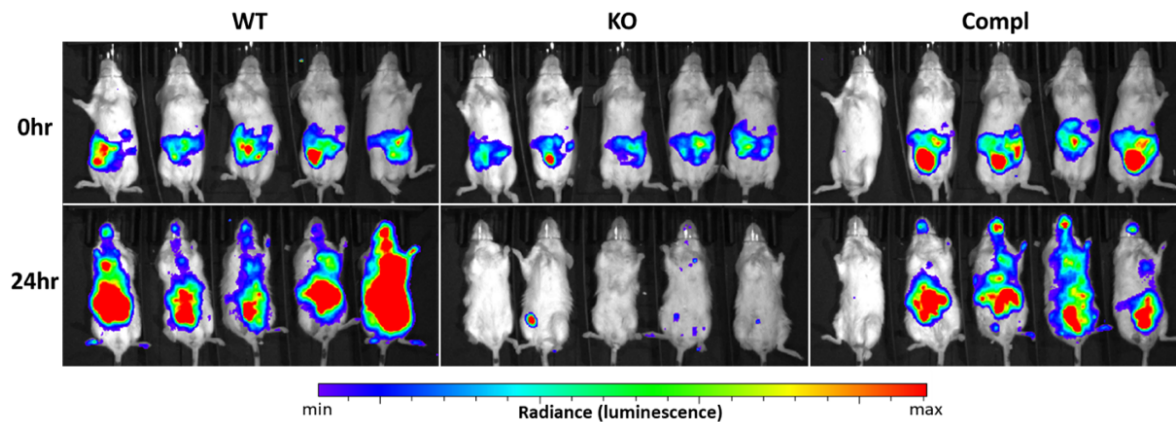


Figure 9 : Infections systémiques de souris avec *Nm LNP20553 lux WT*, $\Delta ssnA$ et Compl
(Chenal, 2023)

WT : sauvage, KO : mutant $\Delta ssnA$, Compl : complémenté SsnA

Superposition des photographies et des acquisitions de luminescence de toutes les souris infectées aux temps 0 et 24h PI avec une échelle de signal lumineux identique dans toutes les images.

Il semblerait donc que SsnA est un effecteur important de la pathogénicité de *N. meningitidis*, puisque l'absence de cette nucléase conduit à une élimination presque complète de l'infection en moins de 48h. Les différents phénotypes étant observés après le pic d'infection, SsnA jouerait un rôle dans l'évasion immunitaire et le maintien de la charge bactérienne lors d'infections *in vivo* plutôt qu'un rôle dans son établissement et la multiplication bactérienne (Chenal, 2023).

Cette nucléase est présente dans d'autres espèces du domaine bactérien, tel que des espèces commensales ou encore des symbiotes de plantes. Nous avons noté qu'une grande proportion (environ 80%) des espèces ayant plus de 300 NTS dans leur génome sont des bactéries symbiotiques de plantes, de mammifères ou d'insectes (comme *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Neisseria*, *Sphingomonas*, *Poivalibacter* and *Devosia*). Nous avons alors supposé que cette nucléase pourrait jouer un rôle important dans les interactions hôte-bactéries. Les espèces pathogènes chez l'Homme (comme *Rickettsia*) sont difficile

à manipuler génétiquement, nous avons donc opté pour un autre modèle d'interaction hôte-bactéries.

1.3. UNE BACTERIE SYMBIOTE DE LA PLANTE : *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

1.3.1. Le genre *Rhizobium*

Le genre *Rhizobium* est issu d'un groupe de bactérie appelé Rhizobia ou bactéries nodulatrices des racines. Les rhizobia se répartissent en sept familles bactériennes, divisées en 15 genres. Les bactéries du genre *Rhizobium* sont des bactéries GRAM négatives appartenant au phylum des Protéobactéries. Ces symbiotes facultatifs induisent la formation de nodules dans les racines et les tiges des plantes légumineuses et permettent la fixation de l'azote à l'intérieur de ces derniers. Le genre *Rhizobium* contient 71 espèces, qui peuvent elles-mêmes être divisées en symbiovars distincts.

La relation entre les rhizobia et les légumineuses est la symbiose mutualiste la plus connue et la mieux comprise entre un procaryote et un eucaryote. Les légumineuses en tirent profit puisqu'elles peuvent croître dans un sol pauvre en azote. Toutefois, les bénéfices que peuvent tirer les rhizobia de cette symbiose sont encore mal connus. Néanmoins, l'augmentation du nombre de rhizobia dans le sol après une culture semble être un indicateur évident que la symbiose apporte un avantage reproductif qui devrait permettre l'évolution de l'espèce (Noel, 2009).

Un déterminant génétique commun aux rhizobia est la présence de gènes codant pour les fonctions de nodulation et de fixation de l'azote (gènes *nod*, *nif* et *fix*). Ces gènes sont souvent portés par des plasmides ou d'autres éléments accessoires, tels que des îlots symbiotiques, et ces propriétés peuvent être facilement perdues ou gagnées.

Le nom *Rhizobium leguminosarum* a été proposé pour désigner les bactéries nodulaires racinaires isolées des racines des légumineuses de la famille des *Fabaceae* (Frank, 1889). Malgré la description de nombreuses nouvelles espèces, une grande diversité génétique subsiste au sein de l'espèce *R. leguminosarum* avec une diversité génomique sur un seul site dix fois supérieure à celle de *Sinorhizobium medicae*, autre bactérie du genre *Rhizobium*, sur le même site (Bailly et al., 2011). Chez *R.*

leguminosarum, les gènes *nod* sont principalement retrouvés sur le plasmide symbiotique pSym. Au sein de l'espèce, il existe trois symbiovars distincts dont bv. *phaseoli* qui forme des nodules avec *Phaseolus vulgaris*, bv. *trifolii* qui forme des nodules avec le trèfle (*Trifolium*) et bv. *viciae* qui forme des nodules sur la vesce, le pois et la lentille (*Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* et *Lens*).

1.3.1.1. Fixation de l'azote

L'azote (N₂) est un élément crucial pour la composition de l'urée, des acides aminés, des acides nucléiques, et de l'ATP dans toutes les cellules vivantes. Il est également un constituant majeur de la chlorophylle responsable à la photosynthèse, jouant un rôle dans la croissance des plantes. Il s'agit du gaz le plus abondant de l'atmosphère. Toutefois, les plantes ne peuvent assimiler que des formes réactives de l'azote, telles que les azotes réduits comme NH₃ et amines.

La fixation de l'azote consiste en la réduction de l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃). Cette réaction coûteuse en énergie en condition abiotique n'a jamais lieu ou alors se produit à des taux extrêmement faibles dans des conditions ambiantes normales. Elle n'a lieu que chez une minorité de procaryotes appelés diazotrophes, les Rhizobia étant les symbiotes diazotrophes les plus connues. Les bactéries du genre *Rhizobium* permettent ainsi la fixation de l'azote chez les espèces végétales de la famille des *Fabaceae* (Lindström & Mousavi, 2019).

La fixation symbiotique de l'azote par les rhizobia est principalement contrôlée par les gènes *nif* et *fix*. Les gènes *nif* rhizobiens sont des homologues des gènes codant pour la synthèse et la fonction de la nitrogénase chez les bactéries non symbiotiques. Les gènes *nifKD* codent pour les sous-unités protéiques de la dinitrogénase tandis que *nifH* code pour le polypeptide de la nitrogénase réductase (Noel, 2009).

L'enzyme dinitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote selon l'équation suivante : $N_2 + 8 H^+ + 8 \text{ électrons} \rightarrow 2 NH_3 + H_2$.

Les gènes *fix* rhizobiens sont eux responsables de la fixation de l'azote et de la régulation de celle-ci. Deux voies sont notamment impliquées dans la régulation, la cascade de régulation RpoN-NifA et le système FixL-FixJ interagissant avec FixK. Les gènes *fixNOQP*, induits en conditions microaérobies, codent pour une cytochrome

oxydase liée à la membrane, essentielle dans la chaîne de transport d'électrons dans le mécanisme de la respiration cellulaire. Immédiatement en aval, les gènes *fixGHIS* codent pour le complexe hème-cuivre oxydase de type *cbb3*, crucial pour la symbiose entre les plantes et les bactéries. L'opéron *fixABCX*, nécessaire à l'activité de la nitrogénase, code pour une flavoprotéine à transfert d'électrons déshydrogénase (*fixABC*) et une protéine similaire aux ferrédoxines impliquées également dans le transfert d'électrons (*fixX*) *Leguminosae* (Lindström & Mousavi, 2019). Des mutations chez ces gènes responsables de la formation et de l'assemblage des cytochromes rhizobiens augmentent la respiration cellulaire des souches mutantes et démontrent leur rôle essentiel pour la fixation symbiotique de l'azote (Delgado et al., 1998).

1.3.1.2. Système d'absorption de H₂

Le dégagement du dihydrogène (H₂) issu de la réaction de la nitrogénase a longtemps été considéré comme un gaspillage d'énergie puisque celui-ci se diffuse dans le sol environnant. Toutefois, certaines souches de rhizobia sont capables d'absorber le H₂ émis grâce à un gène *hup* codant pour une enzyme hydrogénase. Elle permet aux bactéries de récupérer une partie de l'énergie perdue en oxydant l'H₂ ce qui améliore le processus de fixation de l'azote. Les souches rhizobiennes qui expriment une activité d'absorption hydrogénase sont appelés Hup-positifs (Hup+). À l'inverse, celles qui ne possèdent pas ou n'expriment pas le gène *hup* sont appelés Hup-négatifs (Hup-). Le recyclage du dihydrogène augmente considérablement les niveaux d'azote dans les légumineuses suggérant des effets bénéfiques de ce mécanisme. Les associations Hup+ sont, en effet, bénéfiques pour les bactéries nodulatrices en leur permettant d'économiser de l'énergie (Dong, 2001). Toutefois, les symbiotes Hup+ restent minoritaires et il a été démontré que les symbioses Hup- favorisent la croissance des légumineuses grâce à l'accumulation de H₂ dans les nodules et dans le sol environnant (Annan et al., 2012).

1.3.1.3. Nodulation

La structure dans laquelle a lieu la réduction de l'azote moléculaire (N₂) en ammoniac (NH₃) est appelé nodule. Les nodules se trouvent principalement sur les racines des légumineuses, mais peuvent être parfois présentes sur les tiges. Ils varient

en forme et en taille, mais présentent tous des structures modifiées par rapport aux cellules racinaires normales.

La nodulation résulte d'un dialogue moléculaire spécifique entre l'hôte et la bactérie présente dans la rhizosphère (**figure 10**). La plante sécrète et diffuse dans son environnement des molécules de signalisation appelés flavonoïdes ainsi que des métabolismes secondaires. Ces signaux sont captés par le récepteur bactérien NodD, induisant l'activation des gènes rhizobiens de la nodulation *nodA*, *nodB* et *nodC*. Ces gènes encodent pour un lipo-chitooligosaccharide, le facteur de nodulation Nod (Franche et al., 2008). Celui-ci est un inducteur de la formation du nodule racinaire par la plante en déclenchant un programme de développement conduisant à la construction du nodule racinaire et à l'entrée des rhizobia dans le nodule par la déformation des poils absorbants et la division des cellules corticales (Moulin et al., 2004).

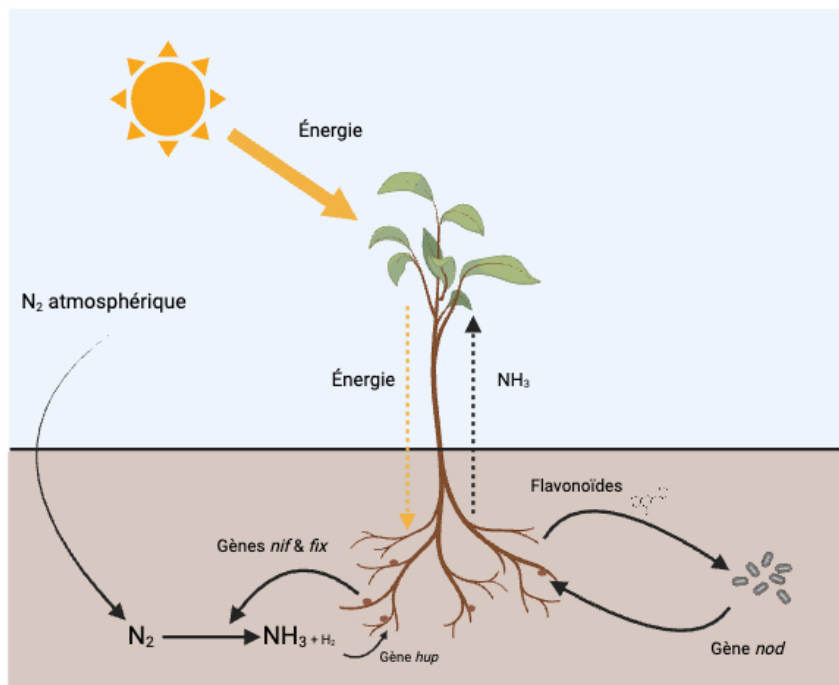


Figure 10 : Modèle de la fixation symbiotique de l'azote dans les légumineuses par les rhizobia

Image créée sur Biorender.com et adaptée de Lindström and Mousavi (2019).

1.3.2. Nucléases du genre *Rhizobium*

Une nucléase du genre *Rhizobium* joue un rôle clé dans la défense contre les phages. Cette protéine spécifique, Hna, présente chez *Sinorhizobium meliloti*, une alpha-protéobactérie fixatrice d'azote, offre une protection contre divers phages. Cette protéine

contient des motifs d'hélicase de la superfamille II à son extrémité N et un motif de nucléase à son extrémité C. La mutation de ces motifs entraîne l'inactivation de la défense virale. En réponse à l'infection, Hna déclenche une réponse d'infection abortive, où les cellules infectées meurent sans libérer de phages, limitant ainsi leur propagation. Les homologues de Hna sont largement présents dans différentes lignées bactériennes, soulignant l'importance de ces nucléases dans la protection contre les phages (Sather, 2023).

Par ailleurs, la structure du gène de l'ADN polymérase I de *R. leguminosarum* a été caractérisée, révélant que si les domaines 5'-nucléase et ADN polymérase sont hautement conservés entre *R. leguminosarum*, *E. coli* et d'autres espèces, le domaine exonucléase 3'-5' présente moins de similarités. Cette exonucléase 3'-5', responsable de la relecture de l'ADN, est présente chez *R. leguminosarum* mais absente chez des bactéries apparentées comme *Rickettsia prowazekii* (Huang et al., 1999).

1.3.3. Données préliminaires de la nodulation chez *Vicia sativa* (Pini et al., 2017)

Afin de suivre la croissance de *R. leguminosarum* *bv. viciae* au cours du temps en conditions *in vivo*, un modèle d'ensemencement de la vesce (*Vicia hirsuta*) et du pois (*Pisum sativum* 'Avola') a été mis en place par l'équipe de Pini et al. (2017). L'objectif de cet article était l'étude de la modification de la rhizosphère des légumineuses en suivant de la sécrétion de nutriments et de métabolites secondaires par les racines. Des biocapteurs ont été construits à partir de souches de *R. leguminosarum* afin de suivre par bioluminescence la durée et la localisation de la sécrétion de ces molécules. La construction des biocapteurs a été réalisée en clonant dans un plasmide les régions promotrices des gènes codants pour les transporteurs des différents solutés étudiés (sucres et polyols, acides organiques, acides aminés et flavinoïdes) en amont de l'opéron bactérien *luxCDABE*. Ces plasmides ont par la suite été conjugués dans une souche de *R. leguminosarum* *bv. viciae*.

Ce modèle permet de suivre *in vivo* de la colonisation bactérienne dans les racines de la vesce et du pois (**figure 11**). La luminescence a été mesurée pendant 22 jours suivant l'ensemencement. Par la suite, une diminution du signal est observée, en raison

de l'épuisement des réserves d'énergie bactérienne entraînant une perte de signal. La luminescence détectée entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jour suivant l'ensemencement est localisée principalement dans la zone d'élongation des racines. Entre 11 et 15 jours après l'ensemencement, le signal Lux était localisé principalement dans les nodules, lieu de la fixation de l'azote. Situés sur les racines des légumineuses, ils permettent la localisation des bactéries métaboliquement actives.

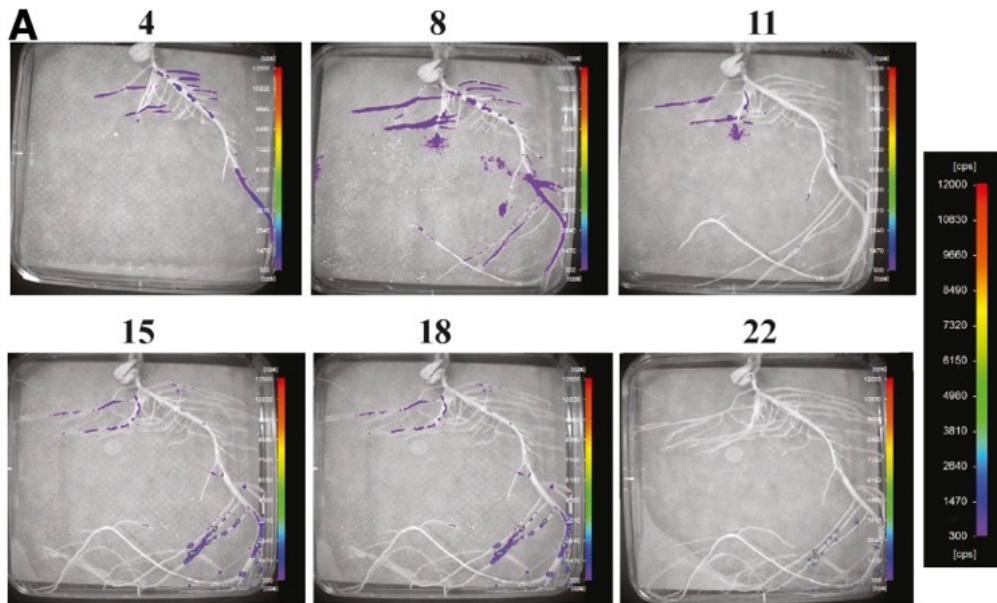


Figure 11 : Modèle de suivi de la colonisation bactérienne dans les racines du pois par bioluminescence de *Rhizobium leguminosarum*

Au cours de la croissance des racines du pois, la colonisation bactérienne se concentre premièrement dans les zones d'élongation des racines puis finit par se localiser dans les nodules (Pini et al., 2017).

Grâce à ce modèle, il est possible de suivre, sur la même plante, la colonisation bactérienne pendant plusieurs jours et de visualiser la colonisation des nodules par *R. leguminosarum*, avec une collecte de données non-invasive. Dans le contexte de notre étude, ce système est idéal pour suivre la croissance bactérienne au cours du temps et évaluer la proportion de bactéries rhizobiennes présente dans les nodules de l'hôte.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'exploration du rôle de SsnA dans la relation hôte-bactérie est au centre de ce travail de recherche, tant dans le contexte de la virulence de *N. meningitidis* que dans celui de la colonisation bactérienne symbiotique par *R. leguminosarum*. Notre laboratoire a pu mettre en évidence le rôle de la nucléase SsnA dans la régulation de la compétence naturelle et de la recombinaison homologue, mais également dans le maintien de l'infection dans des conditions *in vivo* chez *N. meningitidis* (Chenal, 2024). Nous supposons dans ce travail que SsnA est un effecteur majeur dans l'adaptation de *N. meningitidis* dans un contexte infectieux chez l'hôte. Cette nucléase étant retrouvée sur l'ensemble du domaine bactérien tout comme les séquences NTS notamment chez les symbiotes du genre *Rhizobium*, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle peut influencer la colonisation de la bactérie dans les nodules de son hôte.

Les objectifs spécifiques de cette recherche sont les suivants :

1. Étude du rôle de SsnA dans la virulence bactérienne *in vivo* : Évaluer la survie des différentes souches sauvages et mutées de *N. meningitidis* après l'infection et déterminer le rôle de *ssnA* sur la recombinaison antigénique dans un contexte infectieux.
2. Étude d'un homologue du gène *ssnA* chez *R. leguminosarum* et de sa fonction : Mettre en place un modèle de culture de *Vicia sativa* dans un milieu gélosé afin de visualiser et d'analyser en détail les interactions entre la plante et la bactérie, mettre en place un modèle de suivi de la colonisation bactérienne des nodules par bioluminescence et construire un mutant *ssnA* dans *R. leguminosarum* pour étudier le rôle de ce gène homologue dans la symbiose entre *R. leguminosarum* et *Vicia sativa*.

Ce projet de recherche vise à éclairer les fonctions de SsnA dans des contextes pathogènes et symbiotiques, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de son rôle dans la biologie bactérienne.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.4. SOUCHES ET MILIEUX

Les souches bactériennes utilisées dans ce projet de recherche sont regroupées dans le **tableau 1**, en recapitulant leurs différentes caractéristiques.

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans ce projet

Espèce et souche	Caractéristiques	Description
<i>E. coli</i> DH5 α		Souche de clonage, d'amplification de plasmides et de conjugaison
<i>E. coli</i> β 2163	Km ^R , Ery ^R	Souche de conjugaison
<i>N. meningitidis</i> 8013 2C4.3	WT Δ <i>ssnA</i> ::Ery (KO) NMV_0632:: <i>pilEp-ssnA</i> ::Km (Compl)	WT : Souche sauvage KO : <i>ssnA</i> délété Compl : <i>ssnA</i> délété puis réintroduit sous un promoteur fort ailleurs dans le génome (Chenal, 2024)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 986 (UMP 791)	WT, Str ^R	WT : Souche sauvage (Leyva et al., 1987)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 986 (UMP 791) <i>lux</i>	WT, Str ^R , Tc ^R , pLMB757 (cassette <i>lux</i>)	Souche WT luminescente (cette étude)

1.4.1. *Neisseria meningitidis*

Dans le cadre de ce projet, la souche *N. meningitidis* 8013 2C4.3 a été utilisée. *N. meningitidis* a été cultivée sur un milieu de base Gonococcique (GCB, Oxoid), constitué de 15 g de peptone, 1 g d'amidon de maïs, 5 g de chlorure de sodium (NaCl), 4 g d'hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄), 1 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) et 10 g d'agar par litre. Pour la culture liquide, le milieu a été utilisé sans agar. Après autoclavage, ces milieux ont été complétés avec les suppléments Kellogg's :

- Le Supplément Kellogg's 1 (100x) : 40 g de glucose, 1 g de glutamine et 2 mg de thiamine pyrophosphate dans 100 ml d'eau, stérilisé par filtration (filtre de 0.2 μm).
- Le Supplément Kellogg's 2 (1000x) : 50 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau, stérilisé par filtration (filtre de 0.2 μm).

Des antibiotiques ont également été ajoutés au milieu aux concentrations indiquées dans le **tableau 2**. Les souches de *N. meningitidis* ont été incubées pendant 24h à 37°C avec 5% de CO_2 après ensemencement des milieux.

Dans le cadre de l'étude phénotypique de SsnA, deux souches mutantes de *Neisseria meningitidis* 8013 2C4.3 ont été générées dans le laboratoire, la première étant mutée pour *ssnA* (ΔssnA) et la seconde complémentée avec *ssnA* réintroduit sous promoteur fort dans la souche précédente (SsnA Compl) (**tableau 1**) (Chenal, 2024).

1.4.2. Escherichia coli

Pour tous les clonages ayant servi à produire les plasmides, la souche *Escherichia coli* DH5 α a été utilisée. Cette souche a été rendue chimiquement compétente selon un protocole standard utilisant un tampon CCMB80 composé de CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 et d'acétate de potassium (Hanahan et al., 1991). *E. coli* a été cultivée sur du milieu LuriaBertani Miller (Miller's LB, Fisher), auquel des antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations spécifiées dans le **tableau 2**.

Pour la conjugaison de plasmides dans *R. leguminosarum*, la souche *E. coli* β 2163 ont été rendues chimiquement compétentes par le même processus. Cette souche auxotrophe est cultivée sur le milieu LB complémenté avec 0.3 mM de 5-diaminopimelic acid (DAP). Cet ajout permet une contre-sélection dans les protocoles de conjugaison, puisque sans supplémentation en DAP dans le milieu de culture, la souche ne peut pas croître. En effet, celle-ci n'est pas capable de synthétiser le DAP, un précurseur de la voie métabolique de la lysine, un acide aminé essentiel dans la croissance bactérienne (Demarre et al., 2005).

1.4.3. *Rhizobium leguminosarum*

La souche *R. leguminosarum* 986 (UMP791) a été utilisée pour réaliser les études de la fonction d'un homologue du gène *ssnA* chez un symbiote de la plante. Cette souche est dérivée de la souche *R. leguminosarum* 128C53 avec les phénotypes Nod+, Fix+ et Hup+ (Leyva et al., 1987). Elle a été cultivée sur le milieu TY (Tryptone Yeast) composé de 5 g de tryptone, 3 g d'extrait de levure, 0.9 g de CaCl₂.2H₂O et 15 g d'agar par litres. Pour les manipulations en culture liquide, le milieu TY a été préparé sans ajout d'agar. Les antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations indiquées dans le **tableau 2** lorsque cela était nécessaire.

Tableau 2 : Concentration en antibiotiques des milieux de culture

Antibiotique	Concentration (µg/mL)	Antibiotique	Concentration (µg/mL)
Érythromycine	Nm : 3 Rh : 25 Ec : 300	Chloramphénicol	Nm : 5 Rh : 25 Ec : 25
Kanamycine	Nm : 50 Rh : 50 Ec : 100	Tétracycline	Rh : 25 Ec : 10
Ampicilline	Rh : 100 Ec : 100	Streptomycine	Rh : 200

Nm : *Neisseria meningitidis*, Rh : *Rhizobium leguminosarum*, Ec : *Escherichia coli*

1.4.4. Plasmides

Tous les plasmides de cette étude regroupés dans le **tableau 3** ont été transformés dans des souches *E.coli* DH5 α et β 2163 compétentes. Les plasmides d'intérêt ont été incubés durant 30 min avec les cellules compétentes sur glace avant un choc thermique de quelques secondes à 41°C. Après culture sous agitation à 37°C pendant 1 heure, la suspension a été étalée sur du milieu de culture LB agar supplémenté avec l'antibiotique spécifique du plasmide. À la suite d'une incubation pendant 24 heures à 37°C, les clones ayant poussé ont été vérifiés par digestion enzymatique après extraction.

L'extraction des plasmides a été réalisée à l'aide du kit Qiagen MiniPrep en suivant les recommandations du fournisseur. La quantité d'ADN plasmidique après extraction a été déterminée par dosage au Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés dans ce projet

Usage	Plasmides	Description	Source
Génération de mutants de <i>Rh</i>	pKOSsnARh::Ery	Délétion de <i>ssnA</i> de <i>R. leguminosarum</i>	Cette étude
	pJET1.2/blunt	Vecteur de clonage	Thermo Scientific
	pK18mobSacB::Km	Vecteur mobilisable pour intégration dans le génome	Schäfer et al. (1994)
	pLMB757 ::Tc	Plasmide conjugable dans <i>R. leguminosarum</i> avec la cassette lux <i>luxCDABE</i>	Pini et al. (2017)

1.5. TESTS DE VIRULENCE

Infections de souris : Afin d'étudier l'impact de la délétion de SsnA dans la virulence de *N. meningitidis* in vivo, des souris BALB/c femelles âgées de 8 semaines ont été infectées avec des souches *N. meningitidis* 8013 2C4.3 sauvage, Δ *ssnA* et SsnA Compl. Une semaine précédant l'infection, les souris ont été infectées avec le virus de la grippe (250 PFU/mL) dans chaque narine. Les suspensions bactériennes à une concentration égale à DO₆₀₀ 0.05 ont été injectées en intrapéritonéale aux souris. En parallèle, de la transferrine humaine à 20 mg/mL est également inoculée aux souris. Après 12 heures d'infection, le sang des souris a été prélevé et dilué au 1/2 dans du GCB liquide.

Dénombrement des colonies : Une dilution en série de chaque échantillon jusqu'à 10⁻⁶ a été réalisé dans du GCB liquide et chaque dilution a été étalée sur des boîtes de GCB seul ou avec des antibiotiques. Le lendemain, les colonies ont pu être dénombrées en UFC/mL.

Extraction de l'ADN : Deux clones de chaque souche provenant du sang de chaque souris infectée ont été isolés sur les milieux sélectifs. Avec cinq souris pour chaque groupe (WT, Δ *ssnA* et Compl SsnA), 30 clones ont été amplifiés au total. L'ADN de ces clones a pu être extrait à l'aide du protocole d'isolation de l'ADN génomique de bactérie

GRAM- inclus dans le kit QIAamp de Qiagen en suivant le protocole du fournisseur. Ces ADN extraits ont pu être dosés avec le Nanodrop et la présence d'ADN dans les échantillons ont été vérifiés par migration sur gel d'agarose 1%.

PCR de la région du gène *pilE* : La région du gène *pilE* des ADN extraits précédemment a été amplifié par PCR à l'aide des primers spécifiques de cette région chez *N. meningitidis*. Cette amplification a été réalisé avec la polymérase *Taq* DNA (NEB) en suivant le protocole du fournisseur. Les amorces utilisées sont retrouvées dans le **tableau 4**.

Séquençage : Les échantillons ont ensuite été séquencés à l'aide de la technique Sanger. Cette technique de séquençage est une méthode classique pour déterminer l'ordre exact des nucléotides dans un brin d'ADN. Son principe repose sur la synthèse d'ADN complémentaire par une ADN polymérase, en utilisant des amorces spécifiques marquées avec des nucléotides radioactifs ou fluorescents. Dans chaque réaction de séquençage, les quatre types de nucléotides (A, T, C et G) sont inclus. Aléatoirement, des didésoxynucléotide (ddNTP) sont ajoutés dans la réaction. Lorsque ce ddNTP est incorporé par l'ADN polymérase, la synthèse de l'ADN s'arrête, produisant une série de fragments d'ADN de longueurs variables, chacun se terminant par le nucléotide spécifique marqué. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel, selon leur taille, permettant ainsi de déterminer l'ordre des nucléotides en lisant la position des marqueurs radioactifs ou fluorescents.

Analyse bio-informatique des données : Les séquences sens et anti-sens ont été par la suite analysées en les alignant sur le logiciel Geneious Prime (Dotmatics) avec l'outil ClustalOmega. L'alignement de séquences multiples permet d'identifier les régions de similarité entre les séquences des trois groupes et de mettre en évidence l'apparition d'éventuelles mutations par recombinaison homologue. Sachant que la recombinaison homologue de la région *pilE* a lieu par transfert de séquences de *pilS* dans le locus *pilE*, les séquences ont également été alignées avec les séquences *pilS* afin d'identifier les origines des mutations. Cette comparaison a permis par la suite le calcul du taux de

recombinaison homologue dans les souches de *N.meningitidis* sauvage (WT), mutant SsnA (Δ ssnA) et complétement SsnA (SsnA Compl).

1.6. ÉTUDE D'UN HOMOLOGUE DE SSNA CHEZ UN SYMBIOTE DE LA PLANTE

1.6.1. Création d'une souche de *Rhizobium leguminosarum* luminescente

Transformation du plasmide pLMB757 dans *E.coli* β 2163 : Des souches de *R. leguminosarum* luminescentes ont été obtenues grâce au plasmide pLMB757. Il a été généré lors d'une étude visant à cartographier les sécrétions de métabolites par les racines à l'aide de souches de *R. leguminosarum* utilisés comme biocapteurs (Pini et al., 2017). Le plasmide pLMB757 contient des gènes de la cassette *luxCDABE* permettant la luminescence de la bactérie et des régions du transporteur de fructose *frcB* et *frcR*. Le plasmide a été transformé dans des souches de *E. coli* β 2163 compétentes.

Afin de vérifier que la bactérie avait acquis le bon plasmide, une extraction de l'ADN plasmidique avec le kit Qiagen MiniPrep a été réalisée et le plasmide a été digéré avec BamHI pendant 20 minutes à 37°C. Le produit de la digestion a ensuite migré sur un gel d'agarose à 1%.

Transformation par conjugaison dans *Rhizobium leguminosarum* : Le plasmide pLMB757 a été transformé dans *R. leguminosarum* à l'aide d'un protocole de conjugaison. La souche rhizobienne receveuse a été mise en culture dans du TY liquide à 28°C pendant 3 jours sous agitation et la souche donneuse *E. coli* β 2163 avec le plasmide pLMB757 a été mise en culture pendant 24 heures dans du LB-DAP liquide. Après plusieurs lavages avec du milieu frais pour éliminer les traces d'antibiotique, les bactéries donneuses et receveuses ont été mélangées et étalées sur du TY-DAP. Après 24 heures d'incubation, le tapis bactérien a été resuspendu dans du TY-DAP liquide. La suspension a finalement été inoculée sur du milieu TY agar supplémenté avec l'antibiotique Tétracycline. L'absence de DAP et la présence de Tétracycline a permis de sélectionner uniquement les clones de *R. leguminosarum* ayant acquis le plasmide luminescent.

Vérification des clones : L'acquisition du plasmide par les clones de *R. leguminosarum* a pu être vérifié de deux manières. Premièrement, à la suite de l'amplification de ceux-ci sur du milieu TY-Tétracycline agar, la luminescence des tapis bactériens a été mesuré grâce à l'appareil Ivis Lumina III (Perkin-Elmer). De plus, l'identité des colonies transformées ayant poussé sur le milieu sélectif est vérifiée par PCR de colonies avec des primers spécifiques de la région *ssnA* de *R. leguminosarum* (**tableau 4**) avant d'en faire un stock dans du GCB avec 15% de glycérol, qui est entreposé à -80°C.

Tableau 4 : Primers utilisées dans ce projet

Nom des amorces	Séquences
PilE_link_F	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGCATTTCCTTTCCAATTAGGAG
PilE_link_R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCGTGGAAAATCACTTACCGC
RhizoSsnAF	GACAGGCTTGGCCGGTCGCAATTCC
RhizoSsnAR	ACTTCTAGACGACATGCATTGGGCTAC

1.6.2. Délétion de SsnA dans *Rhizobium leguminosarum lux*

Création du plasmide pKOSsnARh::Ery : À la suite de l'extraction de l'ADN génomique de *R. leguminosarum* extrait via le kit QIAamp (QIAGEN), la région génomique contenant le gène *ssnA* et ses environs a été amplifiée avec les amorces RhizoSsnAF et RhizoSsnAR (**tableau S1**) par PCR Phusion High-Fidelity (NEB). Le produit PCR a par la suite été cloné dans pJET1.2 à l'aide de la T4 ligase du kit CloneJet PCR cloning (Thermo Scientific). Nous avons enlevé une partie de l'insert à l'aide d'une digestion avec l'enzyme de restriction NotI (qui coupe deux fois), purification du plasmide et re-ligation. Finalement, le plasmide a été linéarisé avec l'enzyme EcoRI pour insérer le gène de résistance à l'érythromycine au milieu du gène *ssnA*. Les deux séquences ont pu être liguées avec l'enzyme T4 ligase (NEB). Afin de vérifier les bonnes constructions, le plasmide a été digéré par les enzymes de restriction Scal, BamHI et EcoRI.

Après vérification, le plasmide a été digéré par l'enzyme PstI dans le but de conserver uniquement la région SsnAKORh::Ery. Le plasmide pK18mobSacB mobilisable a également été digéré avec PstI. L'insert et le vecteur ont finalement été ligués à l'aide de la T4 ligase. À la suite de la transformation du plasmide pKOSsnARh::Ery dans *E. coli*

Dh5α compétente, celui-ci a été vérifié par digestion enzymatique du plasmide (**figure 12AB**).

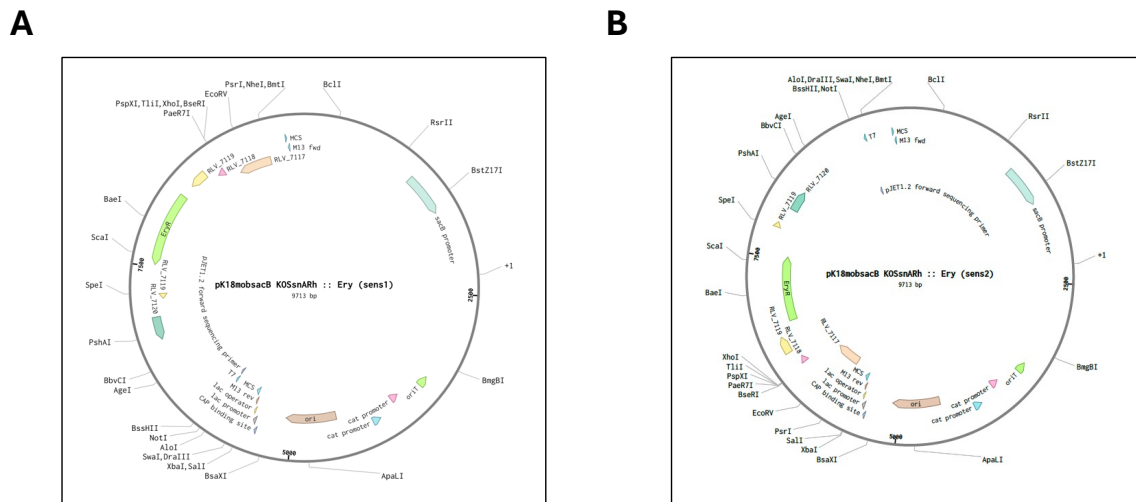


Figure 12 : Plasmide pKOSsNA Rh::Ery

- A. Plasmide pK18mobSacB avec insertion de la région KOSsNA Rh::Ery dans le sens 1
- B. Plasmide pK18mobSacB avec insertion de la région KOSsNA Rh::Ery dans le sens 2

Transformation du plasmide par conjugaison dans *R. leguminosarum lux* : Le plasmide pKOSsNA Rh::Ery a été transformé selon le même protocole que pLMB757 dans *R. leguminosarum*. Dans ce protocole, les cellules donneuses étaient des *E. coli Dh5α* contenant le plasmide. Afin de sélectionner uniquement les souches rhizobiennes ayant réalisées la première recombinaison homologue, le milieu TY agar a été supplémenté en streptomycine (pour sélectionner *R. leguminosarum*), en érythromycine (pour sélectionner les clones ayant intégrés le plasmide dans leur génome), et en tétracycline (pour sélectionner les clones luminescents). Dans le but de réaliser la seconde recombinaison homologue, les clones seront ensemencés sur du TY-érythromycine agar complémenté avec 10% de sucrose (**figure 13**).

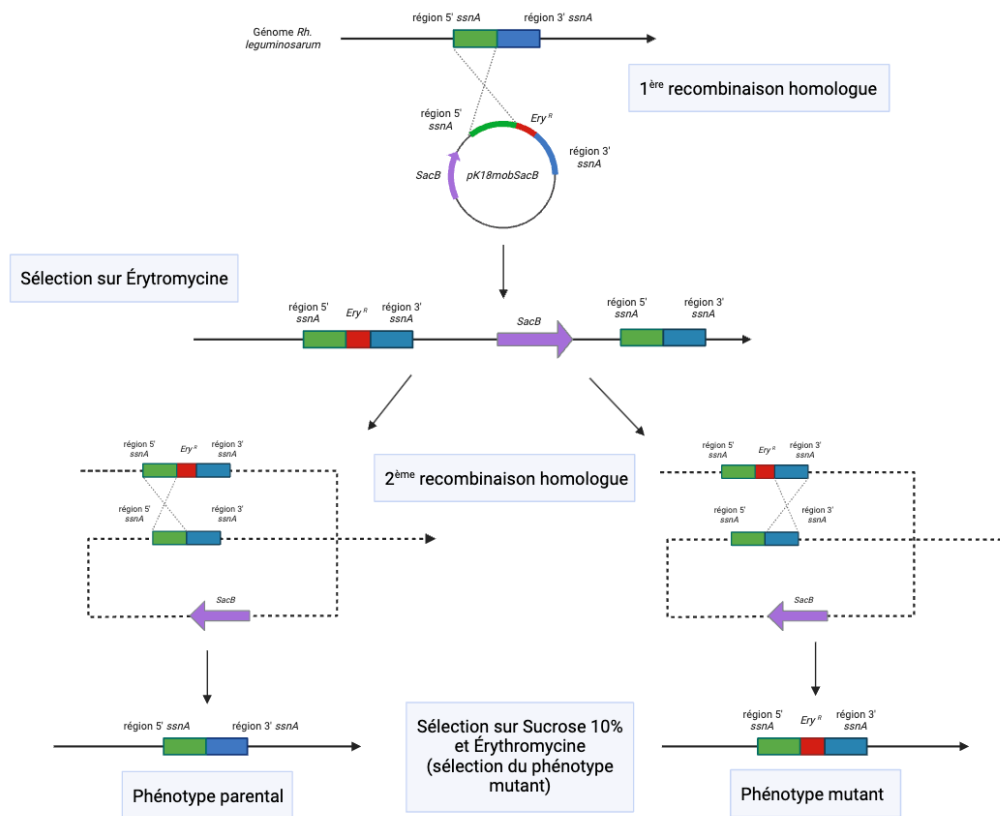


Figure 13 : Double recombinaison homologue dans le génome de *R. Leguminosarum*
 Image adaptée de Dai et al. (2018) et créée sur Biorender.com

1.6.3. Culture de *Vicia sativa* en milieu gélosé

Stérilisation et germination des semences : Les semences de *Vicia sativa* ont été stérilisées grâce à plusieurs étapes de lavage de celles-ci. Elles ont tout d'abord été lavées 3 minutes à l'éthanol 70% et rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Elles ont ensuite été immergées dans de l'eau de javel 5% pendant 20 min sous agitation et finalement lavées à l'eau distillée stérile cinq fois. Afin d'initier la germination des semences, deux méthodes ont été testées en parallèle. La première consistait en l'immersion des semences sur une boîte de pétri dans une solution H₂O-agar 1%. La seconde équivalait à placer les semences sur une boîte de pétri entre deux feuilles de papier absorbant imbibées d'eau distillée stérile. Les boîtes ont ensuite été placées dans un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit pendant 72 heures.

Culture sur gélose : Une fois les semences germées, elles ont été mises en culture dans des boîtes de pétri de 10 cm². Le milieu utilisé pour permettre leur croissance est le milieu Fåhraeus agar (Fåhraeus, 1957). Ce milieu est composé de 0.1 g de CaCl₂, 0.12 g de MgSO₄·7H₂O, 0.1 g de KH₂PO₄, 0.15 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 0.005 g de Fe citrate et de 15 g d'agar pour 1 litre d'eau distillée stérile. Des premiers tests de culture ont été réalisés afin de déterminer le volume idéal de milieu dans la boîte de pétri pour une croissance optimale de la semence. Ainsi, 3 volumes ont été testés : 25 mL, 40 mL et 50 mL de milieu Fåhraeus agar avec 4 semences par boîte. Les boîtes étaient ensuite mises en incubation dans la pièce avec un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit. Les boîtes de pétri étaient positionnées à plat avec la gélose dirigée vers le sol. Des photos des cultures ont été prises à différents temps afin de suivre la croissance des plantes. De plus, la longueur des racines a été mesurée à différents temps.

Un deuxième test de culture a été mis en place afin de déterminer la meilleure méthode d'ensemencement de la graine dans la gélose (**figure 14**). La semence a donc premièrement été placée dans la gélose encore liquide. Celle-ci, coulée en pente, permettait de figer la graine dans la gélose et d'initier la croissance des racines au sein de cette dernière (**figure 14A**). Un espace vide en haut de la boîte permettait le développement des feuilles hors de la gélose. La boîte était ensuite stockée dans un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit. Les boîtes de pétri étaient déposées à plat avec la gélose dirigée vers le sol. Des photos de la culture ont été prises à différents temps afin de suivre la croissance des plantes.

Dans un second temps, le milieu a été coulé à plat dans la boîte de pétri et un espace en haut de la gélose a été créé en découpant le milieu au scalpel. Un orifice dans la partie supérieure du milieu a permis de placer la radicule de la graine au sein de celui-ci (**figure 14B**). Ces boîtes ont été installées à la verticale pour permettre la croissance des racines dans la gélose et placées dans un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit.

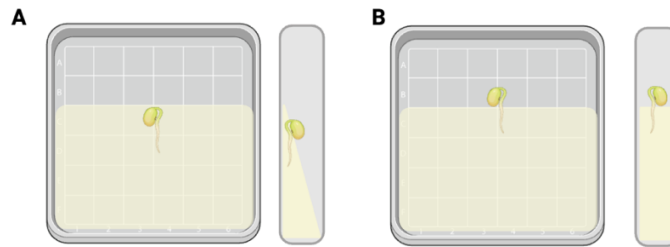


Figure 14 : Méthodes de culture des semences dans les géloses Fåhraeus agar

A. Culture de la semence sur une gélose en pente. B. Culture de la semence sur une gélose plane à la verticale.

Image créée avec Biorender.com

Un dernier test de culture a été réalisé avant l'ensemencement des semences par *R. leguminosarum lux*. L'objectif était de garantir que toute luminescence observée dans les racines après ensemencement avec *R. leguminosarum lux* provient bien de la bactérie et non de la plante elle-même. Pour cela, cinq semences ont été mis en culture dans une gélose Fåhraeus en pente dans une boîte de 23 cm² et placées dans un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit. La luminescence de *Vicia sativa* a été mesurée grâce à l'appareil Ivis Lumina III (Perkin-Elmer) à différents temps.

1.6.4. Ensemencement de *Vicia sativa* par *R. leguminosarum lux*

Ensemencement avec *R. leguminosarum lux* : Les semences de *Vicia sativa* ont été inoculé avec la souche de *R. leguminosarum lux*. Deux méthodes d'ensemencement ont été testés dans ce projet. Premièrement, les semences ont été inoculées par immersion pendant quelques secondes dans une suspension bactérienne de *R. leguminosarum lux* à une DO600 égale à 0.5 (1.10⁹ cellules/mL). Deuxièmement, les radicules des semences ont été mise en contact avec des colonies *R. leguminosarum lux* de sur milieu TY-agar. Les semences ont été par la suite placées sur les géloses Fåhraeus agar et cultivées à la verticale dans un environnement contrôlé, avec une température de 26°C, un taux d'humidité de 50% et un éclairage 16h/8h jour/nuit. La luminescence de la croissance bactérienne dans les racines de *Vicia sativa* a été mesurée grâce à l'appareil Ivis Lumina III (Perkin-Elmer) à différents temps de la croissance des plantes.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1.7. ROLE DE SsnA DANS LA VARIATION ANTIGENIQUE DE *pile* CHEZ *NEISSERIA MENINGITIDIS*

1.7.1. Dénombrement des colonies

Après infection et prise de sang, nous avons effectué des dilutions en série et culture sur milieu GCB solide. Les colonies issues du sang des différents groupes de souris ont été dénombrées et analysées (**figure 15**). Les groupes étaient infectées avec les souches de *N. meningitidis* sauvage (WT), Δ *ssnA*, et SsnA Compl (5 souris par groupe). Les résultats montrent que le groupe de souris infecté à *N. meningitidis* WT avait la quantité la plus élevée de bactérie en UFC/ μ L dans le sang. Au contraire, en observant le nombre de UFC/mL du groupe infecté par *N. meningitidis* Δ *ssnA*, on constate une diminution non significative du nombre de bactérie dans le sang des souris. Le phénotype WT est en partie restauré dans le groupe des souris avec *N. meningitidis* complétement sans toutefois atteindre les niveaux observés chez le groupe *N. meningitidis* WT.

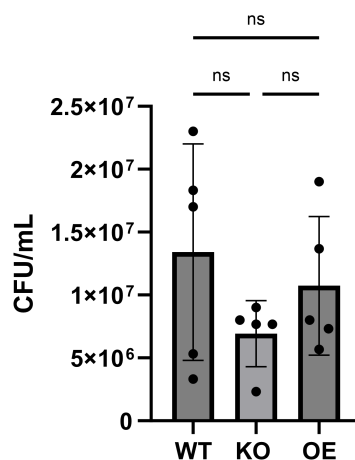


Figure 15 : Dénombrement de *N. meningitidis* dans le sang de souris après infection

WT : sauvage, KO : mutant Δ *ssnA*, OE : complétement SsnA.

Test statistique One-way ANOVA, ns : non-significatif

Les résultats non significatifs suivent la tendance observée dans les résultats de luminescence des bactéries des trois groupes lors d'infections *in vivo* dans les mêmes

conditions (Chenal, 2023). Le temps d'incubation de 12 heures a été spécifiquement choisi en raison du faible écart mesuré par luminescence (et reproduit ici en UFC/mL) entre les trois groupes. Cette absence de différence permet de récupérer suffisamment de clones dans chaque groupe pour l'analyse génétique de la séquence *pilE*. En cas de mortalité élevée dans le groupe Δ *ssnA*, les résultats auraient pu ne pas être représentatif des événements génétiques survenus *in vivo* dans ce groupe. Le prélèvement du sang à 12 heures permet donc de lever ce biais d'analyse.

Cependant, il est important de noter que les écarts-types sont très conséquents pour chacun des groupes, ce qui indique une grande variabilité dans les données. Cette variabilité peut être attribuée à la coagulation du sang au moment du prélèvement, une conséquence de l'absence d'EDTA dans les échantillons pour éviter d'affecter la croissance des bactéries. Ces résultats peuvent être améliorés en modifiant la méthodologie de prélèvement et de traitement du sang, notamment en utilisant un anticoagulant approprié, afin d'obtenir des données plus précises et fiables. Il a été démontré dans certains protocoles que l'utilisation de tubes héparinés n'influaient pas sur les analyses des résultats (Levy et al., 2018).

1.7.2. Séquençage de la région *pilE*

Afin de procéder à l'amplification et au séquençage de la région du gène *pilE* des trois groupes de *N. meningitidis* isolés du sang des souris, les ADN extraits ont migré sur un gel d'agarose 1% pour vérifier la présence d'ADN afin réaliser la PCR (**figure 16**). Les échantillons qui ne présentent pas de bande sur le gel ne seront pas séquencés et inclus dans l'analyse, comme l'échantillon OE1 des clones #2. Ainsi, en retirant les échantillons avec un mauvais rendement, neuf clones WT, neuf clones KO et neuf clones OE seront séquencés.

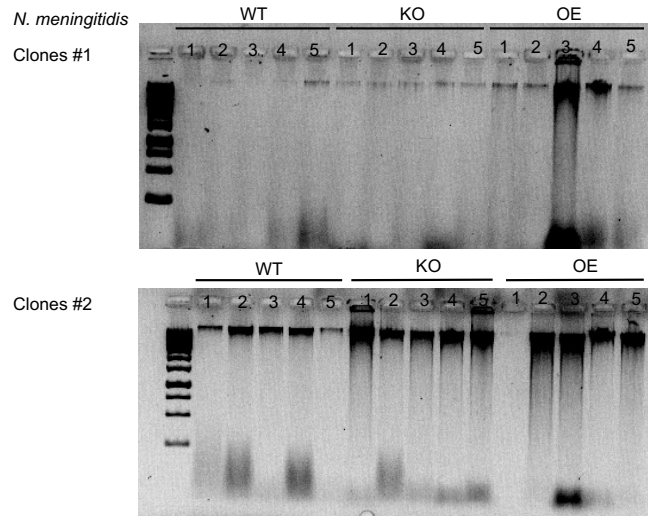


Figure 16 : Migration des ADN extraits sur gel agarose 1%
 WT : sauvage, KO : mutant Δ *ssnA*, OE : complétementé SsnA.

L'alignement des séquences après le séquençage a révélé des recombinaisons de quelques nucléotides à la fois dans tout le locus *pilE*. Ce phénotype est majeur dans les séquences de *N. meningitidis* WT avec six clones présentant une recombinaison sur les neuf séquencés. En revanche, aucune recombinaison n'a été observée dans le groupe des souris infectées par *N. meningitidis* Δ *ssnA*. Pour la souche complétementée, le même phénotype que pour la souche sauvage a été observé mais de manière plus faible (seulement quatre souches sur neuf souches séquencées) (**figure 17**). Cela suggère un rôle de la nucléase SsnA dans la recombinaison homologue *in vivo* du gène *pilE*. L'absence de la nucléase empêcherait donc la variation antigénique du gène *pilE*.

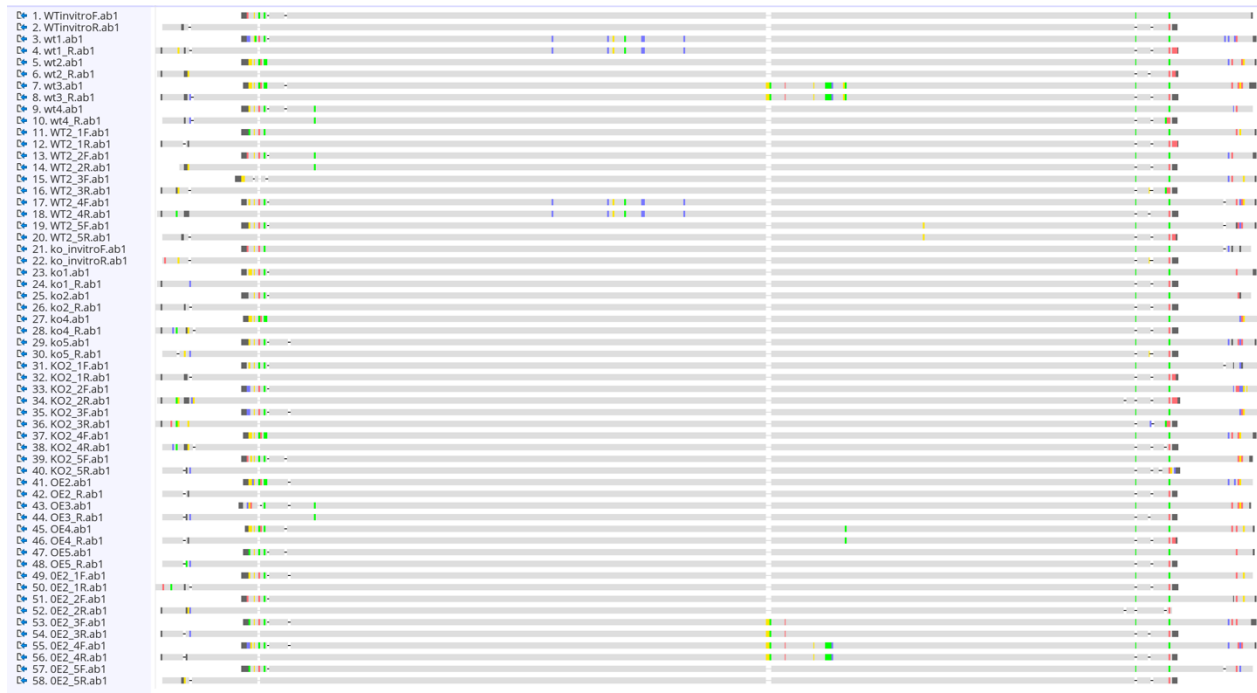


Figure 17 : Alignement des séquences *pilE* des séquences de clones de *Neisseria meningitidis*

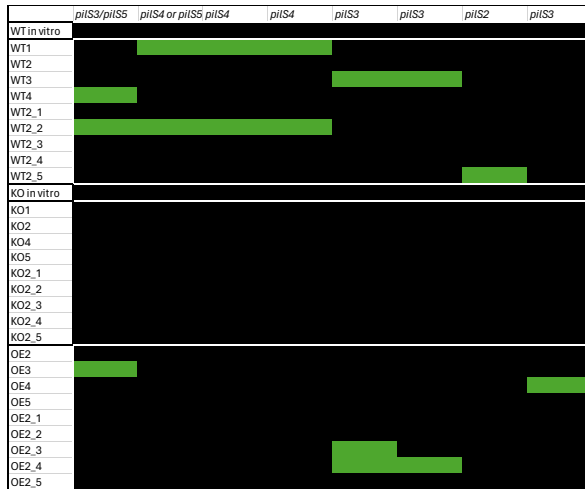
Les séquences du gène *pilE* des différents clones de *N. meningitidis* WT, $\Delta ssnA$ et Compl SsnA ont été alignées les unes par rapport aux autres afin de mettre en évidence les mutations ponctuelles dans les séquences. Ces mutations ponctuelles sont mises en évidence par coloration de leurs positions sur la séquence.

WT : sauvage, KO : mutant $\Delta ssnA$, OE : complémenté SsnA.

En alignant les régions mutées du locus *pilE* des séquences de *N. meningitidis* avec les différentes séquences de la cassette de gènes *pilS*, nous avons pu identifier les gènes de *pilS* impliqués dans la recombinaison au niveau du locus *pilE*. Il a été constaté que dans une même souche de *N. meningitidis*, plusieurs événements de recombinaison homologue peuvent se produire avec différents gènes de *pilS* (**figure 18A**). Par exemple, le gène *pilE* de la souche WT3 a connu des événements de recombinaisons avec les gènes *pilS3*, *pilS4* et *pilS5*. Cela indique que la recombinaison homologue chez *N. meningitidis* peut impliquer simultanément plusieurs gènes de *pilS*, augmentant ainsi la diversité antigénique. En calculant les fréquences de recombinaison des trois groupes, les souches WT sont apparues comme celles ayant la fréquence de recombinaison la plus importante tandis que les souches $\Delta ssnA$ présentaient une fréquence de recombinaison nulle (**figure 18B**). La perte de SsnA ($\Delta ssnA$) empêcherait totalement la recombinaison, indiquant que la nucléase est indispensable pour ce processus. La

complémentation partielle rétablit la recombinaison, mais pas au niveau des souches WT, suggérant l'implication d'autres facteurs biologiques.

A



B

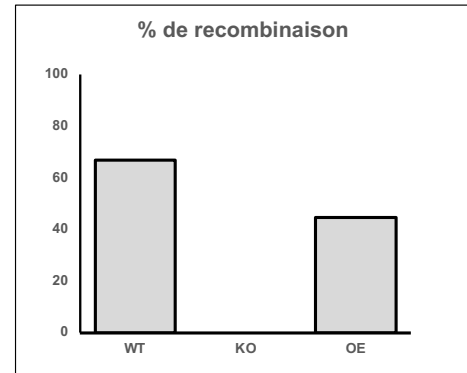


Figure 18 : Analyse de la recombinaison homologue des gènes *pilS* dans le locus *pilE*

A. Origines des différentes mutations dans le locus *pilE* des séquences des clones *N. meningitidis* WT, Δ *ssnA* et Complémenté. **B.** Fréquence de recombinaison dans le locus *pilE* des clones *N. meningitidis* WT, Δ *ssnA* et Complémenté.

WT : sauvage, KO : mutant Δ *ssnA*, OE : SsnA Compl.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence le rôle crucial de SsnA dans la recombinaison homologue chez *N. meningitidis* favorisant la diversité génétique et la survie bactérienne dans des conditions de stress, telles que celles rencontrées dans l'hôte infecté. En effet, la variation antigénique de *pilE* permet à la bactérie de coloniser plus efficacement les muqueuses de l'hôte tout en échappant aux mécanismes de défense médiés par l'hôte. Ces découvertes pourraient avoir des implications pour la compréhension des mécanismes de virulence et de résistance aux traitements chez *N. meningitidis*. Toutefois, ces résultats devront être reproduits pour permettre le séquençage de nouveaux clones et ainsi confirmer le phénotype observé.

1.8. MISE EN PLACE D'UN MODELE DE CULTURE *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM/VICIA SATIVA*

1.8.1. Création de la souche luminescente

À la suite de la conjugaison du plasmide pLMB757 luminescent dans la souche de *R. leguminosarum*, deux clones résistants à la tétracycline et non-auxotrophes ont été repiqués sur le milieu sélectif TY agar supplémenté en tétracycline pour les amplifier. La luminescence des tapis bactériens ayant poussé sur le milieu a été mesurée et a permis de constater que les clones issus de la conjugaison sont bien luminescents (**figure 19A**). Afin de vérifier que ces clones n'étaient pas des cellules donneuses *E. coli* β 2163 poussants en l'absence de DAP, la PCR sur colonie réalisée a permis de confirmer l'identité des clones. La bande observée de 4056 paires de base correspond à la région spécifique *ssnA* de *R. leguminosarum* absente chez *E. coli*, amplifiée par les amorces RhizoSsnAF et RhizoSsnAR (**figure 19B**).

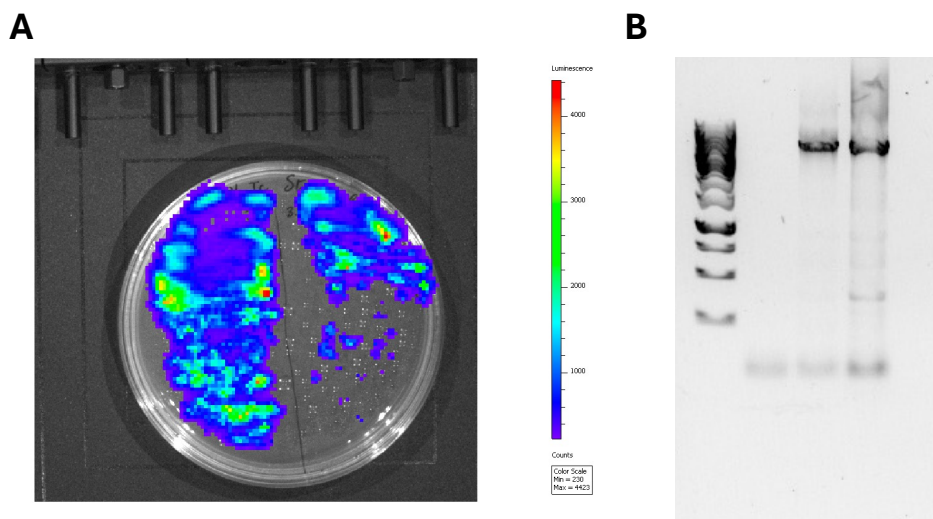


Figure 19 : Création de la souche *R. leguminosarum* luminescente

A. Mesure de la luminescence des deux clones après conjugaison. **B.** Amplification de la région *ssnA* de 4056 paires de base spécifique de *Rhizobium leguminosarum* des deux clones luminescents.

1.8.2. Création d'un mutant *R. leguminosarum* Δ *ssnA*

La création d'un mutant Δ *ssnA* dans *R. leguminosarum lux* a été réalisée par insertion d'une cassette de résistance à l'érythromycine dans le gène *SsnA*. Pour ce faire,

la région SsnA de *R. leguminosarum* a été amplifiée par PCR et mise à migrer sur un gel d'agarose 1%, permettant de visualiser la bande caractéristique à 4056 paires de base (**figure 20A**). Cette bande a ensuite été prélevée pour être intégrer dans le plasmide pJET1.2, suivi de l'inactivation du gène par insertion de la cassette de résistance au niveau du site EcoRI.

La région d'intérêt KOssnA::Ery a par la suite été intégrée dans le plasmide mobilisable pK18mobSacB transformé dans *E. coli Dh5 α* . Deux clones ont été vérifiés par digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose à 1% (**figure 20B**). Le clone #1 s'est révélé correct avec une insertion de la région d'intérêt dans le sens 2 (**figure 20C**).

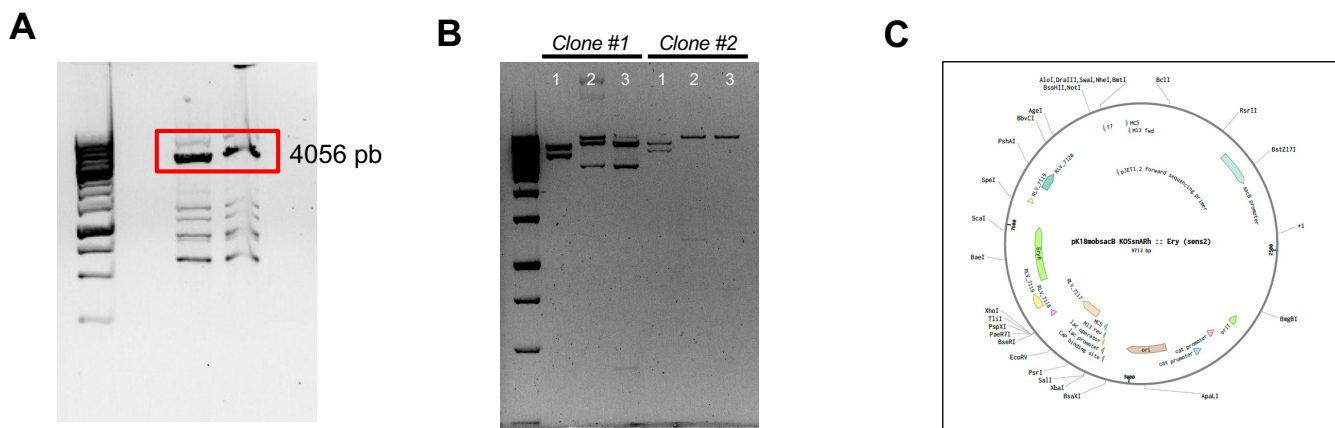


Figure 20 : Création du mutant *R. leguminosarum* Δ ssnA

A. Amplification de la région SsnA de *R. leguminosarum* avec la bande d'intérêt à 4056 paires de bases (pb).

B. Vérification des clones *E. coli Dh5 α* avec le plasmide pK18mobSacB contenant la région KOssnA::Ery. Digestion 1 : PstI avec deux bandes à 5719 et à 3994 pb attendues, digestion 2 : HindIII avec deux bandes à 6812 et à 2901 pb attendus, et digestion 3 : HindIII/XhoI avec trois bandes à 6424, à 2901 et à 388 pb attendues. Les bandes les plus hautes dans les puits 2 et 3 du clone #1 correspondent au plasmide qui n'a pas été digéré.

C. Séquence du plasmide pK18mobSacB avec le sens d'insertion de la région KOssnA::Ery dans le sens 2

Les tests de conjugaison dans *R. leguminosarum lux* ont été réalisées à plusieurs reprises. Différentes modifications au protocole ont été apportées, concernant les concentrations initiales des bactéries donneuses et receveuses. En effet, des tests avec une concentration initiale plus importante de *R. leguminosarum* avec une diminution de la concentration de *E. coli Dh5 α* ont été testés afin de favoriser la croissance des bactéries receveuses. D'autres souches de *E. coli* donneuses ont été utilisées comme *E. coli SM10* ou *E. coli λ 7213*. Malgré ces changements au protocole, les résultats des tests de

conjugaison ne sont pas encore concluants et sont toujours en cours au moment de la soumission de ce rapport.

1.8.3. Protocole de germination des semences de *Vicia sativa*:

Deux méthodes de germination des semences de *Vicia sativa* ont été mis en place afin d'évaluer le protocole optimal, la première par germination dans une solution H₂O-agar 1% et la seconde par germination entre deux feuilles de papiers absorbants humides. Les semences ont montré une plus grande germination lorsque celles-ci étaient cultivées dans la solution H₂O-agar 1% comparativement à celles cultivées entre les feuilles de papier absorbant. Cependant, bien que la première condition ait favorisé une croissance plus importante, la variabilité de la germination était plus faible avec le papier humide. En effet, les tailles des radicules après 3 jours de germination étaient beaucoup plus homogène que dans la première condition (**figure 21A**).

Toutefois, une fois les semences mises en culture, aucune différence notable dans la croissance entre les deux conditions de germination n'a été observé (**figure 21B**). Pour éviter un risque de variabilité de croissance lié à des tailles différentes de radicules, la seconde méthode de germination a été retenue et utilisée pour la suite des expériences.

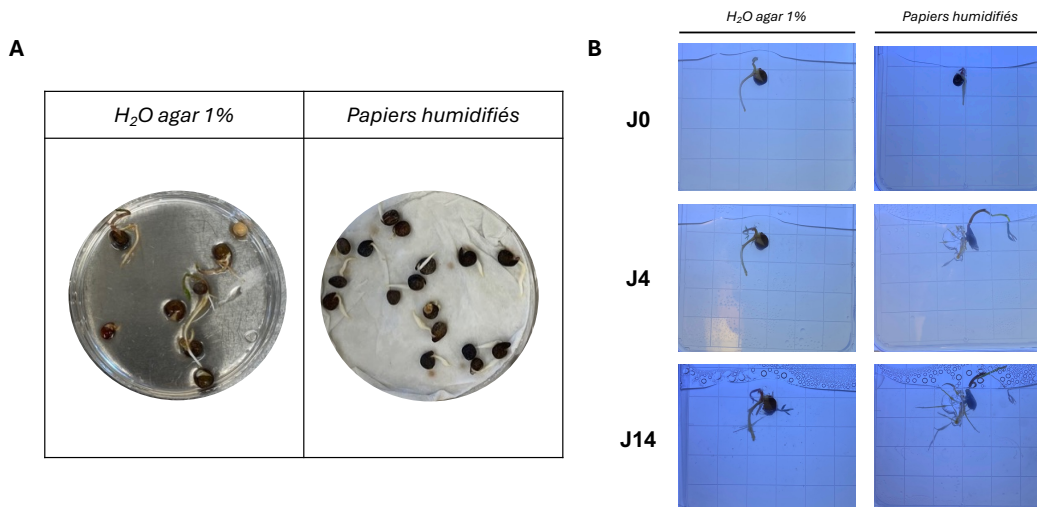


Figure 21 : Test de deux protocoles de germination des semences de *Vicia sativa*

A. Comparaison des semences après germination dans une solution H₂O-agar 1% et entre deux papiers absorbants humidifiés. **B.** Comparaison de la croissance des semences avec les deux méthodes de germination.

1.8.4. Protocole de culture de *Vicia sativa* :

Volume de culture : Lors de l'analyse des différentes conditions de culture pour faire pousser des semences en gélose, plusieurs volumes de milieu Fåhraeus agar ont été testés. Le volume de 25 mL s'est avéré insuffisant car il ne laissait pas assez de place pour le développement des racines. À l'inverse, le volume de 50 mL permettait le développement des racines, mais manquait d'espace pour la croissance des feuilles. En revanche, le volume de 40 mL s'est révélé idéal, offrant un équilibre entre la croissance des racines et des feuilles (**figure 22A**).

La taille des racines a été mesurée afin de déterminer si l'une des conditions de culture pouvait favoriser leur croissance. Les résultats obtenus montrent une variation de la croissance des racines en fonction du volume de gélose utilisé confirmant les observations précédentes (**figure 22B**). Les racines en culture dans un milieu de 25 ml n'ont doublé de taille qu'en 13 jours. Ce volume de gélose semble insuffisant pour permettre une croissance optimale des racines, probablement en raison de l'espace limité disponible pour leur développement. Les racines du milieu de 50 ml ont triplé de taille en 13 jours. Ce volume plus important permet une meilleure croissance des racines, mais il reste encore des contraintes dues à l'espace restreint pour le développement des feuilles. Le volume de 40 ml s'est révélé être le plus favorable pour la croissance des racines avec une standardisation de la croissance des racines au J13. La taille des racines a été multipliée par dix grâce à l'espace suffisant offert à la fois pour les racines dans la gélose et pour les feuilles au-dessus du milieu de culture.

Il a également été identifié que si les graines n'étaient pas suffisamment germées, comme la graine #1 dans la boîte de 50 ml, aucune croissance n'est observée. Cependant, lorsque les radicules des semences étaient trop grandes au moment de la mise en culture, comme la semence #3 de la boîte 40 ml, elles poussent et manquent plus rapidement d'espace.

Le nombre de semences par boîte a également posé le problème de la quantité excessive de racines par gélose. En effet, les racines des différentes semences se superposaient, rendant impossible la distinction individuelle de chaque plante et abimant le milieu de culture.

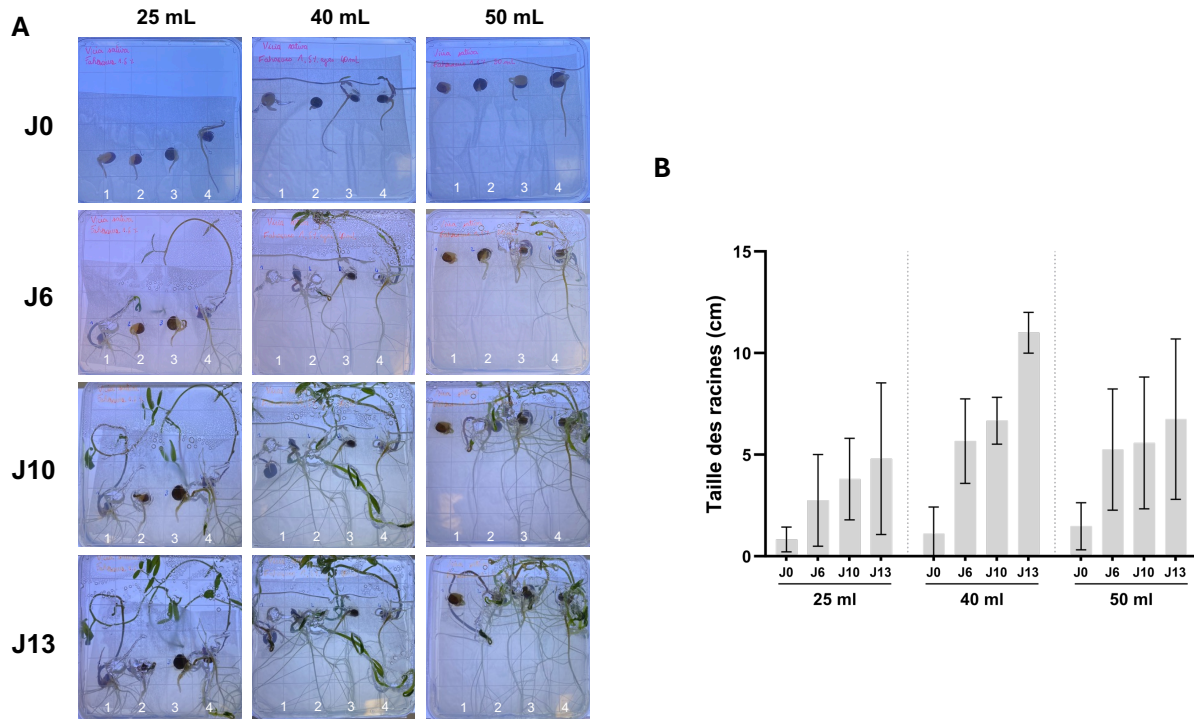


Figure 22 : Comparaison de trois volumes de milieu de culture

A. Culture de *Vicia sativa* dans les différents milieux au cours du temps. **B.** Mesure de la taille des racines dans les trois milieux au cours du temps.

J : jours.

Pour pallier ces problèmes, il a été décidé de ne mettre en culture qu'une seule semence avec un radicule entre 0,5 cm et 1 cm par boîte afin d'éviter la confusion des racines entre les différentes graines et de prévenir l'endommagement de la gélose. Le volume optimal de milieu pour la culture a été établi à 40 ml, offrant un espace adéquat pour la croissance des racines tout en permettant le développement suffisant de la tige et des feuilles.

Positionnement des semences : Dans les deux tests de cultures précédents (**figures 21B** et **22A**), un problème majeur observé était la tenue de la graine dans la gélose. Les semences ont montré une tendance à pousser de manière inadéquate, avec des feuilles se développant au même niveau que les racines dans la gélose, ce qui provoque une croissance désorganisée et une possible difficulté à s'ancrer correctement dans le milieu. Un nouveau test de culture a été mis en place afin de comparer deux positionnements

des graines dans le milieu : l'un avec les racines placées dans une gélose en pente et cultivées à plat, et l'autre avec les racines placées dans une gélose plate plus épaisse, cultivée à la verticale (**figure 23**). Dans le cas de la gélose en pente, il a été observé que les racines avaient tendance à croître à l'extérieur de la gélose (indiqué par des flèches rouges), ce qui suggère une difficulté à maintenir les racines correctement ancrées dans le milieu. En revanche, la gélose plate plus épaisse a permis une meilleure croissance des racines, avec une occupation uniforme et complète de la gélose. Ces résultats indiquent que la gélose plane, cultivée à la verticale, offre des conditions plus favorables pour un développement optimal des racines, permettant un meilleur ancrage et une croissance plus structurée.

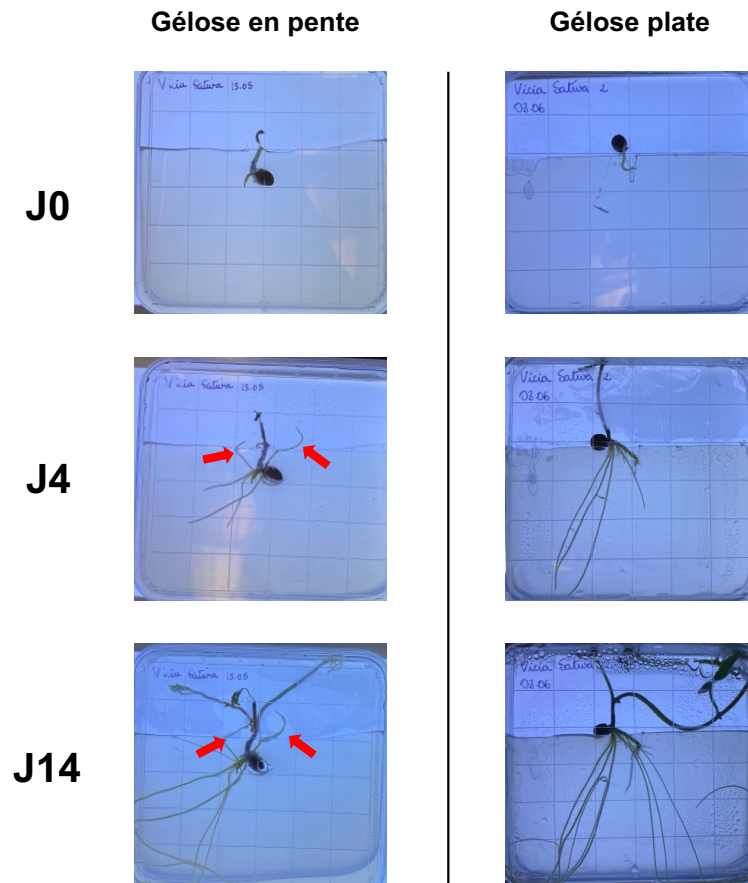


Figure 23 : Comparaison du positionnement de la semence dans le milieu
 Les flèches rouges indiquent les racines se développant à l'extérieur de la gélose.

J : jours.

Luminescence de *Vicia sativa*: Un dernier test de culture a été réalisé pour vérifier que *Vicia sativa* n'émet pas de luminescence intrinsèque. L'objectif était de s'assurer que toute luminescence observée dans les racines après ensemencement avec *R. leguminosarum lux* proviendrait effectivement de la bactérie et non de la plante elle-même. Lors des mesures au jour 4 et au jour 14, de la luminescence a été détectée dans les feuilles de *Vicia sativa*. Pour confirmer cette observation, une nouvelle mesure au jour 14 a été réalisé en coupant les feuilles des plantes. Les résultats ont montré qu'en l'absence de feuilles, aucune luminescence n'était mesurable dans les racines (**figure 24**). Ces résultats confirment que les racines de *Vicia sativa* n'émettent pas de luminescence intrinsèque et que la luminescence qui sera observée dans les plantes inoculées proviendra exclusivement de *R. leguminosarum lux*.

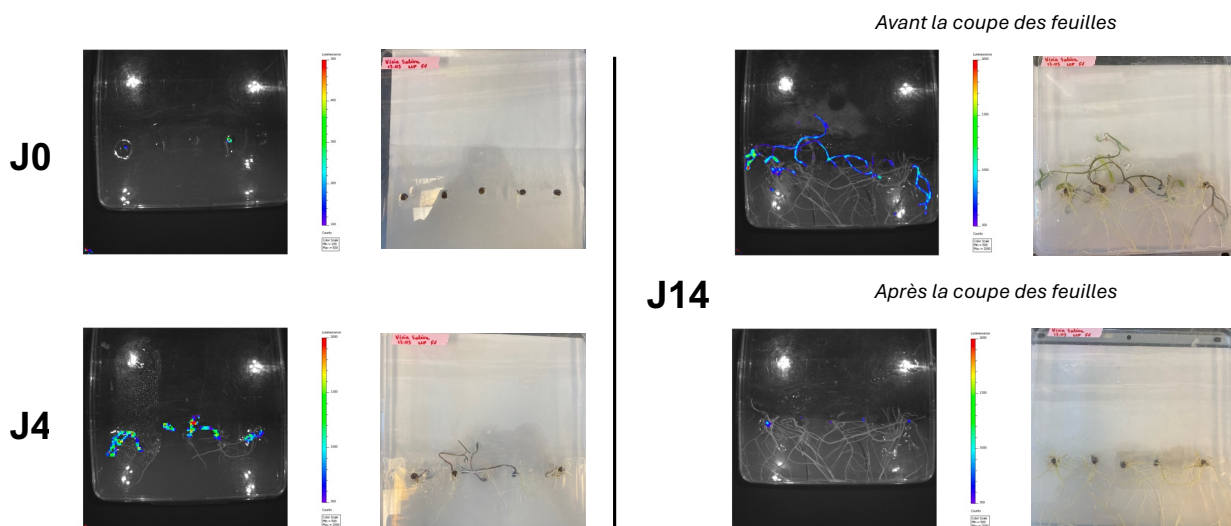


Figure 24 : Mesure de la luminescence de *Vicia sativa* au cours du temps
J : jours.

1.8.5. Ensemencement de *R. leguminosarum lux*

Un dernier test a été mis en place dans le but de comparer deux méthodes d'ensemencement de *Vicia sativa* par *R. leguminosarum lux* : l'ensemencement à partir d'une culture liquide et l'ensemencement à partir d'une colonie (**figure 25**). Tout d'abord, la plante sans ensemencement ne montre aucune luminescence durant toute la période

de mesure, confirmant que toute luminescence observée dans les échantillons inoculés est due à la présence de *R. leguminosarum lux*.

Le jour de l'ensemencement (J0), une luminescence beaucoup plus intense est observée immédiatement après l'ensemencement avec des colonies comparée à l'ensemencement avec la culture liquide, indiquant un meilleur ensemencement des bactéries dans la méthode des colonies.

À J4, une luminescence intense est observée sur toutes les racines pour les deux méthodes d'ensemencement indiquant une bonne colonisation de *R. leguminosarum lux* sur les racines de *Vicia sativa*, quelle que soit la méthode d'ensemencement. La luminescence uniforme sur toute la longueur des racines suggère que les bactéries se sont bien propagées et ont commencé à coloniser efficacement l'hôte.

Au jour 7, une diminution de la luminescence est notée, ce qui peut indiquer une réduction du nombre de bactéries actives ou une phase de transition dans leur interaction avec la plante. Pour les plantes inoculées avec des colonies, les racines entières restent luminescentes, ce qui suggère une colonisation continue et stable sur toute la racine. En revanche, pour les plantes inoculées avec la culture liquide, la luminescence est principalement observée à l'extrémité des racines. Cette localisation peut indiquer que les bactéries se concentrent dans les zones de croissance active des racines ou dans les nodules potentiels, bien que les nodules eux-mêmes soient difficiles à distinguer.

À J11, la luminescence est presque inexistante pour les plantes inoculées avec la culture liquide, à l'exception de l'extrémité d'une racine. Cela suggère une diminution significative de l'activité bactérienne ou de la population bactérienne viable dans ces échantillons. Pour les plantes inoculées avec des colonies, la luminescence persiste mais reste faible. Cela indique que, bien que la population bactérienne soit réduite, elle est encore présente et active à un certain niveau.

À partir du J15, plus aucune fluorescence n'était observée dans les plantes indiquant la fin de l'activité de la cassette *lux* de *R. leguminosarum*. En effet, elle permet de suivre la colonisation initiale en mesurant l'énergie dont disposent les bactéries. Toutefois l'épuisement des réserves d'énergie des bactéries sans doute dû au déclin d'énergie des plantes dans ces conditions de croissance peuvent expliquer la perte de signal. On pourrait toutefois s'attendre à un retour de la luminescence localisé

spécifiquement dans les nodules dans des stades de croissance plus tardifs. Dans le cas présent, l'expérimentation est limitée par l'épuisement des ressources nécessaires à la croissance de *V. sativa* mais l'optimisation du modèle d'étude pourrait permettre d'atteindre des stades de croissance plus avancées.

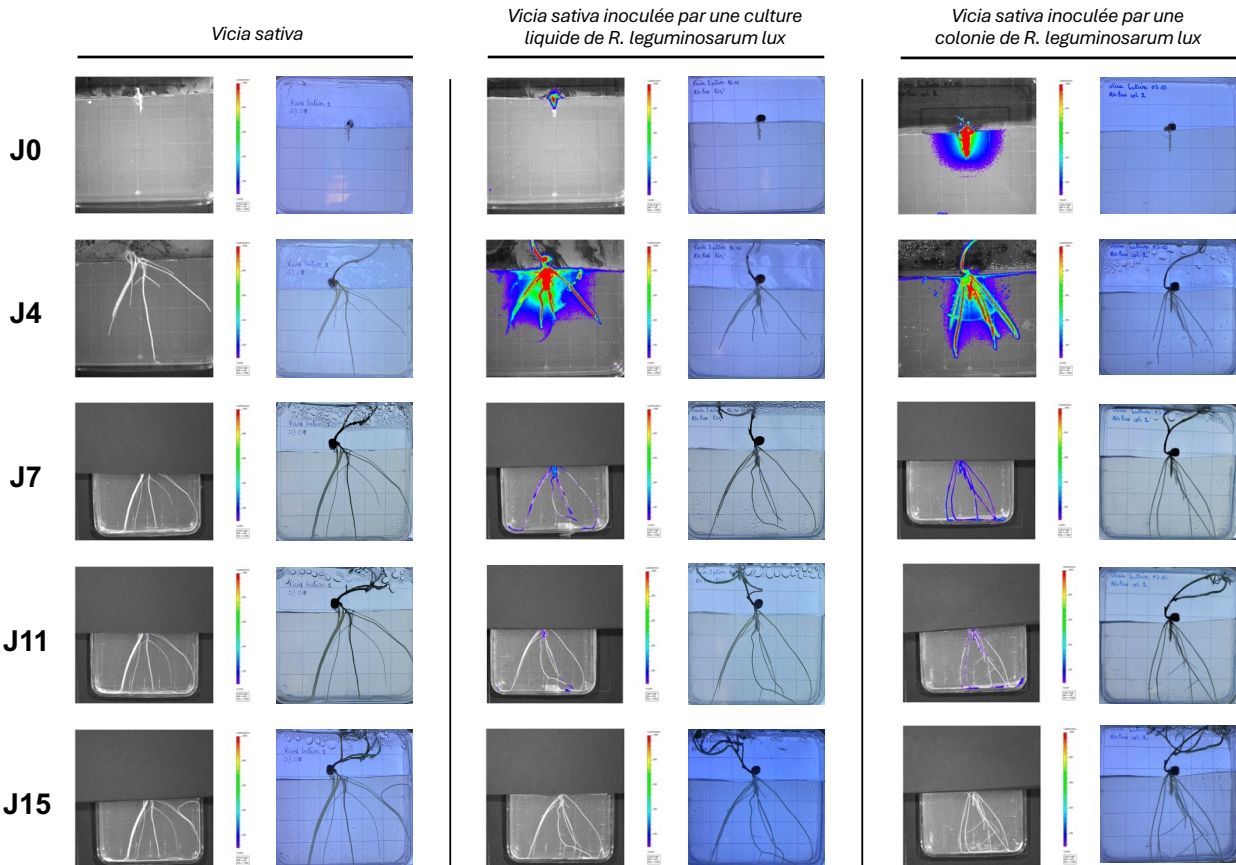


Figure 25 : Comparaison de deux méthodes d'ensemencement avec *R. leguminosarum lux*

Mesure de la luminescence de *Vicia sativa* inoculée par une culture liquide ou une colonie de *R. leguminosarum lux*.
J : jours.

Les observations aux jours 7 et 11 semblent indiquer que l'ensemencement par colonie de *R. leguminosarum lux* permet une colonisation initiale plus importante et une persistance plus longue de la luminescence bactérienne sur les racines de *Vicia sativa* comparé à l'ensemencement par culture liquide. Ces résultats suggèrent que l'ensemencement par colonie peut être plus efficace pour maintenir une population bactérienne stable et dispersée sur toute la racine sur une plus longue période.

Toutefois, après quantification de la luminescence des racines dans les deux conditions, il n'est pas possible de conclure à une différence significative de la

luminescence entre les deux méthodes d'ensemencement (**figure 26**). En effet, même si la luminescence pour l'ensemencement par une colonie est plus importante au jour 0 et qu'un pic de luminescence pour l'ensemencement liquide est observé au jour 4, il n'est pas possible de déterminer l'efficacité de l'une des deux méthodes dans le maintien de la colonisation de *R. leguminosarum* dans les racines de *Vicia Sativa*.

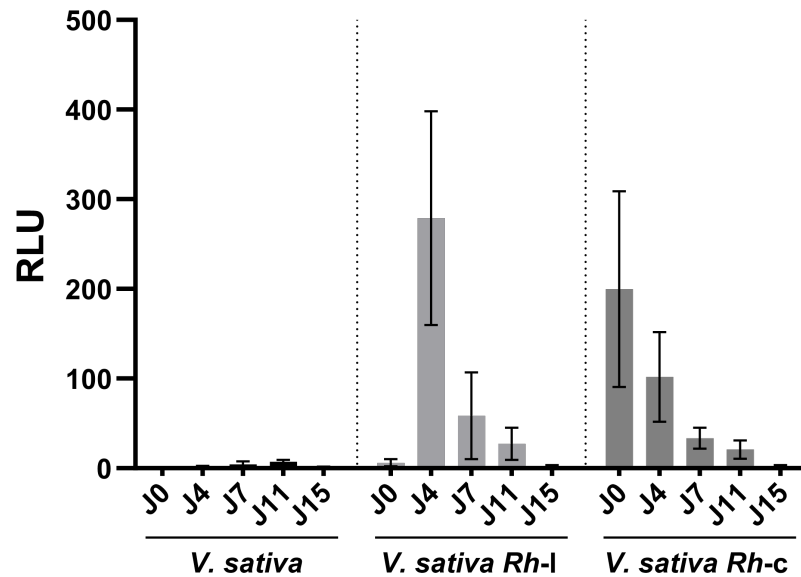


Figure 26 : Quantification de la luminescence après ensemencement de *Vicia sativa* par *R. leguminosarum lux*

V. sativa : *Vicia sativa*, *Rh-l* : ensemencement de *R. leguminosarum lux* par culture liquide, *Rh-c* : ensemencement de *R. leguminosarum lux* par colonie.

RLU : Relative Luminescent Unit.

J : Jours.

Toutefois, l'ensemencement à partir d'une culture liquide à une concentration identique pour tous les échantillons permet une standardisation et une meilleure fiabilité des mesures de luminescence. Cette méthode est malgré tout en cours d'optimisation notamment dans le but de maintenir la colonisation bactérienne dans le temps.

Le développement de ce protocole d'ensemencement et de culture de *R. leguminosarum* luminescent dans *V. sativa* permettra la mise en place d'une étude du rôle du gène homologue de *ssnA* dans un symbiote de la plante. Après l'obtention du mutant dans cette bactérie, une expérience de comparaison de la colonisation de *V. sativa*

par *R. leguminosarum* WT et mutant Δ *ssnA* pourra être mis en place. Une mesure de la luminescence des bactéries au cours du temps permettra d'évaluer si l'absence de SsnA influe sur la capacité de *R. leguminosarum* à coloniser et à se maintenir dans les nodules.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une nucléase simple brin retrouvé le génome de *Neisseria meningitidis* identifiée dans notre laboratoire a permis la découverte d'un mécanisme de régulation de la compétence naturelle en conditions *in vitro*. Agissant comme un effecteur de la pathogénicité, cette enzyme appelée SsnA pourrait jouer un rôle crucial dans l'évasion immunitaire ou le maintien de la charge bactérienne de *N. meningitidis* dans un contexte infectieux chez la souris. De plus, l'identification de nombreux gènes homologues de SsnA dans l'ensemble du domaine bactérien a amené des questionnements sur l'existence d'autres fonctions biologiques de SsnA.

L'objectif principal de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliquant SsnA dans un contexte infectieux chez *N. meningitidis* et d'étudier la fonction d'un de ses homologues chez *R. leguminosarum*, symbiote de *V. sativa*.

Après étude du rôle de la nucléase en conditions biologiques, SsnA favoriserait la recombinaison homologue non réciproque des gènes de piline silencieux *pilS* dans le génome de *N. meningitidis* permettant la variation antigénique de la protéine piline *pilE*. Favorisant également le maintien de l'infection et donc la survie de la bactérie, elle semble faciliter l'adaptation et la colonisation de l'hôte par échappement du système immunitaire.

La mise en place d'un modèle d'étude de *R. leguminosarum* dans *Vicia sativa*, en suivant la croissance des racines par émission de luminescence, a permis d'initier l'étude du rôle de SsnA chez cette bactérie. Il est intéressant de se demander si l'homologue de SsnA pourrait permettre à *R. leguminosarum* de s'adapter à la croissance dans les nodules. Cependant, il est nécessaire de continuer l'optimisation du protocole pour favoriser le maintien de la charge bactérienne dans le temps.

L'ensemencement du mutant SsnA de *R. leguminosarum* dans *V. sativa* pourrait révéler le rôle important de ce gène dans la colonisation de *R. leguminosarum* aux nodules de son hôte. On s'attend notamment à observer le même phénotype que celui identifié dans les infections de souris avec *N. meningitidis* Δ *ssnA*. En effet, on pourrait supposer que la souche *R. leguminosarum* Δ *ssnA* aurait plus de difficultés à coloniser les nodules et à maintenir sa croissance dans son symbiote.

L'évolution des espèces bactériennes repose sur de nombreux mécanismes génétiques évolutifs, incluant des mutations ponctuelles, des transferts horizontaux de gènes, ainsi que des adaptations à des niches écologiques spécifiques. Ces processus permettent aux bactéries de survivre et de s'adapter dans des environnements variés. Un exemple notable d'adaptation symbiotique est celui de *Buchnera aphidicola*, un endosymbionte obligatoire des pucerons. Cette bactérie a co-évolué avec son hôte au fil du temps, réduisant la taille de son génome pour se concentrer sur les fonctions essentielles à la symbiose (Gil et al., 2002). Cette réduction génomique est un phénomène courant chez les endosymbiontes obligatoires, car certaines fonctions sont perdues au profit d'une spécialisation accrue.

Dans ce contexte, l'une des fonctions biologiques de la protéine SsnA semble s'inscrire dans ce processus adaptatif. Elle joue probablement un rôle crucial dans l'adaptation de la bactérie à son hôte en facilitant la colonisation et la survie dans des niches écologiques favorables. Cela pourrait inclure des modifications dans l'expression antigénique des pili, l'interaction avec l'environnement de l'hôte, ou la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Une compréhension approfondie des mécanismes par lesquels SsnA contribue à l'adaptation de la bactérie à son hôte pourrait offrir des perspectives nouvelles sur l'évolution et l'interaction hôte/bactérie.

RÉFÉRENCES :

Aas, F. E., Wolfgang, M., Frye, S., Dunham, S., Løvold, C., & Koomey, M. (2002). Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Molecular Microbiology*, 46(3), 749–760. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03193.x>

Annan, H., Golding, A., Zhao, Y., & Dong, Z. (2012). Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecology and Evolution*, 2(9), 2285–2290. <https://doi.org/10.1002/ece3.325>

Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Prokaryotic homologs of the Eukaryotic DNA-End-Binding Protein KU, novel domains in the KU protein and prediction of a prokaryotic Double-Strand break repair system. *Genome Research*, 11(8), 1365–1374. <https://doi.org/10.1101/gr.181001>

Bailly, X., Giuntini, E., Sexton, M. C., Lower, R. P. J., Harrison, P. W., Kumar, N., & Young, J. P. W. (2011). Population genomics of *Sinorhizobium medicae* based on low-coverage sequencing of sympatric isolates. *the ISME Journal*, 5(11), 1722–1734. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.55>

Bayliss, C. D., Van De Ven, T., & Moxon, E. R. (2002). Mutations in poll but not *mutSLH* destabilize *Haemophilus influenzae* tetranucleotide repeats. *EMBO Journal*, 21(6), 1465–1476. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1465>

Bennett, J. S., Bentley, S. D., Vernikos, G. S., Quail, M. A., Cherevach, I., White, B. R., Parkhill, J., & Maiden, M. C. J. (2010). Independent evolution of the core and accessory gene sets in the genus *Neisseria*: insights gained from the genome of *Neisseria lactamica* isolate 020-06. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-652>

Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Harrison, O. B., & Maiden, M. C. J. (2014). The genus *Neisseria*. In Springer eBooks (pp. 881–900). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_241

Bennett, J. S., Watkins, E., Jolley, K. A., Harrison, O., & Maiden, M. C. J. (2014). Identifying *Neisseria* species by use of the 50S ribosomal protein L6 (RPLF) gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1375–1381. <https://doi.org/10.1128/jcm.03529-13>

Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *CB/Current Biology*, 26(21), R1126–R1130. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>

Bøvre, K., & Holten, E. (1970). *Neisseria elongata sp.nov.*, a Rod-shaped Member of the Genus *Neisseria*. Re-evaluation of Cell Shape as a Criterion in Classification. *Journal Of General Microbiology*, 60(1), 67-75. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-1-67>

Braun, J. M., Blackwell, C. C., Poxton, I. R., Ahmer, O. E., Gordon, A. E., Madani, O. M. A., Weir, D. M., Giersen, S., & Beuth, J. (2002). Proinflammatory responses to lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* Immunotype strains in relation to virulence and disease. *the Journal of Infectious Diseases* (Online. University of Chicago Press)/the *Journal of Infectious Diseases*, 185(10), 1431–1438. <https://doi.org/10.1086/340501>

Bujnicki, J. M., Rychlewski, L., & Radlińska, M. (2001). Polyphyletic evolution of type II restriction enzymes revisited: two independent sources of second-hand folds revealed. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 9–11. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01690-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01690-x)

Carlson, K., & Wiberg, J. S. (1983). In vivo cleavage of cytosine-containing bacteriophage T4 DNA to genetically distinct, discretely sized fragments. *Journal of Virology*, 48(1), 18–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.48.1.18-30.1983>

Cartwright, K., Reilly, S., White, D., & Stuart, J. M. (1992). Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *The BMJ*, 305(6846), 143–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6846.143>

Chenal, M. (2023). Caractérisation de la nucléase SsnA : Un régulateur des transferts horizontaux de gènes et déterminants de la virulence de *Neisseria meningitidis* [Thèse de doctorat]. INRS.

Chenal, M., Rivera-Millot, A., Harrisson, L., Khairalla, A., Nieves, C., Bernet, E., Esmaili, M., Belkhir, M., Perreault, J. & Veyrier, F. (2024). Discovery of the widespread Site-Specific Single-Stranded Nuclease Family SSN. *Research Square* (*Research Square*). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4622751/v1>

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Manipulation of nucleic acids. In Elsevier eBooks (pp. 125–161). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378594-7.00005-6>

Coulon, S., Gaillard, P., Chahwan, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., & Russell, P. (2004). SLX1-SLX4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains

ribosomal DNA in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1), 71–80.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0586>

Dai, K., Wen, X., Chang, Y., Cao, S., Zhao, Q., Huang, X., Wu, R., Huang, Y., Yan, Q., Han, X., Ma, X., & Wen, Y. (2018). A streptomycin resistance marker in *H. parasuis* based on site-directed mutations in *rpsL* gene to perform unmarked in-frame mutations and to verify natural transformation. *PeerJ*, 6, e4253. <https://doi.org/10.7717/peerj.4253>

Delgado, M. J., Bedmar, E. J., & Downie, J. (1998). Genes Involved in the Formation and Assembly of Rhizobial Cytochromes and their Role in Symbiotic Nitrogen Fixation. In *Advances in microbial physiology/Advances in Microbial Physiology* (pp. 191–231). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60132-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60132-0)

Demarre, G., Guérout, A., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D. A., Marlière, P., & Mazel, D. (2005). A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncP α) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Research in Microbiology*, 156(2), 245–255.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.007>

Desai, N. A., & Shankar, V. (2003). Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(5), 457–491. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2003.tb00626.x>

Dong, Z., Layzell, D. (2001). H₂ oxidation, O₂ uptake and CO₂ fixation in hydrogen treated soils. *Plant and Soil* 229, 1–12. <https://doi.org/10.1023/A:1004810017490>

Dunin-Horkawicz, S., Feder, M., & Bujnicki, J. M. (2006). Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily. *BMC Genomics*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-98>

Edwards, J. L., Jennings, M. P., Apicella, M. A., & Seib, K. L. (2016). Is gonococcal disease preventable? The importance of understanding immunity and pathogenesis in vaccine development. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(6), 928–941. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2015.1105782>

Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P., & Brouns, S. J. J. (2021). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>

Elkins, C. A., Thomas, C., Seifert, H. S., & Sparling, P. F. (1991). Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3911–3913. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3911-3913.1991>

Elliott, D. R., Wilson, M., Buckley, C. M., & Spratt, D. A. (2005). Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5470–5476. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.11.5470-5476.2005>

Evans, C., Pratt, C., Matheson, M., Vaughan, T. E., Findlow, J., Borrow, R., Gorrington, A., & Read, R. C. (2011). Nasopharyngeal Colonization by *Neisseria lactamica* and Induction of Protective Immunity against *Neisseria meningitidis*. *Clinical Infectious Diseases*, 52(1), 70–77. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq065>

Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases* (Online University of Chicago Press), 10(Supplement2), S274–S276. https://doi.org/10.1093/cid/10.supplement_2.s274

DI Felice, F., Micheli, G., & Camilloni, G. (2019). Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of biosciences*, 44(2), 38. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9856-8>

Finkel, S. E., & Kolter, R. (2001). DNA as a nutrient: Novel role for Bacterial competence Gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6288–6293. <https://doi.org/10.1128/jb.183.21.6288-6293.2001>

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>

Frank AB. (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 7 : 332-346.

Frasch, C. E., Zollinger, W. D., & Poolman, J. (1985). Serotype Antigens of *Neisseria meningitidis* and a Proposed Scheme for Designation of Serotypes. *Clinical Infectious Diseases*, 7(4), 504–510. <https://doi.org/10.1093/clinids/7.4.504>

Frye, S. A., Nilsen, M., Tønjum, T., & Ambur, O. H. (2013). Dialects of the DNA uptake sequence in Neisseriaceae. *PLOS Genetics*, 9(4), e1003458. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003458>

Gil, R., Sabater-Muñoz, B., Latorre, A., Silva, F. J., & Moya, A. (2002). Extreme genome reduction in *Buchnera spp.*: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4454–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.062067299>

Gold, R., Goldschneider, I., Lepow, M. L., Draper, T. F., & Randolph, M. F. (1978). Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in Infants and Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 112–121. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.112>

Hamilton, H. L., & Dillard, J. P. (2005). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Molecular Microbiology*, 59(2), 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04964.x>

Han, X. Y., Hong, T., & Falsen, E. (2006). *Neisseria bacilliformis sp. nov.* Isolated from Human Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 474–479. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.2.474-479.2006>

Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (pp. 63–113). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a)

Hauck, C. (2003). “Small” talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*–host-cell communication. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00004-3)

Hill, S. A., & Davies, J. K. (2009). Pilin gene variation in *Neisseria gonorrhoeae*: reassessing the old paradigms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 521–530. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00171.x>

Huang, L., Zhang, Y., Du, X., An, R., & Liang, X. (2022). *Escherichia coli* Can Eat DNA as an Excellent Nitrogen Source to Grow Quickly. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.894849>

Huang, Y., Downie, J. A., & Ito, J. (1999). News & Notes: Primary Structure of the DNA Polymerase I Gene of an α -Proteobacterium, *Rhizobium leguminosarum*, and Comparison with Other Family A DNA Polymerases. *Current Microbiology*, 38(6), 355–359. <https://doi.org/10.1007/pl00006816>

Julin, D. A. (2017). *Recombination: mechanisms, pathways, and applications*. In Springer eBooks (pp. 1–28). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_366-1

Krüger, N., & Stingl, K. (2011). Two steps away from novelty – principles of bacterial DNA uptake. *Molecular Microbiology*, 80(4), 860–867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07647.x>

Kowalski, J. C., Belfort, M., Stapleton, M., Holpert, M., Dansereau, J. T., Petrokovski, S., Baxter, S. M., & Derbyshire, V. (1999). Configuration of the catalytic GYI-YIG domain of intron endonuclease I-TevI: coincidence of computational and molecular findings. *Nucleic Acids Research*, 27(10), 2115–2125. <https://doi.org/10.1093/nar/27.10.2115>

Lehman, I., & Nussbaum, A. (1964). The Deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 239(8), 2628–2636. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93898-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93898-6)

Levy, M., Deghmane, A., Aouiti-Trabelsi, M., Dager, S., Faye, A., Mariani-Kurkdjian, P., & Taha, M. (2018). Analysis of the impact of corticosteroids adjuvant treatment during experimental invasive meningococcal infection in mice. *Steroids*, 136, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.05.007>

Leyva, A., Palacios, J. L. C., Mozo, T., & Ruiz-Argüeso, T. (1987). Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 4929–4934. <https://doi.org/10.1128/jb.169.11.4929-4934.1987>

Lin, J., & Sancar, A. (1992). Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5' incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 17688–17692. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)37097-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)37097-8)

Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in *rhizobia*. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

Marri, P. R., Paniscus, M., Weyand, N. J., Rendón, M. A., Calton, C. M., Hernández, D. R., Higashi, D. L., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Rounsley, S. D., & So, M. (2010). Genome Sequencing Reveals Widespread Virulence Gene Exchange among Human *Neisseria* Species. *PLOS ONE*, 5(7), e11835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011835>

Michod, R. E., Bernstein, H., & Nedelcu, A. M. (2008). Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(3), 267–285. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.01.002>

Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., & Stępkowski, T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3), 720–732. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00255-0)

Mrsny, R. J. (2009). Lessons from nature: “Pathogen-Mimetic” systems for mucosal Nano-medicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), 172–192. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.009>

Mullen, J. R., Kaliraman, V., Ibrahim, S. S., & Brill, S. J. (2001). Requirement for Three Novel Protein Complexes in the Absence of the Sgs1 DNA Helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157(1), 103–118. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.1.103>

Murphy, J. C., Devane, M., Robson, B., & Gilpin, B. (2005). Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 301–309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02590.x>

Neisser A (1879) Über eine des Gonorrhoe eigenthumliche Micrococcusform. *Centralblatt für medizinische Wissenschaft* 17:497-500.

Nishino, T., & Morikawa, K. (2002). Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. *Oncogene*, 21(58), 9022–9032. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206135>

Noel, K. (2009). Rhizobia. Dans Elsevier eBooks (p. 261-277). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00043-2>

Noffke, N., Christian, D., Wacey, D., & Hazen, R. M. (2013). Microbially induced sedimentary structures recording an ancient ecosystem in the ca. 3.48 Billion-Year-Old Dresser Formation, Pilbara, Western Australia. *Astrobiology*, 13(12), 1103–1124. <https://doi.org/10.1089/ast.2013.1030>

Nyongesa, S., Weber, P. M., Bernet, È., Pulido, F., Nieves, C., Nieckarz, M., Delaby, M., Viehboeck, T., Krause, N., Rivera-Millot, A., Nakamura, A., Vischer, N. O. E., vanNieuwenhze, M., Brun, Y. V., Cava, F., Bulgheresi, S., & Veyrier, F. J. (2022).

Evolution of longitudinal division in multicellular bacteria of the Neisseriaceae family. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32260-w>

Pilmis, B., Lefort, A., Lecuit, M., Join-Lambert, O., Nassif, X., Lortholary, O., & Charlier, C. (2014). Endocarditis due to *Neisseria mucosa*: Case report and review of 21 cases. *Journal of Infection*, 68(6), 601–604. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.02.007>

Pini, F., East, A. K., Appia-Ayme, C., Tomek, J., Karunakaran, R., Mendoza-Suárez, M., Edwards, A., Terpolilli, J. J., Roworth, J., Downie, J. A., & Poole, P. S. (2017). Bacterial biosensors for in vivo spatiotemporal mapping of root secretion. *Plant Physiology*, 174(3), 1289–1306. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01302>

Poolman, J., Kriz-Kuzemenska, P., Ashton, F. E., Bibb, W. F., Dankert, J., Demina, A. A., Frøholm, L. O., Hassan-King, M., Jones, D. M., & Lind, I. (1995). Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2(1), 69–72. <https://doi.org/10.1128/cdli.2.1.69-72.1995>

Priniski LL & Seifert HS (2018) A Case for the Evolution from Commensalism to Pathogenicity and Possibly Back Again: Lessons Learned from the Human-Adapted *Neisseria* Species. *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*, Rampelotto PH (Édit.) Springer International Publishing, Cham [10.1007/978-3-319-69078-0_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0_13). p 327-370.

Proft, T., & Baker, E. (2008). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 613–635. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4>

Rouphael, N. G., & Stephens, D. S. (2011). *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. In *Methods in molecular biology* (pp. 1–20). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-346-2_1

Sather, L. M., Zamani, M., Muhammed, Z., Kearsley, J. V., Fisher, G. T., Jones, K. M., & Finan, T. M. (2023). A broadly distributed predicted helicase/nuclease confers phage resistance via abortive infection. *Cell Host & Microbe*, 31(3), 343-355.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.01.010>

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of

Corynebacterium glutamicum. *Gene*, 145(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)

Shida, T., Noda, M., & Sekiguchi, J. (1995). The recognition of DNA containing an AP site by *E. coli* endonuclease VI (exonuclease III). *Nucleic acids symposium series*, (34), 87–88.

Stoddard, B. (2011). Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*, 19(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.003>

Swartley, J. S., Marfin, A. A., Edupuganti, S., Liu, L., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J. D., & Stephens, D. S. (1997). Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 271–276. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.271>

Tan, L., Carlone, G. M., & Borrow, R. (2010). Advances in the Development of Vaccines against *Neisseria meningitidis*. *The New England Journal of Medicine*, 362(16), 1511–1520. <https://doi.org/10.1056/nejmra0906357>

Uria, M. J., Zhang, Q., Li, Y., Chan, A., Exley, R. M., Gollan, B., Chan, H., Feavers, I., Yarwood, A., Abad, R., Borrow, R., Fleck, R. A., Mulloy, B., Vazquez, J. A., & Tang, C. M. (2008). A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), 1423–1434. <https://doi.org/10.1084/jem.20072577>

Vedros, N. A., Hoke, C., & Chun, P. K. (1983). *Neisseria macacae* sp. nov., a new *Neisseria* Species Isolated from the Oropharynges of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), 515–520. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-515>

Vedros, N. A. (Ed.). (1987). *Evolution of Meningococcal Disease*, Vol. I. CRC Press.

Verhoeven, E. E., Van Kesteren, M., Moolenaar, G. F., Visse, R., & Goosen, N. (2000). Catalytic Sites for 3' and 5' Incision of *Escherichia coli* Nucleotide Excision Repair Are Both Located in UvrC. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5120–5123. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5120>

Veyrier, F. J., Biais, N., Morales, P., Belkacem, N., Guilhen, C., Ranjeva, S., Sismeiro, O., Péhau-Arnaudet, G., Rocha, E. P., Werts, C., Taha, M., & Boneca, I. G. (2015). Common cell shape evolution of two nasopharyngeal pathogens. *PLOS Genetics*, 11(7), e1005338. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005338>

Waterhouse, R. (1911). A CASE OF SUPRARENAL APOPLEXY. *The Lancet*, 177(4566), 577–578. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)60988-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)60988-7)

Wiegand, R., Godson, G., & Radding, C. (1975). Specificity of the S1 nuclease from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 250(22), 8848–8855. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40751-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40751-5)

Yang W. (2011). Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly reviews of biophysics*, 44(1), 1–93. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000181>

Yee, W., Elsener, T., Cehovin, A., Maiden, M. C. J., & Tang, C. M. (2023). Evolution and exchange of plasmids in pathogenic *Neisseria*. *MSphere*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00441-23>

Zaura, E., Keijser, B. J. F., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9(1), 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>