

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**CARACTÉRISATION D'UNE PROTEINE HYPOTHÉTIQUE CHEZ
NEISSERIA MENINGITIDIS ; UN RÉGULATEUR IMPORTANT DE LA
COMPÉTENCE NATURELLE.**

Par
Martin Chenal

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences, (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé de l'INRS
en Ingénierie de la santé, diagnostic biomédical de l'Université Clermont-Auvergne

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Nicolas Doucet
INRS Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Steve Charrette
Institut de biologie Intégrative et des
systèmes (IBIS)
Université Laval

Directeur de recherche

Frédéric Veyrier
INRS Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier d'abord et avant tout le Pr Frédéric Veyrier, mon directeur de recherche, pour son accueil chaleureux dans son équipe, ses conseils avisés, mais surtout pour sa grande disponibilité auprès de ses étudiants. Merci pour cette belle opportunité qui aura certainement un fort impact sur ma carrière scientifique.

Ma gratitude s'étend également au Dr Mahchid Bamdad, qui m'a permis de passer une année riche en savoir dans ma France natale.

Mille mercis au Dr Ahmed Khairalla pour son support et son implication dans le projet, sans qui ce dernier n'aurait pas autant avancé en si peu de temps. Sa forte expérience de recherche m'a sauvé un temps précieux bon nombre de fois. Tes efforts seront récompensés mon ami.

Merci à mes collègues et amis, le Dr Antony Vincent, Sammy Nyongesa, Cecilia Nieves, Ève Bernet, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire pour leurs conseils et leur support moral tout au long de ce projet. La bonne ambiance qu'ils apportent à notre équipe favorise grandement le partage des connaissances, et rend le travail beaucoup plus agréable jour après jour.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce projet, notamment Katia Smail pour son aide avec le radiomarquage, Philippe Gauvin-Vallée pour son aide avec la purification de protéine et Arnaldo Nakamura pour son support en microscopie électronique.

Bien sûr, un énorme merci à ma famille, mon amoureuse et mes amis, sans qui ma motivation pour la recherche scientifique ne serait pas ce qu'elle est.

Merci enfin aux examinateurs qui porteront un regard critique sur ce manuscrit, pour cette occasion de faire de moi un meilleur chercheur.

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage 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. En raison de la structure particulière de ce programme, **le projet de recherche détaillé ici-bas a été réalisé en un an plutôt que deux**. Ce rapport est donc conséquemment plus court qu'un mémoire normal, et s'apparente à un travail de passage accéléré au doctorat.

En raison du temps limité pour mener à bien un projet de cette envergure, plusieurs membres du laboratoire ont activement participé à ce dernier, tout particulièrement avant mon arrivée dans l'équipe. L'analyse bioinformatique de la séquence répétée détaillée dans ce rapport a été initialement réalisée par le Pr Veyrier. L'étudiant Philippe Gauvin-Vallée a par la suite purifié la protéine GspA, et le Dr Ahmed Khairalla a réalisé certains tests d'endonucléase avec l'aide de l'étudiante Katia Smail. Cependant, toutes les expériences, à l'exception de celle impliquant l'utilisation de radioactivité, ont été validées et reproduites par l'auteur, de même que l'analyse bioinformatique.

RÉSUMÉ

Le genre bactérien *Neisseria* exhibe plusieurs caractéristiques qui témoignent d'une évolution unique. Entre autres, plusieurs morphologies cellulaires y sont retrouvées, chose rare chez les procaryotes. De plus, ces bactéries sont naturellement compétentes : elles peuvent capter de l'ADN de leur environnement et l'intégrer à leur propre génome. Les *Neisseria* comprennent deux espèces pathogènes chez l'Homme, *N. gonorrhoeae* qui cause la gonorrhée, et *N. meningitidis*, responsable de septicémies et de la méningite bactérienne. Habituellement commensale du nasopharynx, la transition de *N. meningitidis* d'un stade asymptomatique à un stade virulent n'est pas bien comprise. Nous avons mis en évidence dans le génome de cette espèce une courte séquence répétée plusieurs centaines de fois. Celle-ci s'amasse de façon intrigante autour de plusieurs gènes importants, lui suggérant un rôle régulateur. Nos analyses indiquent qu'elle est fortement associée à un gène codant pour une protéine hypothétique que nous avons appelée GspA. Nous démontrons ici que cette protéine est une nickase, soit une endonucléase clivant un seul brin d'ADN, qui régule négativement la compétence naturelle de *N. meningitidis*. Cette protéine, en plus de présenter un fort potentiel biotechnologique, pourrait donc être cruciale à l'évolution de ce pathogène via la régulation des transferts horizontaux de gènes.

Mots-clés : Microbiologie ; Bactériologie ; Évolution ; Génétique ; *Neisseria* ; Méningite

ABSTRACT

The bacterial genus *Neisseria* exhibits several characteristics that indicate a unique evolution. Among other things, it harbours different cell shapes, a scarce trait in prokaryotes. Also, these bacteria are naturally competent; they can acquire DNA from their environment and integrate it into their genome. Two *Neisseria* species are human pathogens; *N. gonorrhoeae* which is responsible for gonorrhoea, and *N. meningitidis* which causes sepsis and bacterial meningitis. Usually asymptomatic in the nasopharynx, the transition of *N. meningitidis* from a commensal state to a virulent state is not fully understood. We have identified in the genome of this species a small sequence that is repeated several hundred times. Its intriguing distribution in clusters around several important genes suggests it has an important regulatory or evolutionary function. Our analyses show that this sequence is strongly associated with a gene encoding a hypothetical protein that we called GspA. We demonstrate here that GspA is a nicking endonuclease that cuts a single strand of double-stranded DNA, and also negatively regulates the natural competence of *N. meningitidis*. In addition to its strong biotechnology potential, this protein might be crucial to the evolution of this pathogen by regulating horizontal gene transfers.

Keywords : Microbiology ; Bacteriology ; Evolution ; Genetics ; *Neisseria* ; Meningitis

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS | III |
| AVANT-PROPOS | V |
| RÉSUMÉ | VII |
| ABSTRACT | IX |
| TABLE DES MATIÈRES | XI |
| LISTE DES FIGURES..... | XIII |
| LISTE DES TABLEAUX | XV |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | XVII |
| MISE EN CONTEXTE..... | XIX |
| 1 INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Évolution bactérienne | 1 |
| 1.2 Compétence naturelle | 3 |
| 1.2.1 Avantages de la compétence naturelle | 4 |
| 1.2.2 Mécanisme de transformation chez des espèces naturellement compétentes | 5 |
| 1.2.3 Régulation de la compétence naturelle | 7 |
| 1.3 Éléments répétés..... | 8 |
| 1.3.1 Éléments répétés et instabilité génomique | 10 |
| 1.4 <i>Neisseria sp.</i> | 10 |
| 1.5 <i>Neisseria meningitidis</i> | 12 |
| 1.5.1 Pathogénèse de <i>N. meningitidis</i> | 12 |
| 1.5.2 Évolution et adaptation des <i>Neisseria</i> pathogènes..... | 13 |
| 1.5.3 Compétence naturelle chez les <i>Neisseria</i> | 16 |
| 1.6 Identification d'un nouvel élément répété chez les <i>Neisseria</i> ; RS | 18 |
| 1.7 Identification d'une protéine hypothétique associée à la RS ; GspA | 20 |
| 1.7.1 Domaine GIY-YIG chez les autres bactéries..... | 21 |
| 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS | 23 |
| 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES | 25 |
| 3.1 Souches bactériennes et milieux de culture | 25 |
| 3.1.1 <i>Neisseria meningitidis</i> | 25 |
| 3.1.2 <i>Escherichia coli</i> | 25 |
| 3.2 Manipulations d'ADN | 26 |
| 3.3 Génération de mutants de <i>gspA</i> dans <i>N. meningitidis</i> | 26 |
| 3.3.1 Délétion de <i>gspA</i> | 27 |
| 3.3.2 Surexpression et complémentation de <i>gspA</i> | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.4 | Expression et purification de la protéine GspA | 28 |
| 3.4.1 | Induction et lyse | 28 |
| 3.4.2 | Chromatographie d'affinité | 29 |
| 3.4.3 | Clivage du tag GST et purification de la protéine non taguée..... | 29 |
| 3.5 | Études <i>in vivo</i>, tests phénotypiques | 29 |
| 3.5.1 | Courbes de croissance | 29 |
| 3.5.2 | Sensibilité au pH, au stress oxydatif, à la mutagenèse et aux métaux | 30 |
| 3.5.3 | Morphologie et piliation : Microscopie électronique à transmission (TEM)..... | 31 |
| 3.6 | Études <i>in vitro</i> | 31 |
| 3.6.1 | RT-qPCR | 31 |
| 3.6.2 | Tests d'activité endonucléase | 32 |
| 3.7 | Tests de transformation | 33 |
| 4 | RÉSULTATS | 35 |
| 4.1 | Activité endonucléase de GspA <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.1.1 | Digestion de plasmides entiers | 35 |
| 4.1.2 | Digestion de produits de PCR..... | 37 |
| 4.2 | Études phénotypiques de GspA <i>in vivo</i> | 40 |
| 4.2.1 | Tests de croissance | 41 |
| 4.2.2 | Sensibilité au pH, au stress oxydatif, à la mutagenèse et aux métaux | 42 |
| 4.2.3 | Morphologie et piliation des mutants de <i>gspA</i> | 43 |
| 4.3 | Études transcriptomiques | 45 |
| 4.4 | Implication de GspA dans la compétence naturelle de <i>N. meningitidis</i> | 46 |
| 4.4.1 | Transformation d'un plasmide ne contenant pas la séquence répétée | 46 |
| 4.4.2 | Transformation d'un plasmide contenant la séquence répétée | 47 |
| 5 | DISCUSSION | 49 |
| 5.1 | Études phénotypiques et transcriptomiques | 49 |
| 5.2 | Activité endonucléase <i>in vitro</i> | 51 |
| 5.3 | Rôles de GspA dans la compétence naturelle de <i>N. meningitidis</i> | 54 |
| 5.4 | Nouvelle courte séquence répétée chez les <i>Neisseria</i> | 57 |
| 6 | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 59 |
| 6.1 | Perspectives | 61 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 65 |
| | ANNEXE I : FIGURES SUPPLEMENTAIRES | 77 |
| | ANNEXE II : MATERIELS ET METHODES SUPPLEMENTAIRES | 79 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| FIGURE 1 : AVANTAGES DE LA COMPETENCE NATURELLE | 4 |
| FIGURE 2 : MACHINERIE D'IMPORT D'ADN CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF | 6 |
| FIGURE 3 : PATHOGENESE DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> | 13 |
| FIGURE 4 : STRUCTURE SECONDAIRE PREDITE DE LA RS | 18 |
| FIGURE 5 : DISTRIBUTION DES RS DANS LE GENOME DE <i>N. MENINGITIDIS</i> 2C4.3..... | 19 |
| FIGURE 6 : LE GENE GSPA FLANQUE DE PLUSIEURS RS DANS DIFFERENTES ESPECES BACTERIENNES | 20 |
| FIGURE 7 : ANNOTATION DE LA SEQUENCE PROTEIQUE DE GSPA CHEZ <i>N. MENINGITIDIS</i> 2C4.3 | 21 |
| FIGURE 8 : STRUCTURE 3D PREDITE DE GSPA | 21 |
| FIGURE 9 : GSPA EST UNE ENDONUCLEASE DE TYPE NICKING MAGNESIUM DEPENDANTE..... | 36 |
| FIGURE 10 : RECHERCHE DE LA SPECIFICITE DU CLIVAGE DE GSPA PAR CARTOGRAPHIE D'ADN RADIOMARQUE .. | 39 |
| FIGURE 11 : CROISSANCE EN MILIEU LIQUIDE DES DIFFERENTS MUTANTS DE GSPA..... | 42 |
| FIGURE 12 : SENSIBILITE AU STRESS OXYDATIF DES DIFFERENTS MUTANTS DE GSPA..... | 43 |
| FIGURE 13 : PILIATION DES MUTANTS DE GSPA CHEZ <i>N. MENINGITIDIS</i> | 44 |
| FIGURE 14 : EXPRESSION RELATIVE DE GENES ASSOCIES A LA SEQUENCE REPETEE OU A GSPA | 45 |
| FIGURE 15 : TEST DE TRANSFORMATION AVEC LE PLASMIDE PCOMPIND | 47 |
| FIGURE 16 : TEST DE TRANSFORMATION AVEC LE PLASMIDE PKOYEBN | 48 |
| FIGURE 17 : MECANISME D'ACTION PROPOSE DE GSPA DANS LA COMPETENCE DE <i>N. MENINGITIDIS</i> | 60 |
| FIGURE S1 : EXPRESSION RELATIVE DE GSPA DANS LES MUTANTS..... | 77 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| TABLEAU 1 : CONCENTRATIONS D'ANTIBIOTIQUES UTILISEES POUR LA CULTURE DE E. COLI ET DE N. MENINGITIDIS..... | 26 |
| TABLEAU 2 : LISTE DES PLASMIDES UTILISES | 27 |
| TABLEAU 3 : RECAPITULATIF DES PHENOTYPES TESTES OU GSPA NE SEMBLE PAS AVOIR D'IMPLICATION | 41 |
| TABLEAU S1 : LISTE DES AMORCES UTILISEES | 79 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | | |
|----------------|---|--|
| aa | Acide aminé | Unité structurale de base des protéines. |
| ADN | Acide désoxyribonucléique | Molécule organique contenant l'information génétique, constituée de 4 désoxyribonucléotides. |
| ARN | Acide ribonucléique | Molécule organique provenant de la transcription de l'ADN, constituée de 4 ribonucléotides, |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> | Protéine bovine utilisée dans des tampons pour mieux conserver certaines enzymes. |
| CFU | <i>Colony Forming Unit</i> | Nombre de colonies observées sur une gélose, qui correspond au nombre de bactéries initialement inoculées. |
| Compl | Complémenté | Désigne une souche dont un gène inactivé est réintroduit ailleurs dans le génome. |
| DO600 | Densité optique à 600 nm | Mesure de la turbidité d'une solution à une longueur d'onde de 600 nm. Permet d'inférer la concentration en bactéries. |
| EMS | Ethyl-MethaneSulfonate | Composé chimique mutagène modifiant aléatoirement la guanine de l'ADN, menant à des substitutions de nucléotides. |
| GCB | <i>Gonococcal Base</i> | Milieu de culture riche, utilisé spécifiquement pour les <i>Neisseria</i> . |
| GST | <i>Glutathione S-transferase</i> | Protéine pouvant être fusionnée à une protéine d'intérêt pour faciliter sa purification par chromatographie. Lie fortement le glutathion. |
| HGT | <i>Horizontal Gene Transfer</i> | Transfert latéral de matériel génétique entre deux cellules. |
| IPTG | Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside | Réactif utilisé pour induire l'expression d'un gène sous le contrôle d'un opéron Lac. |
| KO | <i>Knock-Out</i> | Désigne une souche dont un gène est inactivé ou supprimé. |
| Nm | <i>Neisseria meningitidis</i> | Espèce pathogène du genre <i>Neisseria</i> , responsable de la méningite bactérienne. |
| nt | Nucléotide | Unité structurale de base de l'ADN et de l'ARN. |
| OE | <i>Overexpressed</i> | Désigne une souche dont un gène est surexprimé. |
| pb | Paire de bases | Désigne l'appariement de deux nucléotides entre deux brins d'ADN. |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> | Solution tampon à pH neutre (7.3-7.5) composée principalement de chlorure de sodium et de potassium. |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> | Technique de biologie moléculaire visant à amplifier spécifiquement de l'ADN. |
| PTA | <i>Phosphotungstic Acid</i> | Colorant à base de tungstène utilisé en contre-coloration en microscopie électronique à transmission. |
| rpm | Révolution par minute | Unité de vitesse de rotation d'une centrifugeuse. |
| RS | <i>Repeated Sequence</i> | Dans cet ouvrage, désigne spécifiquement la séquence répétée que nous avons identifiée dans ce projet. |
| RT-qPCR | <i>Reverse-Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> | Technique visant à rétrotranscrire de l'ARN en ADN, puis à l'amplifier par PCR. Permet une quantification relative du niveau d'expression des gènes. |
| WT | <i>Wild Type</i> | Désigne une souche bactérienne sauvage, sans modification génétique quelconque. |

MISE EN CONTEXTE

L'incroyable diversité des microorganismes témoigne de leur potentiel d'évolution et d'adaptation extrêmement rapide. Malgré des connaissances de plus en plus précises sur la façon dont ces bactéries, virus et champignons peuvent causer des maladies chez l'humain, de nouveaux agents pathogènes sont découverts année après année (Vouga & Greub, 2016). Leur impact en santé publique, bien que moins lourd qu'il y a quelques décennies, demeure substantiel, en particulier dans les pays où l'accès aux soins est difficile. Deux bactéries en particulier sont connues depuis longtemps et étudiées par de nombreux chercheurs, mais causent encore des millions d'infections par an chez l'humain, parfois mortelles ; *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*. La première colonise le tractus intestinal et est responsable de la gonorrhée, une infection transmise sexuellement. La seconde loge en temps normal dans le nasopharynx, mais peut parfois pour des raisons encore obscures traverser la barrière épithéliale pour causer des infections systémiques (septicémie) ou encore la méningite bactérienne (Coureuil *et al.*, 2012). Chose surprenante, ces deux espèces aux pathogénèses très différentes possèdent un génome identique à 96% (Davidsen & Tønjum, 2006), témoignant de leur récente divergence évolutive.

Les *Neisseria* pathogènes sont des organismes de choix pour l'étude de l'évolution bactérienne. En effet, ce genre regroupe plusieurs morphologies différentes ; cocci, bacilles et multicellulaires, chose rare chez les procaryotes. De plus, ceux-ci sont capables, par un mécanisme appelé compétence naturelle, d'acquérir de l'ADN de leur environnement et de l'intégrer à leur propre génome, ce qui contribue grandement à leur forte adaptabilité. Cette caractéristique a également pour conséquence de leur conférer un génome dit « en mosaïque », en raison du très grand nombre d'éléments répétés qui y sont retrouvés.

N. meningitidis et *N. gonorrhoeae* ne sont pas strictement pathogènes. La première est au contraire retrouvée de façon asymptomatique dans le nasopharynx chez 10 à 35% de la population adulte mondiale (Caugant *et al.*, 2007). Malgré les efforts de la communauté scientifique, l'émergence de souches pathogènes à partir de cette bactérie commensale est un phénomène encore mal expliqué. La recherche fondamentale de cette bactérie est donc nécessaire si l'on veut un jour prédire et anticiper l'apparition de nouveaux clones hypervirulents, chose beaucoup plus fréquente et d'actualité qu'on ne pourrait le croire (Broad & Snape, 2017; Frank *et al.*, 2018; Tzeng *et al.*, 2017).

1 INTRODUCTION

1.1 Évolution bactérienne

Leur temps de génération très court et l'instabilité génomique des bactéries leur confèrent un potentiel évolutif extrêmement rapide. Cette évolution a permis leur adaptation à presque tous les environnements connus, ainsi qu'une énorme diversité, autant génétique que phénotypique. Cette caractéristique, parfois exploitée par l'humain pour diverses applications biotechnologiques et thérapeutiques, peut également se retourner contre lui, par exemple lors de l'émergence de souches bactériennes hypervirulentes ou résistantes aux antibiotiques. Il existe quatre grandes forces évolutives chez les procaryotes ; la sélection naturelle, la dérive génétique, les mutations et les transferts horizontaux de gènes (HGT).

Sélection naturelle : La sélection naturelle, concept popularisé par Charles Darwin au 19^e siècle, est un principe selon lequel une variation génétique ou phénotypique bénéfique pour un individu a davantage de chance d'être conservée au fil des générations. Tout à fait applicable au domaine bactérien, une mutation d'une seule bactérie au sein d'une population homogène lui conférant un avantage adaptatif sera transmise aux cellules filles, menant à une population entière arborant cette mutation.

Dérive génétique : Tandis que la sélection naturelle a davantage d'effets sur de larges populations, la dérive génétique impacte plutôt les petites populations (Kuo *et al.*, 2009). Ce mécanisme, totalement aléatoire, désigne la modification de fréquence d'un génotype au sein d'une population. De nombreuses études montrent que la dérive génétique cause une diminution de la taille du génome des bactéries au fil du temps (Andersson & Kurland, 1998; Bobay & Ochman, 2017; Lynch & Conery, 2003; Wolf & Koonin, 2013). En effet, tout gène tend à disparaître s'il n'est pas conservé par la sélection naturelle. Un exemple extrême de dérive génétique, appelé effet d'étranglement (*population bottleneck*), survient quand un événement quelconque cause un déclin majeur d'une population, qui mène aléatoirement à la disparition de certains gènes et la conservation de certains autres. L'adaptation d'une bactérie à un nouvel hôte est un bon exemple de goulot d'étranglement évolutif qui peut mener à l'émergence de nouveaux pathogènes (Moxon & Kussell, 2017).

Mutations : Également aléatoires, les mutations sont des événements extrêmement fréquents chez les bactéries. Celles-ci peuvent altérer un seul nucléotide, comme les substitutions, ou encore des séquences plus larges, comme les insertions, délétions, duplications, etc. Ces

altérations peuvent provenir de facteurs internes, comme des erreurs lors de la réplication ou la réparation de l'ADN, ainsi que de facteurs externes comme l'exposition à des radiations ionisantes ou à des composés mutagènes. La sélection naturelle tend à conserver ou éliminer une mutation selon son impact sur la bactérie. De nombreux exemples d'émergence de résistances à des antibiotiques (Woodford & Ellington, 2007; Yang *et al.*, 2019), d'augmentation de la virulence (Kisiela *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016) ou encore d'adaptation à un nouvel environnement (Brooks *et al.*, 2011) sont associés à des mutations spécifiques.

Transferts horizontaux de gènes (HGT) : Contrairement aux transferts verticaux de gènes, qui se transmettent d'une cellule mère à une cellule fille, les transferts horizontaux se font entre les individus d'une population. Ces transferts peuvent donc modifier le génome d'une bactérie de façon drastique très rapidement, représentant ainsi une source majeure de diversité microbienne (Wiedenbeck & Cohan, 2011). Il existe trois mécanismes de HGT ; la conjugaison, la transduction et la transformation.

- **Conjugaison :** La conjugaison implique un transfert unilatéral d'ADN d'une cellule donneuse à une cellule receveuse via un pili particulier, ce qui nécessite un contact physique entre les cellules. L'ADN est transmis sous forme de plasmide, qui code pour les gènes nécessaires à la conjugaison. Ainsi, la bactérie réceptrice devient à son tour donneuse (Llosa *et al.*, 2002).
- **Transduction :** La transduction implique la transmission d'ADN par un vecteur viral appelé bactériophage. Lorsqu'un virus infecte une bactérie et se réplique à l'intérieur de celle-ci, il peut arriver qu'il encapside du matériel génétique de la bactérie dans un virion. Cet ADN peut alors être transmis lorsque le virion infecte une nouvelle bactérie (Parkinson, 2016).
- **Transformation :** Contrairement aux deux mécanismes précédents, la transformation ne nécessite ni vecteur ni contact direct entre les cellules. L'ADN, relâché dans l'environnement par des cellules mortes, est capté par des bactéries dites compétentes, qui vont ensuite l'importer jusqu'au cytoplasme. Cet ADN peut par la suite être intégré au chromosome bactérien par recombinaison homologe (Johnston *et al.*, 2014). La compétence est une caractéristique innée chez certaines espèces comme les *Neisseria*, mais qui peut aussi être induite artificiellement chez d'autres comme *E. coli* afin de les manipuler génétiquement.

1.2 Compétence naturelle

La compétence naturelle est la capacité de certaines bactéries et archées à acquérir de l'ADN de leur environnement par transformation. Cet ADN peut par la suite être conservé par la bactérie, ou encore être dégradé en acides nucléiques et utilisé par la cellule pour alimenter d'autres réactions métaboliques (Blokesch, 2016). Le terme « naturel » fait référence à l'autonomie de ces bactéries pour réaliser cette transformation. Celles-ci n'ont en effet pas besoin d'électroporation, de choc thermique ou de tout autre technique pour les rendre compétentes, comme on pourrait le faire avec *E. coli* par exemple. Contrairement à la transformation artificielle réalisée en laboratoire, qui perméabilise chimiquement ou physiquement la membrane cellulaire pour permettre l'entrée d'ADN, la compétence naturelle est un attribut associé à des protéines spécifiques. Ce caractère est contrôlé par des gènes, et peut donc être régulé positivement et négativement. Plus de 80 espèces bactériennes sont connues pour être naturellement compétentes, provenant de tous les embranchements (Johnston *et al.*, 2014). Dans certaines bactéries, la compétence est associée à d'autres processus comme le cycle cellulaire. Dans d'autres, c'est l'environnement immédiat qui dicte la compétence (Blokesch, 2016). La régulation de ce processus est donc hautement complexe et variée d'une espèce à une autre.

Les espèces naturellement compétentes sont distribuées de façon très éparse dans la phylogénie bactérienne, suggérant que cette caractéristique est apparue et disparue plusieurs fois au cours de l'évolution bactérienne (Johnston *et al.*, 2014). En effet, la compétence confère plusieurs avantages, mais la centaine de gènes impliqués dans ce mécanisme complexe engendre des coûts énergétiques importants et l'intégration d'ADN exogène n'est pas toujours bénéfique. Trois hypothèses sur les bénéfices de la compétence naturelle sont présentées ci-bas (figure 1). Celles-ci ne sont pas mutuellement exclusives, et témoignent au contraire de la complexité de la régulation de ce mécanisme.

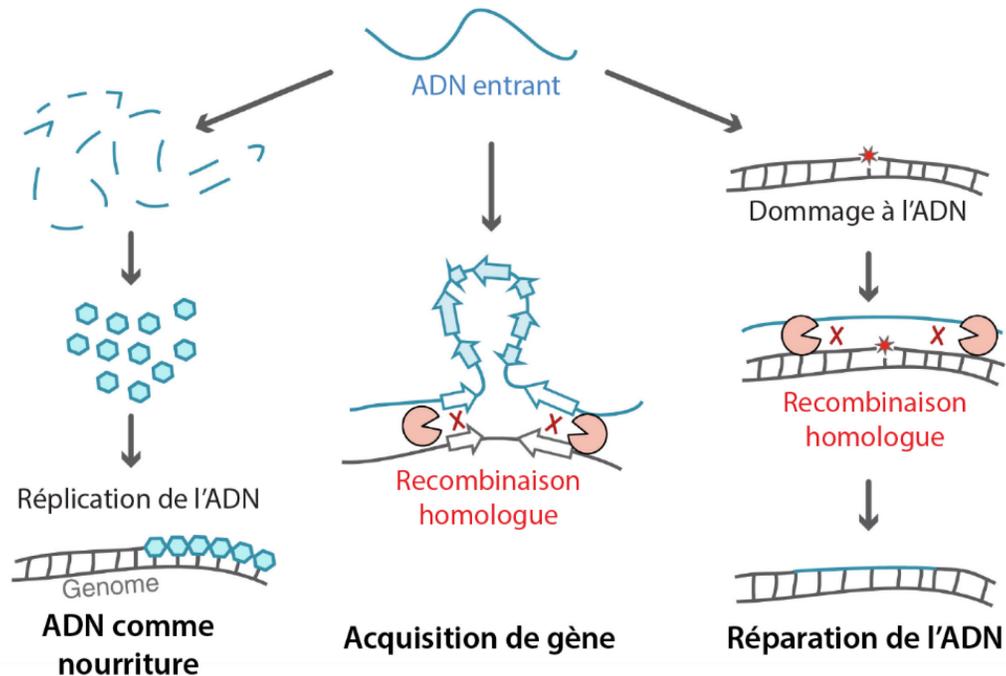


Figure 1 : Avantages de la compétence naturelle

Modifié de Blokesch (2016)

1.2.1 Avantages de la compétence naturelle

A) L'ADN comme « nourriture »

La première hypothèse quant à l'utilité de la compétence naturelle chez les bactéries repose sur le fait que l'ADN est composé d'acides nucléiques, qui sont nécessaires à la réplication du génome. Leur synthèse par la bactérie demande à la fois beaucoup d'énergie et de métabolites. Il serait donc avantageux d'importer de l'ADN préformé de l'environnement plutôt que de le synthétiser soi-même. Pour supporter cette idée, certaines bactéries entrent dans un état de compétence uniquement lorsqu'elles atteignent une forte densité cellulaire ou sont en carence de nutriments (MacFadyen *et al.*, 2001).

B) Réparation de l'ADN

Cette seconde hypothèse prône que la compétence naturelle fournit à la bactérie un potentiel important de réparation de l'ADN. En effet, la compétence est induite ou augmentée dans certaines espèces suite à des dommages à l'ADN, dont l'agent pathogène intestinal *Helicobacter pylori* (Dorer *et al.*, 2010; Prudhomme *et al.*, 2006). De plus, une étude a démontré que des bactéries exposées à un rayonnement UV, qui cause des mutations, ont une meilleure survie lorsqu'elles sont par la suite exposées à de l'ADN de bactéries saines (Bernstein *et al.*, 2012).

C) Évolution et adaptation

Cette troisième hypothèse est similaire à celle de la réparation de l'ADN dans le sens qu'elle se base sur l'intégration par recombinaison de l'ADN exogène au génome suite à son import dans le cytoplasme. Cependant, au lieu de réparer l'ADN, cette intégration peut introduire de nouveaux gènes ou des gènes mutés dans la bactérie réceptrice. Certaines espèces naturellement compétentes, comme les *Neisseriaceae* et certaines *Pasteurellales*, ont une forte sélectivité envers l'import d'ADN d'espèces rapprochées (Mell & Redfield, 2014). L'importante homologie entre ces espèces rapprochées favorise la recombinaison homologue, un élément clé dans l'évolution bactérienne (Levin & Cornejo, 2009). De nombreuses études démontrent expérimentalement que la compétence naturelle favorise l'adaptation dans plusieurs espèces (Baltrus *et al.*, 2008; Engelmoer *et al.*, 2013; Hülter *et al.*, 2017).

En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé a publié une liste de 11 bactéries pathogènes pour lesquelles l'accumulation de multiples résistances aux antibiotiques rend la recherche « prioritaire » (Tacconelli *et al.*, 2018). Fait intéressant, au moins 8 de ces espèces sont naturellement compétentes, ce qui supporte davantage le rôle de cet attribut dans l'évolution bactérienne via l'acquisition de gènes (Lerminiaux & Cameron, 2019).

1.2.2 Mécanisme de transformation chez des espèces naturellement compétentes

L'acquisition de matériel génétique par transformation est un mécanisme relativement bien conservé entre les espèces naturellement compétentes. La section suivante détaille ce mécanisme chez les bactéries à Gram négatif, qui nécessitent des étapes supplémentaires par rapport aux bactéries à Gram positif en raison de leur double membrane (figure 2) (Piepenbrink, 2019).

Liaison et import de l'ADN exogène vers le périplasme : Dans les bactéries à Gram négatif, la liaison à l'ADN double-brin se fait par les pili de type IV, composés de la piline majeure PilA (PilE chez *Neisseria*) et de pilines mineures variables à leur extrémité (ComP, PilV, etc.). Débutant au niveau de la membrane interne, les pili de type IV traversent la membrane externe par la porine PilQ. Une ATPases de rétraction, PilT, permet ensuite de rétracter le pilus et d'importer l'ADN au travers de la membrane externe par le pore PilQ (Piepenbrink, 2019). Immédiatement lié à la protéine ComE dans le périplasme, l'ADN ne peut en ressortir grâce à un mécanisme dit « à cliquet » (Matthey & Blokesch, 2016).

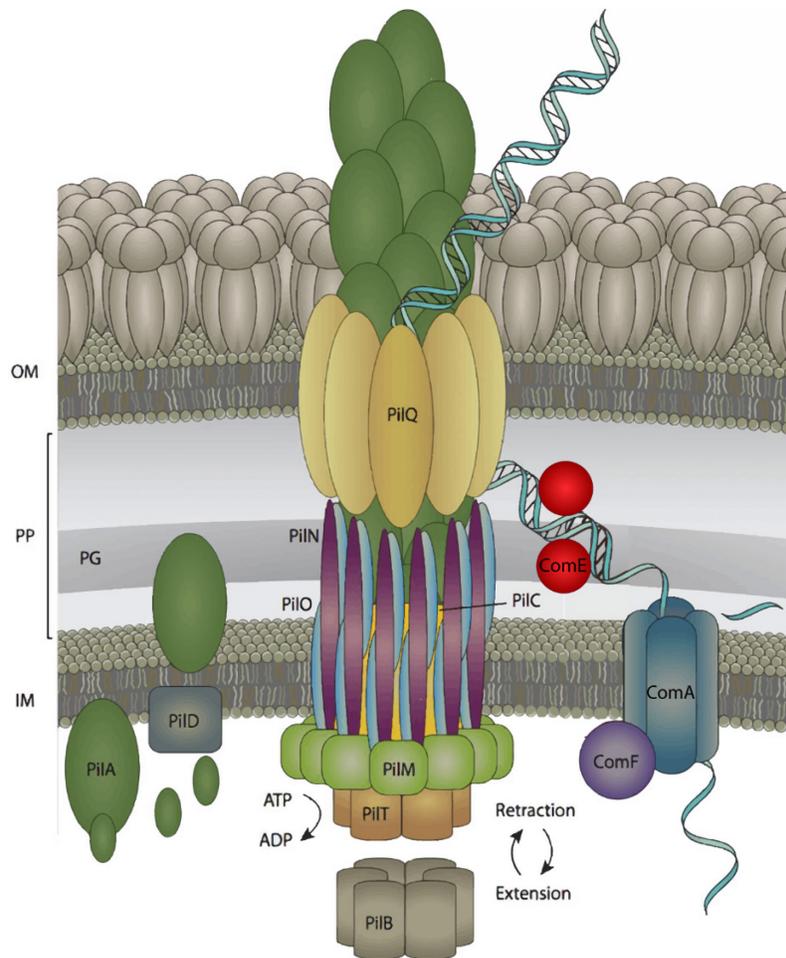


Figure 2 : Machinerie d'import d'ADN chez les bactéries à Gram négatif

OM : membrane externe, PP : périplasme, IM : membrane interne, PG : peptidoglycane
Modifié de Wendt and Pakrasi (2019)

Transport de l'ADN du périplasme au cytoplasme : Une fois lié à la protéine ComE, l'ADN double-brin est fragmenté par une endonucléase (Dubnau, 1999). La fragmentation permet d'accélérer l'import de l'ADN (Provvedi *et al.*, 2001). ComE présente ensuite les fragments d'ADN au récepteur transmembranaire ComA et à la translocase ComF. ComF déroule et sépare les deux brins d'ADN, pour qu'un seul soit transporté dans le pore formé par ComA (Londoño-Vallejo & Dubnau, 1994). Le brin non importé est ensuite dégradé par une autre endonucléase (Mejean & Claverys, 1993).

Recombinaison homologue au génome : Immédiatement après l'arrivée de l'ADN simple brin dans le cytoplasme, celui-ci est recouvert de plusieurs protéines qui le protègent physiquement des nucléases cytoplasmiques (Morrison *et al.*, 2007). Dans un premier temps, les protéines Ssb (*single-stranded DNA binding protein*) et DprA (*DNA processing protein A*) s'y fixent. DprA favorise ensuite la fixation de la protéine RecA (recombinase A) (Mortier-Barriere *et al.*, 2007).

RecA est l'élément clé de la recombinaison homologue de l'ADN transformant au génome de l'hôte. Grâce à ses multiples sites de liaison à l'ADN, cette protéine peut fixer à la fois l'ADN simple-brin transformant et l'ADN double-brin chromosomique. Elle peut ensuite survoler ce dernier, à la recherche d'une homologie entre les deux chaînes d'acides nucléiques. Lorsqu'une homologie suffisante est détectée, RecA initie l'échange entre les brins, ce qui mène à l'intégration de l'ADN exogène au génome. (Chen *et al.*, 2008).

1.2.3 Régulation de la compétence naturelle

Bien que le mécanisme général de la transformation soit conservé entre les espèces naturellement compétentes, chacune possède des caractéristiques qui lui sont propres. Par exemple, *Streptococcus pneumoniae* possède un système de prédation fratricide permettant aux bactéries compétentes de tuer spécifiquement leurs voisines non-compétentes afin d'acquérir leur ADN, tout en se protégeant à l'aide d'une antitoxine (Veening & Blokesch, 2017). Cette particularité favorise l'hypothèse de réparation de l'ADN et d'évolution puisque l'ADN provient alors de cellules initialement saines. De plus, la compétence chez cette espèce n'apparaît qu'en phase exponentielle de croissance, suite à la sécrétion d'un peptide signal (Håvarstein *et al.*, 1995).

Chez *Bacillus subtilis* au contraire, le stade de compétence est uniquement atteint en phase stationnaire ou lorsque la densité cellulaire est forte, et ce seulement chez 10% de la population bactérienne (Dubnau, 1991). Cette régulation particulière suggère que la compétence chez cette espèce est un mécanisme de réponse au stress, visant l'adaptation d'une sous-population au changement environnemental.

Chez *Vibrio cholerae*, un agent pathogène majeur également naturellement compétent, l'état de compétence n'est atteint qu'en présence de chitine, un sucre abondant dans l'environnement aquatique où la bactérie se propage. De plus, la compétence de cette espèce est accrue lorsque les nutriments du milieu sont limitants (Antonova *et al.*, 2012). *V. cholerae* possède également un système de prédation, utilisant un système de sécrétion de type VI comme harpon moléculaire pour injecter des toxines directement dans les cellules voisines (Veening & Blokesch, 2017).

Finalement, la famille des *Neisseriaceae* affiche également une régulation unique de la compétence. En effet, les *Neisseria* sont les seules espèces compétentes de façon constitutive décrites à ce jour, c'est-à-dire à tout stade de croissance et sans contraintes environnementales, ce qui en font un très bon modèle d'étude (Blokesch, 2016). Ces bactéries seront détaillées plus loin dans cet ouvrage.

1.3 Éléments répétés

Une preuve tangible de l'influence des transferts horizontaux de gènes sur le génome des bactéries se trouve dans l'abondance des éléments répétés qu'on y retrouve. Cet ADN répété, qui représente jusqu'à 42% du génome total chez certaines espèces comme *Orientia tsutsugamushi*, est une cause majeure de flexibilité et d'instabilité génomique (Treangen *et al.*, 2009). En effet, une fois insérés, ces éléments peuvent être dupliqués, supprimés ou réarrangés de façon aléatoire, entraînant parfois la modification de certains gènes.

Répétitions en tandem : Les répétitions en tandem sont des séquences de nucléotides répétées côte à côte. Selon leur taille, on les classe en macrosatellites (>100bp), minisatellites (10-100bp) et microsatellites (1-9bp). Cette appellation provient de leur localisation majoritairement intergénique. Malgré leur génome plus petit, les bactéries associées à des hôtes ont un plus grand nombre de microsatellites que les bactéries environnementales, ce qui reflète le rôle des éléments répétés dans l'évolution et l'adaptation bactérienne (Moxon *et al.*, 2006). Les répétitions en tandems sont également associées à la variation de phase lorsqu'elles se situent directement dans les gènes (Zhou *et al.*, 2014). La variation de phase est un système utilisé par plusieurs bactéries pathogènes pour augmenter leur hétérogénéité génétique, ce qui favorise l'évasion immunitaire. Dans le cas des *Neisseria* pathogènes par exemple, les répétitions en tandem sont directement associées à la variation de phase des adhésines Opa, de la piline pilS ainsi que de plusieurs systèmes de Restriction-Modification (Zhou *et al.*, 2014).

Répétitions dispersées : Comme le suggère leur nom, les répétitions dispersées sont éparpillées dans le génome. Ces éléments se divisent en plusieurs familles, détaillées ci-dessous (Treangen *et al.*, 2009):

- **Courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées (CRISPR, 24-47 bp séparés par 26-72 bp) :** Popularisés dans la dernière décennie pour leur potentiel industriel et médical, les CRISPR sont composés de courtes répétitions directes séparées par des « espaceurs » uniques de la même taille. Ces éléments sont retrouvés dans près 40% des génomes bactériens. Lorsque ces répétitions sont associées aux

gènes *cas* (CRISPR-associated), elles jouent un rôle majeur dans la protection contre l'ADN exogène, principalement viral (Barrangou *et al.*, 2007). Les espaceurs proviennent de phages ou de plasmides ayant déjà infecté la bactérie auparavant (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005b; Pourcel *et al.*, 2005). Ceux-ci servent alors de séquences de reconnaissance de l'ADN étranger, ce qui permet ensuite aux protéines Cas de le dégrader (Shmakov *et al.*, 2017).

- **Palindromes répétés extragéniques (REP, 21-65 bp)** : Ces courtes séquences palindromiques peuvent adopter une structure secondaire en tête d'épingle, ce qui explique leurs rôles multiples dans la transcription et la traduction. En effet, ils possèdent entre autres des sites de liaison pour la polymérase d'ADN I ainsi que la gyrase (Messing *et al.*, 2012).
- **Éléments bactériens dispersés en mosaïques (BIME, 40-500 bp)** : Les BIME sont des REP dispersés en mosaïque dans de courts segments de moins de 500 pb. Leurs fonctions sont donc les mêmes que les REP. Ensemble, ces deux éléments répétés contribuent à la plasticité du génome. En effet, certaines régions contenant des REP présentent un taux élevé de transposition et de recombinaison, deux mécanismes associés à l'évolution des procaryotes (Bachelier *et al.*, 1997).
- **Répétitions inversées miniatures transposables (MITE, 100-400 bp)** : Les MITE sont flanqués de deux séquences répétées inversées. Ils sont considérés comme des éléments mobiles, mais ne possèdent pas de transposase donc leur transport dépend d'autres facteurs. Cette famille d'éléments répétés regroupe plusieurs sous-types de répétitions, qui sont retrouvées dans plusieurs espèces bactériennes : éléments Correia chez les *Neisseria*, RUP (*repeat unit of pneumococcus*) chez *S. pneumoniae*, CIR (*caulobacter intergenic repeat*) chez *Caulobacter sp.* etc. Ces éléments sont souvent retrouvés à proximité immédiate de gènes, et forment des tiges-boucles grâce à la liaison des deux répétitions inverses. Cette structure secondaire est alors responsable d'une régulation post-traductionnelle (Delilhas, 2008).
- **Séquences d'insertion (IS, 700-3500 bp)** : Les éléments génétiques mobiles se divisent en deux grandes catégories ; les séquences d'insertion et les transposons. Les IS sont constitués d'un gène de transposase entre deux répétitions inversées. Les IS sont très abondants dans les plasmides, où ils peuvent représenter plus de 40% de l'ADN (Treangen *et al.*, 2009). Ces éléments ont eux aussi une importance majeure dans l'évolution du génome à long terme, tout particulièrement dans l'adaptation d'une bactérie à un hôte. En effet, la colonisation d'un hôte par une bactérie historiquement

environnementale est associée d'abord par une augmentation massive du nombre d'IS, appelée expansion, puis à une diminution de la taille du génome parfois associée à une augmentation de la pathogénicité et de la virulence (Siguier *et al.*, 2014).

- **Transposons** (2 500-60 000 bp) : La seconde classe d'éléments mobiles, les transposons, est plutôt impliquée dans l'évolution à court terme des procaryotes. Ceux-ci ont une structure similaire aux IS, mais possèdent en plus un ou plusieurs gènes non associés à leur mobilité. Leur insertion dans le génome chromosomique se fait de deux façons, par « copier-coller » ou encore par « couper-coller », ce qui engendre un remodelage du génome. Occasionnellement, ces éléments propagent des gènes de résistance aux antibiotiques (Babakhani & Oloomi, 2018).

1.3.1 Éléments répétés et instabilité génomique

Les éléments répétés sont une source majeure d'instabilité génomique chez les procaryotes, qui peut mener à l'apparition de nouveaux phénotypes ou à une augmentation de la virulence d'agents pathogènes déjà existants (Delihias, 2011). Ces répétitions d'ADN sont en effet directement liées à la variation antigénique et à la variation de phase, deux mécanismes permettant aux pathogènes humains tels que *Neisseria meningitidis* et *N. gonorrhoeae* d'échapper au système immunitaire (Zelevska *et al.*, 2016). Les éléments répétés sont également associés aux HGT, qui dictent l'évolution des microorganismes (Darmon & Leach, 2014). Un autre élément clé de l'évolution bactérienne, la recombinaison homologe, est également fortement modulé par les séquences répétées via un mécanisme appelé glissement de brin (*slipped strand mispairing*). En effet, l'homologie parfaite entre ces éléments entraîne parfois l'appariement décalé de deux séquences lors de la réplication, qui peut alors introduire ou supprimer davantage de séquences répétées et altérer l'expression de gènes (Treangen *et al.*, 2009). Finalement, certaines séquences répétées comme les CRISPR confèrent à la bactérie une immunité contre les phages (Mojica *et al.*, 2005a). Il est donc clair que ces ADN, même s'ils sont en grande majorité non-codants, ont une importance énorme chez les procaryotes et méritent d'être étudiés plus en détail.

1.4 *Neisseria sp.*

Les *Neisseria* sont des betaprotéobactéries à Gram négatif de la famille des *Neisseriaceae* et de l'ordre des *Neisseriales*. Leur nom tient son origine du médecin bactériologiste Albert Neisser qui observa pour la première fois en 1879 des gonocoques (*Neisseria gonorrhoeae*) dans

des lymphocytes provenant d'exsudats d'urètres de patients atteints de la gonorrhée (Neisser, 1879). Le genre *Neisseria* est très diversifié, regroupant majoritairement des espèces commensales mais aussi quelques agents pathogènes humains et animaux. Chaque année, de nouvelles espèces de *Neisseria* sont découvertes, ce qui explique leur phylogénie en constante évolution (Hansen *et al.*, 2017; Weyand *et al.*, 2016; Wroblewski *et al.*, 2017). Il s'agit d'un des rares genres bactériens arborant plusieurs morphologies. On y retrouve typiquement des diplococci dont *N. meningitidis* et *N. canis*, mais également plusieurs diplobacilles comme *N. elongata* et *N. weaveri*. Cette diversité morphologique est due à une évolution au sein même de la famille des *Neisseriaceae*, qui pourrait également expliquer le tropisme particulier de ces bactéries (Veyrier *et al.*, 2015).

La diversité des *Neisseria* ne se limite pas à leur morphologie. Leurs niches écologiques sont également remarquablement variées. En effet, certaines font partie de la flore commensale du nasopharynx et des voies aériennes supérieures chez l'homme. D'autres sont retrouvées dans une large gamme d'animaux, et ce à différents sites anatomiques allant de la peau au tractus urogénital en passant par les méninges. Seulement deux espèces de *Neisseria* sont pathogènes chez l'homme. *N. meningitidis*, transmise par aérosol, est responsable de la méningite bactérienne. *N. gonorrhoeae*, quant à elle, se transmet par contact sexuel et cause la gonorrhée (Tønjum & van Putten, 2017).

Tout comme le suggère leur principale niche écologique, les *Neisseria* commensales ont une place importante dans le microbiote humain. Dans la cavité orale, ce genre représente à lui seul près de 10 % du microbiote d'individus sains (Zaura *et al.*, 2009). Cette abondance est en partie expliquée par le fait que les *Neisseria* colonisent la bouche et le nasopharynx très tôt dans le développement de l'enfant, dès les premiers mois suivant la naissance (McCarthy *et al.*, 1965). Une dysbiose des *Neisseria* dans cet environnement est d'ailleurs corrélée à plusieurs problèmes de santé, notamment à la maladie cœliaque (Iaffaldano *et al.*, 2018), au diabète gestationnel (Wang *et al.*, 2018) et à la maladie de Crohn (Said *et al.*, 2014). Le pouvoir protecteur de ces commensaux a déjà été étudié. Par exemple, la présence asymptomatique de *N. lactamica* dans le nasopharynx inhibe la colonisation de *N. meningitidis* (Deasy *et al.*, 2015). Cette protection a très récemment été associée à une toxicité de l'ADN des espèces commensales sur les espèces pathogènes due à un profil de méthylation différent (Kim *et al.*, 2019). À l'opposé, plusieurs *Neisseria* considérées comme non pathogènes peuvent causer de graves infections dans des hôtes immunodéprimés, mais ces cas sont plutôt rares (Liu *et al.*, 2015).

1.5 *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis est l'une des deux espèces de *Neisseria* à haut potentiel pathogène. Ce diplocoque surnommé méningocoque, est en effet l'un des principaux agents responsables de la méningite bactérienne, et le seul responsable d'une forme de septicémie appelée méningococcie. Incapable de survivre plus de quelques jours dans l'environnement, cette bactérie est transmise par aérosols et colonise principalement le nasopharynx humain, où elle est la plupart du temps asymptomatique (Tzeng *et al.*, 2014). C'est lorsque la bactérie traverse l'épithélium nasopharyngeal et envahit la circulation sanguine qu'elle cause de graves séquelles.

Les méningocoques sont classés en 13 sérogroupes selon leurs antigènes de surface ; A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y et Z. Parmi ceux-ci, 6 (A, B, C, W135, X, Y) sont capables d'invasion et donc d'aboutir à une pathologie grave. Le séro groupe A, présent surtout sur le continent africain, est responsable à lui seul de la majorité des cas de méningite à méningocoques ainsi que de la plupart des grandes épidémies de cette maladie (Tønjum & van Putten, 2017). Contrairement à sa cousine *N. gonorrhoeae*, des vaccins sont disponibles et efficaces contre plusieurs des sérogroupes de *N. meningitidis*.

1.5.1 Pathogenèse de *N. meningitidis*

Les pathologies associées aux méningocoques ont un taux très élevé de mortalité. Même lorsque l'infection est traitée, celui-ci est de 15%. Non traitée, la mortalité atteint 85%. Parmi les survivants, une personne sur 5 aura des séquelles permanentes (Rouphael & Stephens, 2012). Ces chiffres sont expliqués par la rapidité de l'infection, qui entraîne la mort à peine 24 à 48h après l'apparition des premiers symptômes. Cette létalité fulgurante est due à la pathogenèse particulière de la bactérie.

La pathogenèse de *Neisseria meningitidis* débute par la colonisation des muqueuses du nasopharynx humain suite à une transmission par aérosol ou des contacts rapprochés. La bactérie adhère d'abord aux cellules épithéliales grâce à ses pili de type IV. Puis, la rétraction de ces pili permet à la bactérie d'établir un contact direct avec la membrane cellulaire apicale. Elle peut ensuite se multiplier pour former un biofilm (Schmitz & Stratton, 2015). À cette étape-ci, l'infection est asymptomatique. L'individu est porteur de méningocoques, et pourrait ne jamais développer de maladie. L'étape critique dans la pathogenèse de *N. meningitidis* est l'invasion des cellules épithéliales. Il est proposé que, suite à une interaction complexe entre la bactérie et la cellule, le méningocoque est internalisé par endocytose dans une vacuole où il est capable de persister (Stephens *et al.*, 1983). La bactérie est alors transportée par la machinerie cellulaire

jusqu'à la membrane basolatérale où elle est relâchée dans la circulation sanguine (Sutherland *et al.*, 2010). Une fois dans le sang, *N. meningitidis* est capable de se répliquer très rapidement, entraînant en quelques heures une septicémie mortelle, la méningococcie. Parfois, l'infection systémique ne se traduit pas en septicémie. Les méningocoques circulants dans le sang se rendent à la barrière hématoencéphalique, qui protège le cerveau. Encore une fois, la bactérie se fixe à l'endothélium de cette barrière à l'aide de ses pili de type IV, où elle peut se multiplier (Pron *et al.*, 1997). La présence de *Neisseria* sur cet épithélium perturbe alors son intégralité, et la bactérie peut se faufiler entre les cellules. Une fois dans les méninges, la présence du pathogène entraîne une réponse inflammatoire localisée, la méningite. L'accumulation de cellules immunitaires à cet endroit entraîne alors un œdème rapidement mortel (figure 3) (Schmitz & Stratton, 2015).

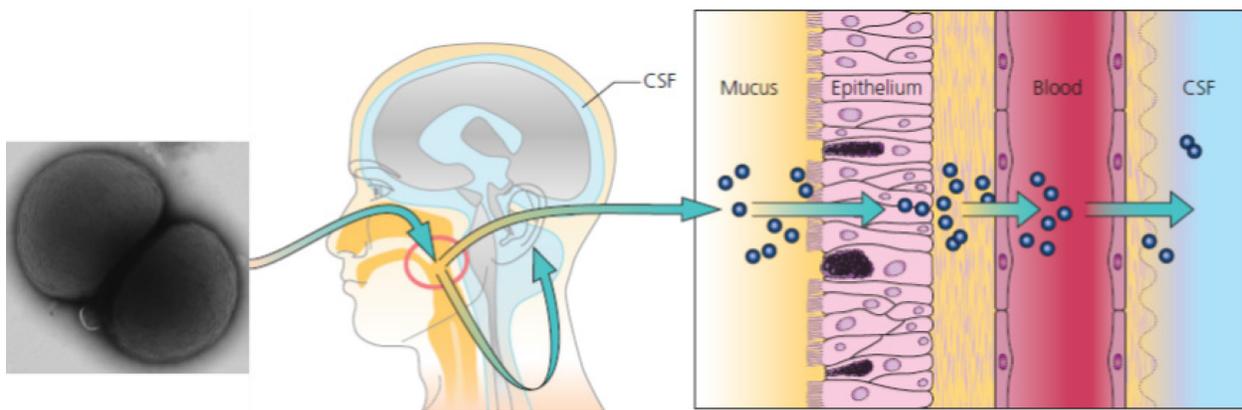


Figure 3 : Pathogenèse de *Neisseria meningitidis*

Modifié de Tønjum and van Putten (2017). CSF : liquide cérébrospinal

1.5.2 Évolution et adaptation des *Neisseria* pathogènes

L'origine et l'évolution des *Neisseria* pathogènes alimentent de nombreuses recherches depuis leur découverte, mais demeurent une question ouverte. Récemment, Priniski et Seifert ont proposé que toutes les *Neisseria* proviennent d'un ancêtre commun commensal, qui aurait évolué en plusieurs espèces commensales au sein du nasopharynx humain (Priniski & Seifert, 2018). Une de ces espèces aurait alors colonisé le tractus urogénital. Cette nouvelle niche écologique aurait ensuite mené à l'acquisition de nouveaux attributs par pression de sélection. L'élément clé de la transition commensal/pathogène serait l'activation d'une réponse immunitaire dans cette niche. Un ancêtre aurait alors migré à nouveau vers le nasopharynx, puis acquit la capacité d'infecter la circulation sanguine, donnant naissance à *N. meningitidis*. En parallèle, l'ancêtre de *N. gonorrhoeae* aurait continué à évoluer dans le tractus urogénital et à développer sa virulence via des délétions de gènes (Priniski & Seifert, 2018).

Le génome de *N. meningitidis* a une taille d'environ 2.2 megabases et est retrouvé en 2 à 5 copies circulaires identiques dans chaque cellule (Rotman & Seifert, 2014). Il code pour environ 2 000 gènes. Malgré des niches écologiques et des pathologies très éloignées, les gonocoques et les méningocoques partagent près de 96% de leur génome (Davidsen & Tønjum, 2006). *N. meningitidis* possède également 90% de similarité génétique avec *N. lactamica*, qui est commensale (Rouphael & Stephens, 2012). Une étude a même montré que 86% des gènes de virulence associés aux souches hautement pathogènes de *N. meningitidis* sont également retrouvés chez les souches avirulentes de la même espèce (Schoen *et al.*, 2008). Le contraste entre la forte homologie génétique et les différences pathologiques des *Neisseria* témoigne d'une formidable flexibilité génomique, apportée par plusieurs mécanismes propres à cette espèce.

Compétence naturelle : Toutes les *Neisseriaceae* sont naturellement compétentes, ce qui signifie qu'elles peuvent acquérir de l'ADN exogène par transformation sans nécessiter de vecteur viral ou de contact direct entre cellules. Cet ADN peut ensuite s'intégrer au génome par recombinaison homologue. La compétence naturelle est un mécanisme majeur de transfert horizontal de gènes dans ce genre bactérien et contribue grandement à l'évolution constante des différentes souches de *N. meningitidis*. Cette caractéristique est discutée plus en détails ailleurs dans cet ouvrage.

Éléments répétés : Les méningocoques se démarquent des autres *Neisseria* par leur remarquable abondance de séquences répétées, ce qui contribue fortement à leur diversité. Certaines sont uniques à ce genre bactérien, comme la *DNA uptake sequence* (DUS) et les éléments Correia (Correia *et al.*, 1988). Les séquences répétées sont au cœur de presque tous les mécanismes spécifiques de la variabilité génomique de *N. meningitidis*, dont la compétence naturelle et la variation de phase.

Variation de phase : *N. meningitidis* est capable de moduler l'expression d'une centaine de gènes de façon différentielle et réversible au sein d'une même population. Ces variations génèrent plusieurs sous-populations très hétérogènes, ce qui facilite l'évasion immunitaire. En effet, l'immunité adaptative de l'hôte devra générer une panoplie d'anticorps de différentes spécificités pour éliminer ces sous-populations. L'hétérogénéité apportée par la variation de phase augmente également le potentiel d'adaptation rapide des méningocoques dans un environnement très variable comme le nasopharynx. Les lipooligosaccharides (LOS), une composante majeure de la membrane externe des *Neisseria* analogue aux lipopolysaccharides (LPS), sont une cible importante de la variation de phase puisque cette structure entraîne une

forte réponse immunitaire. La variation d'expression de différentes glycosyltransférases se traduit par 12 types différents de LOS (Priniski & Seifert, 2018).

Variation antigénique : Plus complexe que la variation de phase, la variation antigénique permet l'expression de différentes formes d'un même gène dans une bactérie. Comme son nom l'indique, les protéines de surface sont les cibles de ce système, puisqu'elles agissent comme antigènes et activent la réponse immunitaire de l'hôte.

- **Variation des pili de type IV :** Essentiels à l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte, les pili de type IV sont hautement variables pour faciliter l'évasion immunitaire. La variation antigénique de ces structures est due au transfert de fragments de gènes *pilS* dans une région variable du gène de la piline majeure *pilE* par recombinaison. Il existe plusieurs copies du gène *pilS* dans *N. meningitidis*, ce qui permet une multitude de recombinaisons possibles. En plus de modifier les sous-unités PilE, le transfert de *pilS* dans *pilE* peut changer le cadre de lecture ou introduire un codon stop, et ainsi moduler la présence et la longueur des pili (Hill & Davies, 2009).

Mimétisme moléculaire : Les polysaccharides de la capsule des méningocoques pathogènes sont structurellement très proches de plusieurs sucres présents sur des cellules humaines, notamment l'acide sialique (Moe & Granoff, 2001). Cette similarité est exploitée par la bactérie pour se camoufler face au système immunitaire de l'hôte, qui ne différencie pas l'agent pathogène de ses propres cellules. Ce mimétisme est également un problème dans le développement de vaccins, qui ciblent la plupart du temps la capsule des méningocoques. En effet, une réponse immunitaire contre la capsule suite à une vaccination peut entraîner une réaction croisée auto-immunitaire, en générant des anticorps contre ses propres cellules (Moe & Granoff, 2001).

Changements de capsule : Les transferts horizontaux de gènes sont extrêmement fréquents chez les méningocoques, principalement à cause de leur compétence naturelle. Plusieurs souches de *N. meningitidis* peuvent cohabiter au sein d'un même hôte. Une souche peut donc acquérir certains gènes d'une autre souche. Les gènes codants pour la capsule ne font pas exception à la règle et peuvent être échangés. Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1997 dans l'ouest des États-Unis, où une épidémie associée au sérotype B sévissait. Quelques années après le début de l'épidémie, plusieurs victimes ont présenté une infection au sérotype C. Après une analyse génétique plus poussée, les chercheurs se sont rendu compte que les deux souches circulantes étaient identiques, mis à part les gènes de la capsule (Swartley *et al.*, 1997). Des cas similaires ont également été signalés aux quatre coins du globe, notamment au Canada (Tsang *et al.*, 2005). Encore une fois, ce mécanisme est un obstacle au

développement de vaccins. En effet, tous ceux commercialisés en ce moment ciblent certains sérogroupes selon leur distribution géographique, et l'augmentation du tourisme mondial accroît les risques de co-colonisation de plusieurs sérogroupes dans un même hôte (WHO, 2011). Une région où la population est immunisée contre le séro groupe A uniquement, comme l'Afrique centrale, est donc tout particulièrement à risque d'un potentiel changement de séro groupe.

Polyplœidie : Les deux *Neisseria* pathogènes sont polyplœïdes, alors que leur plus proche homologue non-pathogène, *N. lactamica* ainsi que toutes les autres espèces commensales sont monoploïdes (Tobiason & Seifert, 2006). Cet attribut semble ainsi promouvoir la virulence dans ce genre bactérien. La présence de plusieurs copies d'un génome pourrait favoriser la diversité génétique en augmentant les recombinaisons homologues, un mécanisme clé de la variation antigénique des pili. Cette caractéristique pourrait également augmenter la capacité de réparation d'ADN, grâce à la présence de plusieurs copies intactes de chaque gène.

1.5.3 Compétence naturelle chez les *Neisseria*

La compétence naturelle chez les *Neisseria* diffère relativement peu des autres bactéries à Gram négatif. Par contre, il s'agit d'une des seules espèces dont la compétence est constitutive, c'est-à-dire qu'elle ne dépend d'aucun facteur environnemental ni du cycle cellulaire. Cette particularité fait des *Neisseria* un organisme modèle pour l'étude de ce mécanisme (Blokesch, 2016).

Tout comme d'autres espèces naturellement compétentes, les *Neisseria* ont développé un système particulier pour favoriser l'acquisition d'ADN. D'abord, celles-ci peuvent exporter directement de l'ADN à une bactérie voisine par un système de sécrétion de type IV (T4SS). Contrairement à la conjugaison bactérienne, ce mécanisme ne nécessite pas de contact direct avec une autre cellule (Hamilton *et al.*, 2005). Ce système a l'avantage de promouvoir les transferts horizontaux de gènes sans sacrifier la transmission verticale, puisque la cellule donneuse ne meurt pas. Au contraire, un second système de transmission d'ADN chez les *Neisseria* implique directement la mort de la cellule : l'autolyse. Comme son nom l'indique, l'autolyse est la mort prématurée de la cellule, ce qui mène au relargage de son matériel génétique. Ce mécanisme survient très rapidement dans une culture de gonocoques ou de méningocoques dès l'arrêt de la croissance ou l'arrivée en phase stationnaire (Norlander *et al.*, 1979).

Spécificité de la compétence chez les *Neisseria* : Tout comme *Haemophilus influenzae*, les *Neisseria* importent presque uniquement de l'ADN contenant une séquence spécifique, la *DNA*

Uptake Sequence (DUS). Cette séquence de 10 ou 12 pb est présente en de nombreuses copies dans toutes les *Neisseria*, y compris les commensales. Cette spécificité est assurée par la piline mineure ComP à la surface du pili de type IV (Cehovin *et al.*, 2013b). Limiter l'import d'ADN à des espèces génétiquement très proches suggère que la compétence naturelle aide à la réparation de l'ADN ainsi qu'à l'adaptation et l'évolution. En effet, chez les *Neisseria*, presque la totalité de l'ADN importé aura une forte homologie avec le génome chromosomique, ce qui favorise considérablement les recombinaisons homologues et peut donner lieu à de multiples modifications dans une seule bactérie.

Régulation de la compétence : Puisque la compétence est active de façon constitutive chez les *Neisseria*, la régulation de ce mécanisme chez ces espèces est relativement peu étudiée. On connaît très bien les protéines directement impliquées dans le transport de l'ADN ou dans sa recombinaison au génome. Leur délétion entraîne une abolition partielle ou totale de la compétence. Par contre, on n'en sait que très peu sur les interactions transcriptomiques qui contrôlent ce mécanisme. Un seul inhibiteur de la compétence naturelle a été identifié chez les *Neisseria* : PilV. Comme son nom l'indique, cette protéine est impliquée dans la synthèse du pili de type IV et agit comme antagoniste de la piline mineure ComP. Par un mécanisme de compétition, PilV inhibe l'accumulation de ComP, ce qui résulte en une diminution de la compétence (Aas *et al.*, 2002). D'autres inhibiteurs ont été identifiés chez d'autres espèces naturellement compétentes, par exemple ComI et Rok chez *Bacillus subtilis*, qui sont des répresseurs transcriptionnels des gènes de compétence (Konkol *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2012).

Implications cliniques : En raison de la spécificité des *Neisseria* pour l'import d'ADN d'autres *Neisseria*, la compétence naturelle de ce genre bactérien semble avoir une importance particulière dans son évolution et adaptation. La capacité des deux espèces pathogènes d'acquérir de l'ADN exogène est donc une menace qui peut avoir de lourdes répercussions en santé publique. La résistance aux antibiotiques est un problème majeur chez les *Neisseria*. En effet, différents isolats cliniques de gonocoques affichent des résistances à tous les antibiotiques utilisés pour contrer la gonorrhée, maintenant qualifiée de superbactérie. Chez *N. meningitidis*, la compétence naturelle a directement été impliquée dans l'acquisition de résistance à la pénicilline, qui aurait été transmise à l'agent pathogène par d'autres *Neisseria* commensales (Tapsall *et al.*, 2009). Chez *N. gonorrhoeae*, un autre mécanisme de résistance au même antibiotique semble provenir d'un plasmide de *Haemophilus influenzae* (Correia *et al.*, 1988). Des changements au niveau de la capsule sont également associés à la compétence naturelle de *N. meningitidis*, et ont des conséquences drastiques en santé publique. Très récemment, la plus grosse épidémie

de sérotype C s'est déclarée au Niger, touchant plusieurs dizaines de milliers de personnes (Brynildsrud *et al.*, 2018). Cette souche épidémique, auparavant asymptomatique, aurait acquis des facteurs de virulence et des gènes capsulaires menant à la capacité d'invasion la rendant aujourd'hui virulente. Le vaccin récemment introduit en Afrique n'est d'aucune utilité contre cette souche puisqu'il ne protège que contre le sérotype A (WHO, 2011).

1.6 Identification d'un nouvel élément répété chez les *Neisseria* ; RS

Le génome des *Neisseria* pathogènes est surnommé de « mosaïque » en raison de sa très forte abondance et diversité de séquences répétées. En effet, ces éléments représentent environ 20% de leur génome total, une des plus fortes proportions dans le domaine bactérien (Achaz *et al.*, 2002). Sans surprise, cette abondance est corrélée avec une très forte instabilité génomique : *N. meningitidis* se classe 121^e sur 126 espèces étudiées en termes de stabilité génomique (Rocha, 2005). Cette espèce est donc un modèle d'étude important des éléments répétés et de leurs fonctions.

Notre équipe a récemment découvert l'existence d'une courte séquence répétée de 25 pb, présente en plusieurs centaines de copies exactes dans les génomes de *N. meningitidis*, une centaine de copies chez *N. gonorrhoeae* et quelques dizaines de copies chez les *Neisseria* commensales. Elle est également retrouvée dans d'autres espèces plus ou moins éloignées des *Neisseriaceae*, mais généralement en plus faible abondance. Cette courte séquence parfaitement conservée pourrait faire partie d'un plus grand élément répété moins conservé d'environ 100 pb. De par sa taille et sa structure en palindrome (figure 4), cette nouvelle séquence répétée, identifiée temporairement comme « **RS** » (repeated sequence), se classe dans la famille des répétitions extragénomiques palindromiques (REP). Celle-ci est en effet présente exclusivement entre les gènes, et jamais dans un cadre de lecture ouvert.

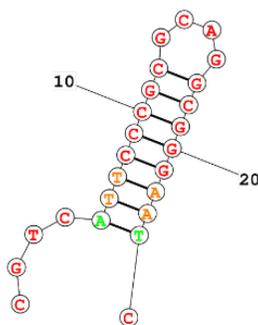


Figure 4 : Structure secondaire prédite de la RS

Obtenu avec le serveur web RNAstructure 6.0.1. Les couleurs représentent la probabilité de l'appariement : vert $\geq 70\%$, orange $\geq 95\%$, rouge $\geq 99\%$. (<https://ma.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>)

L'intérêt de cette RS vient du fait qu'elle n'est pas distribuée de façon homogène dans le génome des *Neisseria* pathogènes (figure 5A). Au contraire, elle s'amasse en clusters de part et d'autre de plusieurs gènes importants à la bactérie, notamment impliqués dans la virulence (figure 5B). Parmi ces gènes, on retrouve ceux codant pour les pilines mineures et majeures (*pil*), pour les protéines de surface *opa*, ainsi que pour des protéines d'acquisition et de régulation du fer (*tbp*, *lbp*, *fet*). Cette distribution particulière suggère un rôle dans la variation antigénique et de phase, ainsi que dans la recombinaison.

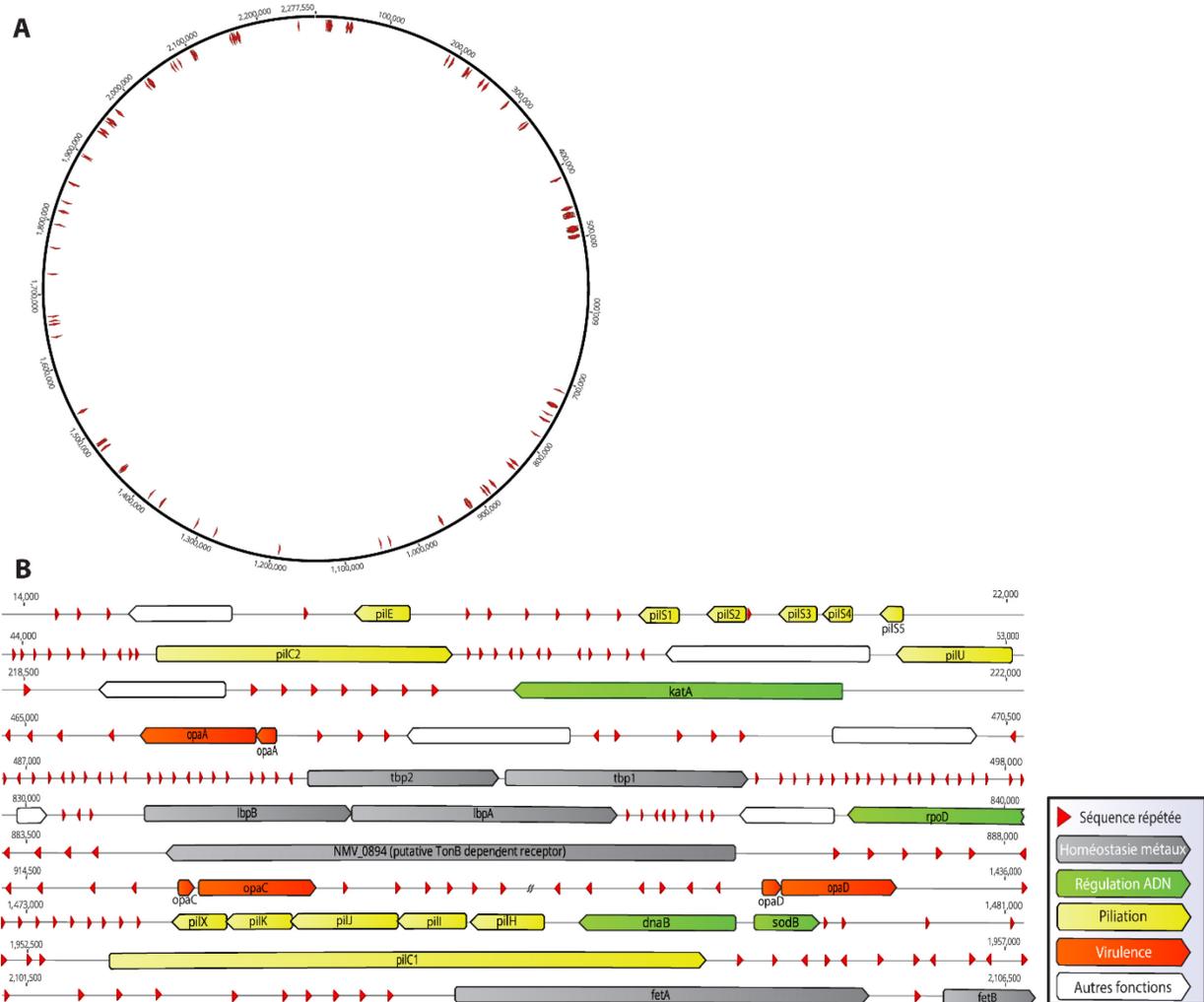


Figure 5 : Distribution des RS dans le génome de *N. meningitidis* 2C4.3

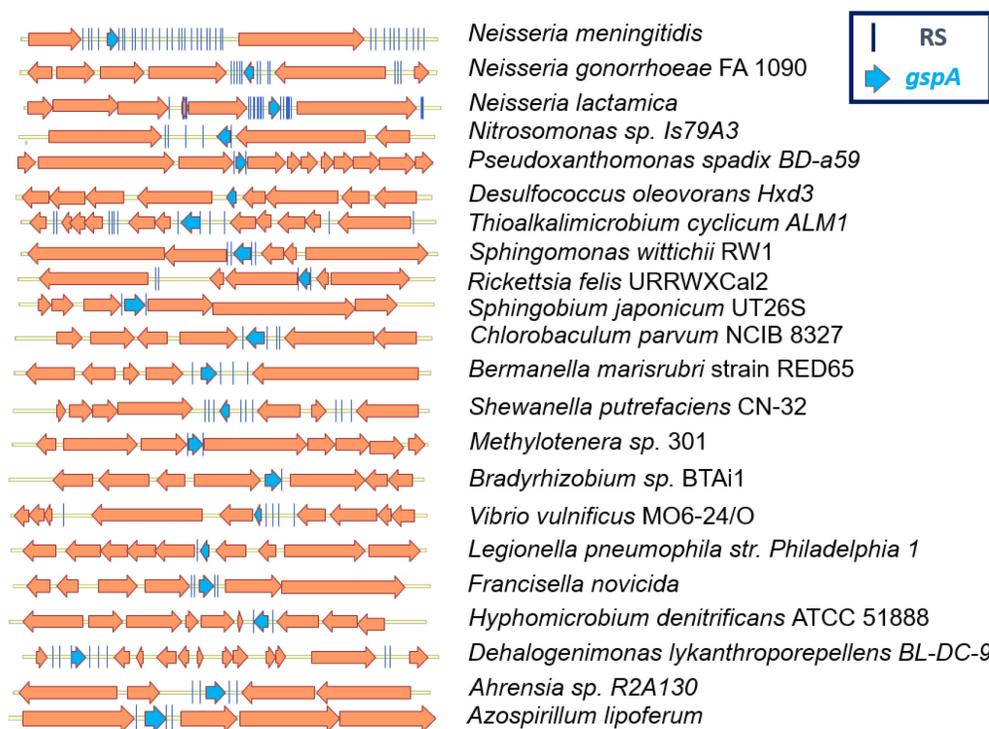
- A. Distribution des RS au niveau du génome entier.
 - B. Schématisation des gènes situées dans un cluster de RS.
- Images obtenues à l'aide du logiciel Geneious Prime version 2019.1.3

1.7 Identification d'une protéine hypothétique associée à la RS ; GspA

La fonction d'une séquence répétée est difficile à étudier. La plupart du temps, une ou des protéines sont essentielles à cette fonction, par exemple les protéines Cas pour les CRISPR, les transposases pour les IS, etc. Pour cette raison, nous avons mené une étude *in silico* approfondie de la RS dans de nombreux génomes bactériens. Nous avons d'abord identifié les espèces abritant cette RS et cartographié cet élément sur leur génome (figure 6). Nous avons également examiné quels gènes sont entourés de plusieurs copies de la RS, que nous avons par la suite comparés entre toutes les espèces. Finalement, nous avons vérifié si ces gènes étaient aussi présents dans des espèces ne contenant pas la RS.

À l'aide de notre approche bioinformatique poussée, nous avons identifié un candidat potentiel d'interaction avec la RS : *NMV_0044* (renommé *gspA*). Ce gène possède en effet plusieurs caractéristiques qui l'associent fortement à la RS :

- ✓ Dans presque toutes les espèces bactériennes où la RS est présente, le gène *NMV_0044* est également présent.
- ✓ Dans presque toutes les espèces où la RS est absente, le gène *y* est aussi absent.
- ✓ Le gène *NMV_0044* est quasi-systématiquement à proximité immédiate de plusieurs copies de la RS, qui le flanquent de part et d'autre (figure 6).



NMV_0044 est un petit gène de 285 pb situé en amont du gène *pilC2* chez *N. meningitidis* 2C4.3. Il code pour une protéine de 95 aa. Des prédictions bio-informatiques indiquent que cette protéine possède un site potentiel de liaison à un métal ainsi qu'un domaine fonctionnel GIY-YIG, mais aucun site de liaison à l'ADN (figure 7). Nous lui avons donc donné le nom de **GspA** (*GIY-YIG small protein A*). Sa structure secondaire prédite présente une région centrale composée de trois feuillets bêta antiparallèles, entourés de 3 hélices alpha (figure 8).

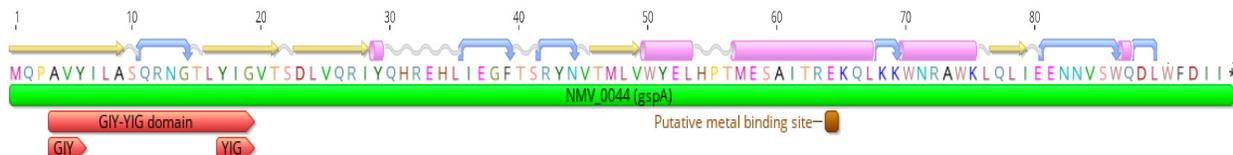


Figure 7 : Annotation de la séquence protéique de GspA chez *N. meningitidis* 2C4.3

De haut en bas : structures secondaires prédites, séquences en acides aminés, gène, domaines fonctionnels prédits. Obtenu à partir du logiciel Geneious Prime 2019.1.3

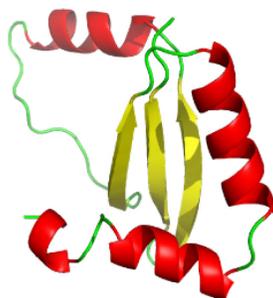


Figure 8 : Structure 3D prédite de GspA

Obtenu à l'aide du logiciel web Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)

1.7.1 Domaine GIY-YIG chez les autres bactéries

Les protéines possédant un domaine GIY-YIG font partie d'une superfamille d'endonucléases. Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes, notamment le clivage de l'ADN, la recombinaison, la réparation de l'ADN, la dégradation de l'ADN exogène, et finalement le maintien de la stabilité génomique (Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006). Les différentes familles de protéines GIY-YIG sont détaillées ci-dessous :

UvrC-like : La famille des UVRC-like est composée d'endonucléases bactériennes et d'archées impliquées dans la réparation de l'ADN. Le domaine GIY-YIG N-terminal clive un côté de l'ADN endommagé, et un autre domaine non apparenté en C-terminal clive l'autre côté (Verhoeven *et al.*, 2000). Les autres membres de cette famille ont différents domaines actifs en C-terminal, mais ont globalement la même fonction.

Slx-1 : Les protéines Slx-1 sont surtout retrouvées chez les eucaryotes et les levures, où elles sont impliquées dans la maintenance de l'ADN ribosomal et la recombinaison. Certains homologues ont également été identifiés chez les procaryotes, où ils sont plutôt associés à la réparation de l'ADN (Aravind & Koonin, 2001).

Éléments Penelope : Les éléments Penelope sont des éléments transposables des eucaryotes codant une transcriptase inverse en plus du domaine GIY-YIG. Ces rétrotransposons sont associés à une dysgénésie chez la drosophile (Evgen'ev & Arkhipova, 2005).

HEases : Les premières protéines découvertes avec un domaine GIY-YIG sont des endonucléases de type « homing » (HEases). Ces nucléases, rencontrées dans tous les domaines de la vie, ont un site de reconnaissance particulièrement large présent en une seule ou quelques copies dans un génome. La coupure qui en résulte est ensuite réparée par la machinerie cellulaire, qui insère alors le gène codant pour la nucléase. Les HEases possèdent en plus de leur domaine GIY-YIG un domaine de liaison à l'ADN (Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006).

REases : Contrairement aux autres familles, les endonucléases de restriction (REases) ne possèdent aucun domaine conservé supplémentaire. Par contre, leur domaine GIY-YIG est allongé par des insertions qui permettent la liaison à des séquences spécifiques d'ADN (Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006). Ces enzymes présentes chez les bactéries et archées servent de moyen de défense contre les bactériophages, en dégradant l'ADN exogène mais pas l'ADN de la bactérie. Les enzymes de restriction servent également d'outils de biologie moléculaire dans une panoplie de procédés. Elles sont couramment utilisées pour manipuler l'ADN, du clonage moléculaire à la cartographie du génome (Roberts, 2005).

COG3680 et COG1833 : Ces deux familles regroupent les protéines GIY-YIG qui n'ont pas encore été caractérisées, provenant des eucaryotes (COG3680) ou des archées (COG1833). Certaines endonucléases hypothétiques des bactéries y sont également retrouvées. En raison de leur homologie à certaines autres protéines bactériennes, ces dernières sont potentiellement associées à la réparation de l'ADN et la virulence (Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006).

Toutes les familles protéiques possédant un domaine GIY-YIG bien étudiées possèdent au minimum un autre domaine fonctionnel qui les associe à leur fonction, à l'exception des REases qui ont une séquence d'insertion plutôt qu'un second domaine. Puisque GspA ne possède qu'un domaine GspA et que celui-ci couvre la quasi-totalité de sa séquence, il pourrait s'agir d'une nouvelle famille d'endonucléase GIY-YIG.

2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La séquence répétée que nous avons mise en évidence est présente en forte abondance dans les génomes des *Neisseria* pathogènes. Elle est distribuée de façon non-aléatoire autour de plusieurs gènes clés, et possède des similarités avec d'autres éléments répétés impliqués dans l'évolution et la pathogénicité de ces bactéries, comme une structure secondaire en tête d'épingle. L'étude de cette séquence a mené à la découverte subséquente d'un gène fortement associé à la RS, encodant pour une protéine hypothétique que nous avons appelée GspA. Cette protéine possède un seul domaine fonctionnel, qui est également retrouvé dans plusieurs endonucléases.

À partir de ces informations, nous avons émis l'hypothèse suivante ; GspA clive l'ADN dans ou à proximité de la RS, ce qui a pour conséquence de réguler l'expression de certains gènes ou encore de moduler la recombinaison homologue de l'ADN exogène. Ce dernier mécanisme suggère une implication dans la réparation de l'ADN, mais pourrait également avoir agir sur la régulation des transferts horizontaux de gènes.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser en détail la protéine GspA ainsi que ses fonctions chez *Neisseria meningitidis*. Les objectifs spécifiques sont de :

1. Vérifier l'activité endonucléase de GspA *in vitro* et tenter de déterminer sa spécificité de reconnaissance et de clivage.
2. Définir le rôle de GspA *in vivo* chez *N. meningitidis* à l'aide de différentes analyses phénotypiques et transcriptomiques.
3. Confirmer expérimentalement le lien prédit *in silico* entre le gène *gspA* et la séquence répétée.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes et milieux de culture

3.1.1 *Neisseria meningitidis*

La souche *N. meningitidis* 8013 (2C4.3) a été utilisée tout au long de ce projet. Celle-ci provient d'un isolat clinique de l'Institut Pasteur de 1989 à partir du sang d'un patient de 57 ans. Elle appartient au sérotype C et fait partie du complexe clonal ST-18, fréquemment associé à des pathologies en Europe (Rusniok *et al.*, 2009). Cette dernière a été utilisée comme souche de référence car son génome entier est séquencé et annoté avec une bonne qualité, et le vaccin accessible au Canada confère une immunité à ce sérotype.

N. meningitidis a été cultivée sur milieu *Gonococcal Medium Base* (GCB, Oxoid), contenant par litre : 15 g de peptone, 1 g d'amidon de maïs, 5 g de chlorure de sodium (NaCl), 4 g d'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4), 1 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et 10 g d'agar. Un milieu identique sans agar a été utilisé pour la culture liquide. Après avoir été autoclavés, ces milieux ont été complétés avec des suppléments Kellogg's (Correia *et al.*, 1988):

- 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 μ m).
- Supplément Kellogg's 2 (1000x) : 50 mg de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ dans 100 ml d'eau. Stérilisé par filtration (filtre de 0.2 μ m).

Des antibiotiques ont également été ajoutés aux milieux aux concentrations indiquées dans le tableau 1. Les incubations de *N. meningitidis* ont été faites à 37°C avec 5% de CO_2 .

3.1.2 *Escherichia coli*

Pour tous les clonages ayant servi à générer les plasmides, la souche *E. coli* DH5 α a été utilisée. Celle-ci a été rendue chimiquement compétente par un protocole standard utilisant un tampon CCMB80 ($CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, acétate de potassium) (Jesse, 2005). Comme vecteur d'expression, la souche *E. coli* BL21(DE3) a été utilisée. *E. coli* a été cultivée sur milieu Luria-Bertani Miller (Miller's LB, Fisher), supplémenté avec le ou les antibiotiques aux concentrations indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Concentrations d'antibiotiques utilisées pour la culture de *E. coli* et de *N. meningitidis*

| Antibiotique | Abréviation | Concentration pour <i>E. coli</i> (µg/ml) | Concentration pour <i>N. meningitidis</i> (µg/ml) |
|---------------------|--------------------|--|--|
| Érythromycine | Ery | 300 | 3 |
| Kanamycine | Km | 50 | 100 |
| Ampicilline | Amp | 100 | |
| Chloramphénicol | Cm | 25 | 5 |
| Spectinomycine | Sp | 50 | 75 |

3.2 Manipulations d'ADN

Toutes les extractions d'ADN plasmidiques ont été réalisées avec le kit Qiaprep Spin Miniprep (QIAGEN) en suivant les recommandations du fournisseur. Les clonages ont été réalisés par la méthode de restriction-ligation en suivant les protocoles des fournisseurs, à l'aide d'enzymes de restriction conventionnelles (NEB) et de la T4 DNA Ligase (NEB).

Pour les PCR, sauf indiqué, de l'ADN génomique total a été extrait à partir du surnageant d'une suspension bactérienne dans de l'eau pure, placée au bain-marie à 95°C 8 minutes puis centrifugée à vitesse maximale pendant 5 minutes. Les quantifications d'ADN ont été obtenues via l'appareil Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Toutes les PCR ayant servi aux différents clonages de ce projet ont été réalisées avec la polymérase Phusion Hi-Fidelity (NEB) en suivant le protocole du fournisseur. La liste des amorces (Sigma) est retrouvée en annexe (tableau S1).

3.3 Génération de mutants de *gspA* dans *N. meningitidis*

Les *Neisseria* sont toutes naturellement compétentes, mais il n'existe pas de plasmide répliquatif utilisé comme outil de biologie moléculaire. Les transformations effectuées sur ces espèces mènent à l'intégration par double recombinaison homologue d'une partie du plasmide directement dans le chromosome de la bactérie. La région intégrée correspond à la partie du plasmide comprenant les régions homologues au génome, ainsi que toute séquence ajoutée entre ces deux régions. Le squelette du plasmide est quant à lui dégradé, de la même façon qu'un plasmide suicide.

Brièvement, pour transformer *Neisseria*, un stock congelé est inoculé sur GCB agar puis incubé une nuit à 37°C avec 5% de CO₂. Le lendemain, quelques colonies sont prélevées et étalées sur une nouvelle gélose GCB. Ensuite, 10 µl d'ADN plasmidique sont déposés

directement au milieu de l'étalement. La gélose est alors incubée à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 6 heures ou jusqu'à l'apparition de croissance visible. La croissance à l'endroit exact où la goutte d'ADN avait été déposée est finalement prélevée et étalée sur une nouvelle gélose GCB contenant l'antibiotique de sélection approprié. Le lendemain, l'identité des colonies transformées ayant poussé sur le milieu sélectif est vérifiée par PCR de colonies avant d'en faire un stock dans du GCB avec 15% de glycérol, qui est entreposé à -80°C.

3.3.1 Délétion de *gspA*

La région génomique contenant le gène *gspA* et ses environs a été amplifiée à partir d'ADN génomique de *N. meningitidis* 2C4.3 extrait via le kit QIAamp (QIAGEN), avec les amorces NMV0044_flank_F et NMV0044_flank_R, puis clonée dans le vecteur pGEM-T-easy (PCR Cloning Kit, Promega). Une partie centrale du gène *gspA* a été enlevée à l'aide des enzymes BsaBI et Aval et le gène de résistance à l'érythromycine, amplifié par les amorces ERAM3 et ERAMup, y a été inséré en utilisant l'enzyme T4 DNA polymérase (NEB) pour générer des bouts francs, formant le plasmide pGEM::NMV0044::Ery (tableau 2). Après linéarisation par EcoRI, Cette construction a finalement été transformée dans *N. meningitidis* 2C4.3 WT pour générer la souche $\Delta gspA$ (KO).

Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés

| Nom du plasmide | Description / Utilisation | Origine |
|--------------------|--|--------------------------------|
| pGEM::NMV0044::Ery | <i>gspA</i> interrompu par l'érythromycine (KO) | Cette recherche |
| pGEM::Km | Vecteur | Promega |
| pOEGspA::Km | <i>gspA</i> sous le contrôle du promoteur fort <i>ppilE</i> (OE) | Cette recherche |
| pGEX::NMV0044 | Vecteur d'expression de <i>gspA</i> taguée au GST, inducible à l'IPTG | Cette recherche |
| pCompInd::Cm | Vecteur d'intégration chez <i>Nm</i> , dans une région intergénique | (Ieva <i>et al.</i> , 2005) |
| pKOYebN::Cm | Vecteur d'intégration chez <i>Nm</i> , remplaçant le gène non essentiel YebN | (Veyrier <i>et al.</i> , 2011) |
| pK18mobSacB | Utilisé comme cible pour l'activité endonucléase de GspA | ATCC87097 |

3.3.2 Surexpression et complémentation de *gspA*

Un plasmide de complémentation préalablement construit a été utilisé (Veyrier F., non publié). Celui-ci s'intègre dans une région intergénique éloignée et contient un promoteur fort (*pilEp*). Il est sélectionné grâce à une cassette de résistance à la kanamycine. Le gène *gspA*, obtenu par PCR avec les amorces GspABspHIF et GspAPstIR, a été digéré par BspHI/PstI et sous-cloné dans ce plasmide digéré par les enzyme NcoI et PstI pour donner pOEGspA::Km. Ce plasmide contenant le gène sous contrôle de *pilEp* a été linéarisé par DraIII et transformé dans *N. meningitidis* WT, générant la souche OE (*N. meningitidis* 2C4.3 *pilEp-gspA*). Cette souche possède donc une copie intacte de *gspA*, en plus d'une copie sous un promoteur fort ailleurs dans le génome.

Pour générer la souche complétementée *N. meningitidis* 2C4.3 Δ *gspA-pilEp-gspA* (Compl), le plasmide précédemment détaillé pOEGspA::Km a été introduit par transformation dans la souche *N. meningitidis* Δ *gspA*. Celle-ci a donc une copie non fonctionnelle de *gspA*, en plus d'une copie fortement exprimée. Elle possède donc à la fois la résistance à l'érythromycine (provenant du plasmide KO) et à la kanamycine (provenant du plasmide OE).

3.4 Expression et purification de la protéine GspA

Le gène *gspA* de *N. meningitidis* 2C4.3 avec son promoteur a été amplifié à l'aide des amorces POEG44F et POE44R, puis a été cloné dans le plasmide d'expression pGEX-4T1 (GE Healthcare), qui couple la protéine à un tag GST (glutathion S-transférase) ainsi qu'un site de clivage par la thrombine. Ce plasmide a ensuite été transformé dans *E.coli* BL21(DE3) pour exprimer la protéine de fusion GST-NMV0044 (GST-GspA).

3.4.1 Induction et lyse

L'expression de GST-GspA a été induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl thiogalactopyranoside) à 0.5 mM dans une culture en phase exponentielle ($DO_{600}=0.6$). Après 16h d'induction à 37°C, la culture a été centrifugée à 3500 g pendant 20min à 4°C, puis resuspendue dans du PBS froid. La lyse a été effectuée par 5 cycles de sonication 15s ON/30s OFF (Branson sonifier 450) dans un bain de glace. Le lysat a par la suite été centrifugé à 21000 rpm pendant 30min à 4°C.

3.4.2 Chromatographie d'affinité

La résine GlutathioneSepharose 4B (GE Healthcare) a été utilisée pour purifier la protéine de fusion GST-GspA grâce à son tag GST. Le lysat cellulaire a été mélangé à 4ml de résine, et le mélange a été incubé avec faible agitation à 4°C pendant 2 heures. La solution a ensuite été transférée dans une colonne de verre, puis le filtrat a été évacué. La résine a ensuite été lavée trois fois avec du PBS, après quoi 5 ml de tampon d'éluion (Tris 50mM, glutathion 10mM pH8) ont été ajoutés. Après 15 minutes d'incubation à température pièce, la première éluion a été récupérée.

La protéine de fusion a été purifiée par dialyse à l'aide d'une membrane présentant un seuil de 8000 Da, qui devrait laisser passer le glutathion mais pas la protéine de fusion. 6 dialyses de 4 à 16 heures chacune ont été réalisées dans un tampon de dialyse (Tris 50mM, NaCl 200mM pH 8), sous agitation à 4°C.

3.4.3 Clivage du tag GST et purification de la protéine non taguée

Étant donné la faible taille attendue de ~11kDa de GspA, la GST a été clivée de la protéine de fusion purifiée par la thrombine, au cas où ce tag affecterait l'activité de la protéine. Le kit Thrombin CleanCleave Kit (Sigma) a été utilisé en suivant ses recommandations. Le clivage a été effectué pendant 48 heures à 4°C. Les protéines libres ont ensuite été purifiées par une seconde chromatographie d'affinité. Celle-ci est identique à la première chromatographie détaillée ci-haut. La protéine a été conservée à -80°C dans du glycérol 10%, ce qui n'a pas affecté significativement son activité à long terme, lorsque comparée à une purification fraîche.

3.5 Études *in vivo*, tests phénotypiques

3.5.1 Courbes de croissance

Des stocks congelés de chaque souche de *N. meningitidis* 2C4.3 (WT, OE, KO et Compl) ont été inoculés sur milieu GCB et incubés 16h à 37°C avec 5% de CO₂. Une suspension de chaque souche a ensuite été préparée à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 0.1 dans du milieu GCB liquide. 2 ml de chacune ont été transférés dans un tube de culture de 12 ml, puis incubés sous agitation (300 rpm) à 37°C sans CO₂. La densité optique a été mesurée toutes les heures pendant 8 heures ou jusqu'à l'atteinte de la phase stationnaire.

3.5.2 Sensibilité au pH, au stress oxydatif, à la mutagenèse et aux métaux

pH : Du milieu GCB agar a été préparé à différents pH allant de 5 à 10 en y ajoutant du HCl ou du NaOH à 5M. Pour chaque souche de *N. meningitidis* testée (WT, OE, KO), une culture provenant d'un stock congelé a été resuspendue à une $DO_{600}=1$, correspondant à $\sim 5 \times 10^8$ cellules/ml. Ensuite, chaque suspension a été diluée en série (1:10) jusqu'à 10^{-7} , avant de déposer une gouttelette de 7.5 μ l de chaque dilution sur les géloses de différents pH. Les géloses ont finalement été incubées jusqu'au lendemain, après quoi le nombre de CFU (unité formant colonie) dans chaque gouttelette a été déterminé. Cette technique de dilution en série et d'inoculation par goutte est référée comme test de spotting dans ce rapport. L'expérience a été réalisée à 4 reprises indépendantes.

Métaux : Des milieux GCB agar ont été préparés avec 25, 50, 100 μ M de différents métaux, soit le zinc ($ZnSO_4$, Sigma), le manganèse ($MnSO_4$, Anachemia), le magnésium ($MgSO_4$, Sigma) et le nickel ($NiSO_4$, Sigma). Un test de spotting a été réalisé sur ces milieux. Le zinc a également été testé à 200, 300, 400 et 500 μ M de la même façon. Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

Mutagenèse physique (UV) : Un test de spotting a été réalisé sur des géloses GCB. Celles-ci ont par la suite été exposées aux UV provenant de la lampe à UV de la hotte biologique pendant 0, 6, 12, 18 et 24 secondes. Après 16 heures d'incubation, le nombre de CFU ayant survécu à la mutagenèse a été calculé. L'expérience a été effectuée à deux reprises indépendantes.

Mutagenèse chimique (EMS) : Des suspensions à $DO_{600}=0.2$ ont été préparées pour chaque souche (*Nm* WT, OE, KO), après quoi de l'éthyl méthanesulfate (EMS, Sigma) à 10% v/v a été ajouté. Ce mélange a été incubé 15, 30 ou 45 minutes à 37°C avant de centrifuger la suspension 2 minutes à 9000 rpm et de procéder à deux lavages avec du PBS. Le culot cellulaire a finalement été resuspendu dans du milieu GCB liquide, et un test de spotting a été réalisé sur milieu GCB. L'expérience a été réalisée à deux reprises indépendantes.

Stress oxydatif : La méthode d'inhibition de disque a été utilisée pour déterminer la sensibilité au stress oxydatif des mutants de *gspA*. Pour ce faire, des cultures de chaque souche ont été resuspendues dans du GCB liquide à $DO_{600} = 0.3$, puis étalées sur des géloses GCB. Des disques de papier Whatman de 6 mm ont ensuite été imbibés avec 10 μ l de peroxyde d'hydrogène à 500 mM (H_2O_2 , Sigma), ou de paraquat à 100 mM ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$, Sigma). Les disques ont été déposés sur la géloseensemencée, et ceux-ci ont été incubés 16h à 37°C. L'expérience a été réalisée en triplicata. Les disques d'inhibitions ont par la suite été mesurés à la règle.

3.5.3 Morphologie et piliation : Microscopie électronique à transmission (TEM)

1 ml de suspensions à $DO_{600}=0.5$ a été préparé pour chaque souche (*Nm* WT, OE, KO, Compl) dans du GCB liquide et transféré dans une plaque de culture cellulaire non traitée à 12 puits, contenant des grilles de cuivre pour le TEM (formvar/carbone 200 mesh, TEDPELL). La plaque a ensuite été incubée 6 heures à 37°C sans agitation pour permettre aux bactéries d'y pousser et de développer leur pili. Les cellules ont par la suite été fixées pendant 16 h en y ajoutant une solution à 2.5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate 0.05 M. 3 lavages de 30 minutes chacun ont ensuite été réalisés avec du tampon cacodylate à 0.05 M supplémenté de 3% de saccharose. Finalement, les grilles ont été contre-colorées à l'acide phosphotungstique (PTA) 1 % pendant 15 secondes. Cette coloration excessive diminue la qualité de l'image des cellules, mais augmente le contraste de leur pili qui sont autrement difficiles à distinguer. L'expérience a été réalisée à deux reprises indépendantes, et des images représentatives de chaque souche sont présentées, à l'exception de la souche complémentée qui présentait un bruit de fond trop fort pour y distinguer des pili.

3.6 Études *in vitro*

3.6.1 RT-qPCR

Extraction d'ARN : Les quatre souches de *N. meningitidis* (WT, *gspA* OE, KO, Compl) ont été cultivées en triplicatas sur milieu gélosé à partir d'un stock glycérol congelé. La croissance a par la suite été étalée sur de nouveaux milieux GCB, puis incubée 6 heures à 37°C avec 5% de CO₂. L'ARN a ensuite été extrait à l'aide du kit Qiagen RNeasy Mini kit en suivant le protocole du fournisseur.

Transcription inverse (RT) : 1 µg d'ARN de chaque échantillon a été dilué dans 19 µl d'eau, avant d'être incubé 10 minutes à 55°C. 1 µl de DNase I Amp grade (Invitrogen) et 2 µl du tampon fourni avec l'enzyme ont ensuite été ajoutés à chaque tube. Le mélange a par la suite été incubé 30 minutes à 37°C, puis 10 minutes à 75°C, après quoi 2 µl de Random Primers (Invitrogen) ont été ajoutés. Le tout a ensuite été incubé 10 minutes à 85°C. La réaction de transcription inverse (RT) a par la suite été réalisée à l'aide de l'enzyme RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo) en suivant le protocole du fournisseur. Un contrôle sans RT a été utilisé pour déterminer si l'extraction d'ARN était exempte d'ADN génomique contaminant.

qPCR : Les qPCR ont été réalisées à partir de 10 ng d'ADNc dans un volume final de 10 µl avec le kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo) dans le thermocycleur StepOne Plus (Applied

Biosystems) en suivant les recommandations du fournisseur. L'endogène de référence utilisé est *gyrA* (Gomes et al., 2018). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau en annexe. Les valeurs de fold change ont été calculées par la méthode des $\Delta\Delta CT$ (Livak & Schmittgen, 2001). Les moyennes et écarts-types ont été obtenus de triplicatas biologiques provenant d'extraction d'ARN indépendantes.

3.6.2 Tests d'activité endonucléase

Sur des plasmides entiers

L'activité endonucléase de la protéine purifiée GspA a été évaluée sur plusieurs plasmides entiers ; pCompInd, pKOYebN, pGEM::NMV0044, pGEM, pOEGspA, et pK18mobSacB. Pour ce faire, environ 100 ng de chaque plasmide ont été incubés pendant 2 heures avec différentes concentrations de la protéine GspA dans 20 μ l de tampon NEBuffer 3.1 1x (concentrations finales de 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA), dans lequel de nombreuses enzymes commerciales ont une activité endonucléase optimale. Le mélange a ensuite été migré sur un gel d'agarose à 1% en présence de GelStain (Biotium) pour visualiser les différentes conformations des plasmides. La révélation du gel a été réalisée par l'appareil GelDoc XR (BioRad) avec les paramètres par défaut.

Comme contrôle, la protéine a été inactivée à 95°C pendant 10 minutes avant d'être ajoutée au plasmide. Dans un autre contrôle, 20 unités de Sall, une enzyme de restriction qui coupe les deux brins d'ADN à un seul endroit du plasmide pCompInd, ont été ajoutées au lieu de GspA pour linéariser complètement ce plasmide. Pour évaluer la nécessité en magnésium de la réaction d'endonucléase, du tampon identique au NEBuffer 3.1 a été préparé sans magnésium, et différentes concentrations de MgCl₂ y ont été ajoutées. Chaque expérience a été réalisée à plusieurs reprises de façon indépendante, et des résultats représentatifs sont présentés.

Sur des fragments d'ADN

Pour identifier plus précisément l'endroit où GspA coupe dans le plasmide pGEM::Km, 12 fragments de ~500 pb de ce plasmide couvrant toute sa séquence ont été amplifiés par PCR avec une polymérase Phusion (NEB), puis purifiés (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Ensuite, les terminaisons 5' de ces produits ont été radiomarquées par la T4 polynucleotide kinase (Epicentre) dans un volume de 10 μ l contenant 100 nM d'oligonucléotides, 1x de tampon PNK (Promega), 0.2 μ l d'enzyme et 1 μ l de γ -³²P ATP. Cette réaction a été incubée pendant 30 minutes à 37°C, puis stoppée par inactivation 5 minutes à 70°C. Chaque fragment marqué a ensuite été

mélangé à 1x de tampon NEBuffer 3.1 et à la protéine purifiée GspA, comme décrit dans la section précédente. Comme contrôle, les fragments de PCR 1 et 4 ont également été mis en contact avec une quantité saturante de l'enzyme de type « nicking » Nt.BsmAI (NEB), qui possède un seul site de reconnaissance dans le fragment 4 (contrôle positif), et aucun dans le fragment 1 (contrôle négatif). Après l'ajout de tampon de chargement au formamide, les échantillons ont été chauffés à 95°C et immédiatement refroidis sur glace pour dénaturer les deux brins d'ADN. Ceux-ci ont par la suite été migrés sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 8% (urée 8M) aux côtés de marqueurs de taille. Le gel a finalement été séché sur un Gel Dryer 583 (BioRad), puis exposé 16h dans une cassette au phosphore avant d'être imagé par un Typhoon FL9500 (Amersham).

Une expérience similaire a été réalisée avec d'autres potentielles cibles de l'activité endonucléase de GspA ; un produit de PCR provenant d'une région de *N. meningitidis* MC58 (séro groupe B) contenant une copie de la séquences répétées (amorces sRNABiotF et sRNAR), et un autre produit contenant également plusieurs RS mais cette fois provenant de *N. meningitidis* 2C4.3 (amorces RS_gspA_2C4.3_F/R). Ici, les amorces étaient préalablement radiomarquées, donnant lieu à des produits de PCR marqués au ³²P.

3.7 Tests de transformation

La compétence naturelle des mutants de *N. meningitidis* a été évaluée de façon quantitative par des transformations en milieu liquide avec deux plasmides. pComplnd d'abord, qui ne possède aucune copie de la RS et s'intègre dans une région intergénique (Ieva *et al.*, 2005). pKOYebN quant à lui, possède plusieurs copies de la RS, et s'intègre à la place du gène *yebN*. La protéine YebN étant associée au transport du manganèse (Veyrier *et al.*, 2011), sa délétion n'a aucun effet en conditions de croissance normales.

Pour chaque test, le plasmide a préalablement été linéarisé par une enzyme de restriction. Puis, 100 ng ont été ajoutés à 100 µl de suspension de chaque souche de *N. meningitidis* (WT, OE, KO, Compl) à $DO_{600}=1$ en triplicatas. Du $MgSO_4$ a également été ajouté à chaque réaction à une concentration finale de 10 mM afin de favoriser l'import d'ADN. Les réactions ont par la suite été incubées 3 heures à 37°C, après quoi elles ont été diluées en série dans du milieu GCB liquide. Enfin, 30 µl de chaque dilution ont été étalés sur GCB agar avec l'antibiotique approprié et incubés 20 heures pour permettre le décompte de CFU transformées. Pour obtenir le nombre de CFU totales de chaque réaction, 30 µl de chaque dilution ont également été étalés sur milieu GCB agar sans antibiotique. Les ratios CFU transformées / 10^6 CFU totales ont par la suite été calculés. Chaque expérience a été réalisée à au moins trois reprises indépendantes en triplicatas. La moyenne et l'écart-type sont présentés. Des *one-way ANOVA* avec des comparaisons multiples de Tukey ont été utilisés pour l'analyse statistique via le logiciel Graphpad Prism 7.00.

4 RÉSULTATS

4.1 Activité endonucléase de GspA *in vitro*

4.1.1 Digestion de plasmides entiers

En premier lieu, nous avons voulu vérifier si la protéine GspA possède une activité endonucléase *in vitro*, tel que prédit par son unique domaine fonctionnel GIY-YIG. Suite à la purification de la protéine, son activité endonucléase a été évaluée en l'incubant présence de différents plasmides circulaires, et en comparant les conformations de ces plasmides avant et après l'ajout de GspA par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 9). Plusieurs conditions ont été testées, à commencer par la concentration de GspA nécessaire au clivage de l'ADN plasmidique. En l'absence ou en concentration très faible de GspA, le plasmide est retrouvé majoritairement sous la forme surenroulée. La forme circulaire relâchée (*nicked*) ainsi que linéaire sont également présents, mais en faible quantité relative. Ce profil de migration est typique pour un plasmide extrait par un kit sur colonne. En effet, la conformation native d'un plasmide est la forme surenroulée, mais quelques copies dégradées ont plutôt une forme linéaire (cassure double-brin) ou encore différentes formes circulaires relâchées (cassures d'un seul brin, plusieurs bandes de cette conformation peuvent être observées selon le nombre de cassures).

La conformation circulaire relâchée augmente par rapport à la forme surenroulée suite à l'ajout d'au moins 1.32 μM de GspA, signifiant que cette protéine clive un seul brin d'ADN (figure 9A). Cet effet est maximal avec 5.28 μM de GspA. Si l'enzyme est inactivée à la chaleur avant l'incubation avec le plasmide, cette activité endonucléase est perdue.

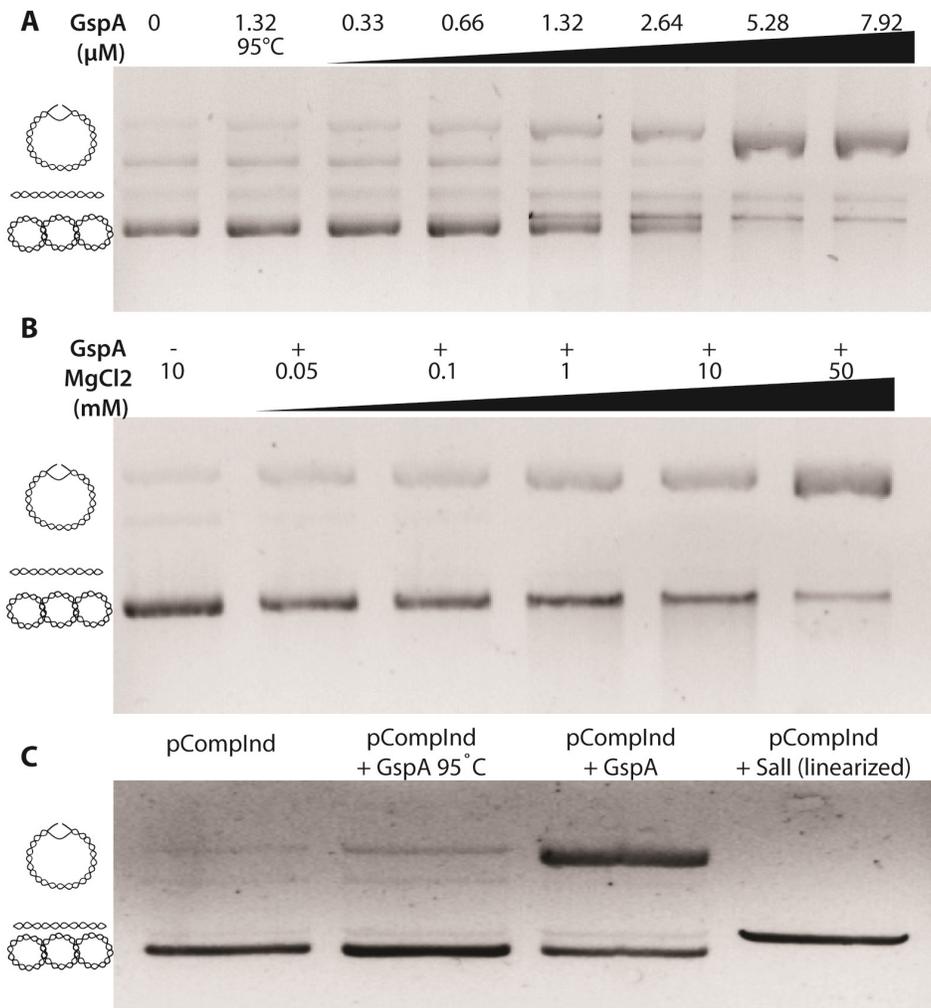


Figure 9 : GspA est une endonucléase de type nicking magnésium dépendante

- Effet de la protéine purifiée GspA sur le plasmide entier (surenroulé) pGEM::NMV0044.
- Effet de la concentration en magnésium sur l'activité endonucléase de GspA. Le plasmide pGEM::NMV0044 a été utilisé. Lorsqu'indiqué, 5.28 μM de protéine a été utilisé.
- Vérification du type de coupure causée par GspA sur le plasmide pComplnd. Lorsqu'indiqué, 5.28 μM de protéine a été utilisé. 20 U de Sall ont été ajoutés au dernier puit pour linéariser le plasmide.

Les pictogrammes à gauche représentent les conformations possibles du plasmide, soit de haut en bas ; circulaire relâché (*nicked*), linéaire et surenroulé. La condition GspA+95°C signifie que la protéine a été inactivée à la chaleur avant l'incubation avec le plasmide. Les images montrées sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes.

Puisqu'un site de liaison à un métal a été prédit par bio-informatique dans le domaine fonctionnel GIY-YIG de GspA, la nécessité d'un cofacteur pour l'activité endonucléase de cette protéine a été évaluée. Plusieurs métaux ont été testés : calcium, potassium, zinc, manganèse, nickel, cuivre et magnésium. Ces métaux sont tous des cations divalents nécessaires à l'activité de plusieurs enzymes bactériennes (Vashishtha *et al.*, 2016). Une faible activité endonucléase a été observée en présence de nickel et de manganèse. Cette activité était maximale en présence

de magnésium. Cependant, aucune activité n'a été associée au zinc, cuivre et calcium (données non montrées). Différentes concentrations en magnésium ont donc été testées (figure 9B). 50mM de Mg^{2+} sont nécessaires à une dégradation significative de plasmide surenroulé par GspA, mais la digestion n'est pas complète. Une concentration supérieure n'a pas été testée. Plusieurs temps d'incubations ont également été testés. 2 heures étaient suffisantes pour une digestion maximale du plasmide surenroulé, et prolonger l'incubation jusqu'à 24 heures n'a pas augmenté davantage cette activité (données non montrées).

Finalement, une expérience complémentaire a été réalisée pour confirmer que la digestion par GspA se traduit bel et bien par de l'ADN circulaire relâché et non de l'ADN linéaire (figure 9C). Pour ce faire, un contrôle supplémentaire a été ajouté dans lequel le plasmide est digéré par une enzyme de restriction commerciale qui clive les deux brins d'ADN à un site unique, ce qui linéarise ce dernier. Dans cette condition, la bande correspondant à l'ADN linéarisé migre plus loin que la bande obtenue par la digestion avec GspA, ce qui confirme que GspA ne clive qu'un brin d'ADN.

Afin d'orienter nos recherches sur la spécificité des coupures simple-brin occasionnées par GspA, des expériences similaires ont été reproduites avec de nombreux plasmides différents, dont certains avec plusieurs copies de la séquence répétée et d'autres sans ; pGEM, pOEgspA, pGEX::NMV0044, pK18mobSacB, pKOTriad. Dans nos conditions, peu importe le plasmide utilisé, l'ajout de GspA se traduit toujours par une augmentation significative de la forme circulaire relâchée. Cette digestion n'est par contre jamais complète puisqu'il reste toujours un peu de la conformation surenroulée (données non montrées).

4.1.2 Digestion de produits de PCR

Toujours dans l'optique de définir la spécificité de coupure de la protéine GspA, des fragments d'ADN linéaires plus petits ont également été mis en présence de celle-ci. Pour vérifier leur digestion, une technique plus sensible que l'électrophorèse sur gel d'agarose a dû être utilisée. Les fragments d'ADN ont d'abord été marqués avec l'isotope radioactif ^{32}P avant d'y ajouter GspA. Ensuite, le mélange ADN-GspA a été migré sur gel de polyacrylamide, qui offre une meilleure résolution que l'agarose (figure 10). L'utilisation de la radioactivité permet de détecter des fragments d'ADN présents en très faible quantité, dans le cas où la coupure par GspA n'est pas systématique.

Puisque GspA montrait une bonne activité endonucléase de type *nicking* sur le plasmide pGEM::Km entier (données non montrées), ce dernier a été divisé en 12 fragments se

chevauchant, d'environ 500 pb, par différentes réactions de PCR. Il est important de noter que ce plasmide ne contient aucune copie de la séquence répétée. La protéine purifiée GspA a ensuite été ajoutée à chacun de ces fragments radiomarqués, avant de procéder à l'électrophorèse (figure 10A). Comme contrôle, une enzyme de restriction commerciale de type *nicking* a été ajoutée au fragment de PCR #1 et #4. Celle-ci possède un site unique de clivage dans le fragment 4 (contrôle positif), et aucun dans le fragment 1 (contrôle négatif). Effectivement, suite à l'ajout de cette enzyme au fragment #4, on observe l'apparition d'une bande à environ 130 pb, alors qu'aucune différence n'est visible dans le fragment #1. Dans ces conditions, l'ajout de GspA aux fragments de pGEM::Km n'entraîne pas le clivage de ces derniers, puisqu'aucune nouvelle bande n'apparaît en présence de la protéine. Cependant, les fragments #10 à 12 sont difficilement analysables en raison d'artéfacts au niveau du gel.

Afin de vérifier l'hypothèse comme quoi GspA aurait peut-être un site de reconnaissance ou de clivage au niveau de la séquence répétée, l'expérience a été répétée en utilisant des fragments d'ADN radiomarqués contenant une ou plusieurs copies de cette RS (figure 10B et C). À partir d'un produit de PCR de la souche *N. meningitidis* MC58 (1x RS), l'ajout de GspA se traduit par l'apparition d'une bande nette d'ADN de faible poids moléculaire (figure 10B). Cette bande indique que GspA coupe à un endroit de cet ADN. En utilisant un autre produit de PCR provenant de la souche 2C4.3 de *N. meningitidis* (4x RS), un résultat similaire est observé (figure 10C).

En résumé, une activité endonucléase de type *nicking* a été confirmée chez la protéine purifiée GspA *in vitro*. Celle-ci clive un seul brin d'ADN dans une variété de plasmides surenroulés, indépendamment de la présence de la séquence répétée. Sur des produits de PCR radiomarqués (non-surenroulés), une même activité a été observée uniquement lorsqu'ils contiennent la RS.

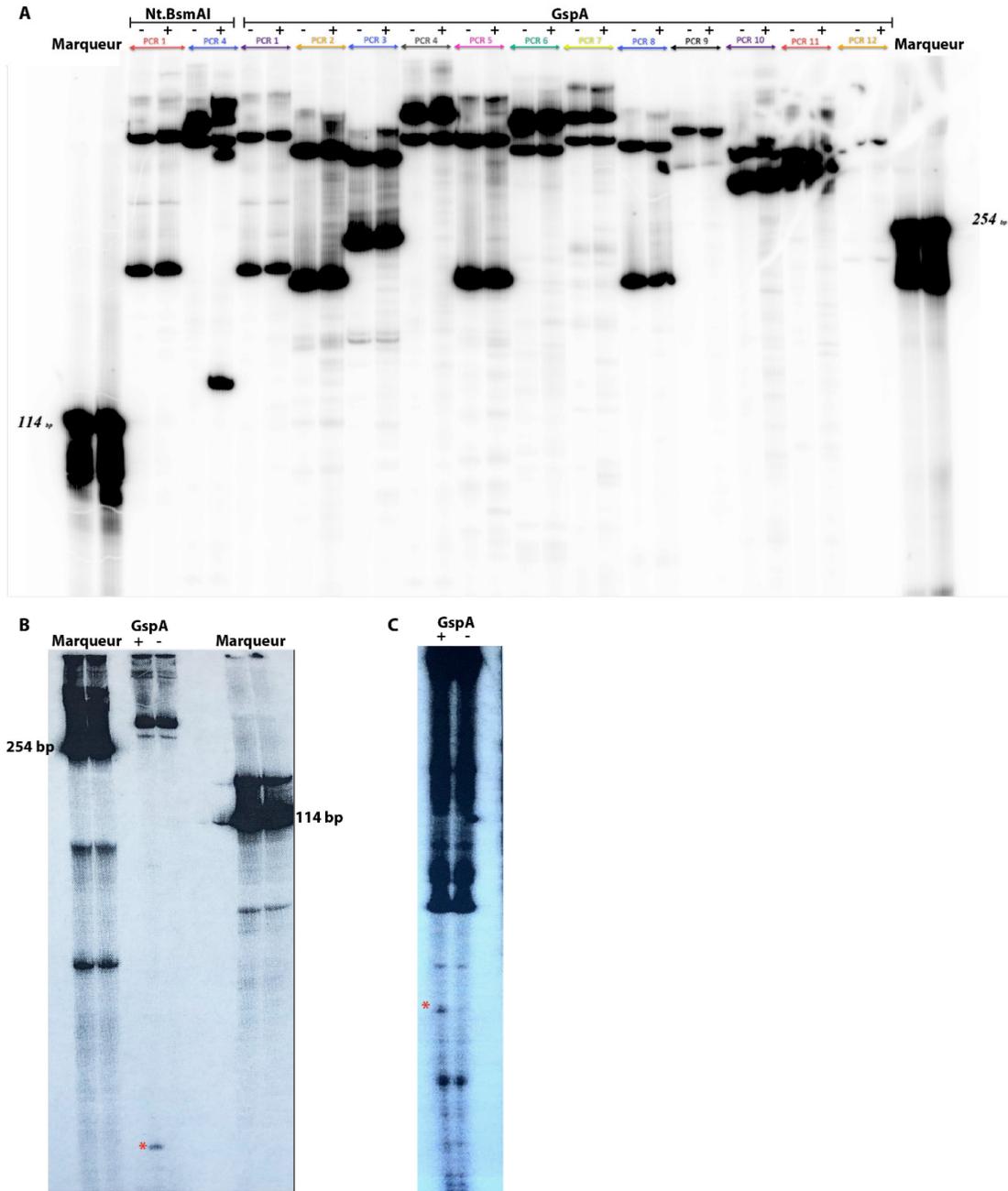


Figure 10 : Recherche de la spécificité du clivage de GspA par cartographie d'ADN radiomarqué

- Le plasmide pGEM::Km, qui ne contient pas la séquence répétée, a divisé par PCR en 12 fragments, qui ont ensuite été radiomarqués en 5', puis incubés avec ou sans GspA. L'ADN a ensuite été dénaturé avant d'être analysé sur gel d'acrylamide. Nt.BsmAI est une nickase qui possède un site de reconnaissance dans le fragment PCR4, mais pas dans le fragment PCR1. Le gel a été surexposé pour révéler les fragments d'ADN présents en faible abondance. Les colonnes extérieures représentent des marqueurs de taille.
- La même expérience a été réalisée, cette fois sur un produit de PCR provenant d'une région d'ADN génomique de la souche *N. meningitidis* MC58 contenant une copie de la séquence répétée. L'astérisque rouge indique un fragment obtenu uniquement en présence de GspA.
- Même expérience, sur un produit de PCR d'une région de la souche *N. meningitidis* 2C4.3 contenant plusieurs copies de la RS. Le gel a été surexposé pour montrer les fragments présents en faible quantité. L'astérisque rouge indique un fragment obtenu uniquement avec GspA.

4.2 Études phénotypiques de GspA *in vivo*

Puisque l'activité endonucléase de GspA a été confirmée *in vitro*, nous avons voulu étudier l'impact de cette protéine sur différents processus physiologiques de la bactérie *N. meningitidis*. Pour ce faire, plusieurs mutants de la souche *N. meningitidis* 2C4.3 ont été créés. Dans un premier mutant, le gène *gspA* a été inactivé par l'insertion d'un gène de résistance à l'érythromycine : **GspA KO** ($\Delta gspA$). Dans un second, un promoteur fort a été associé au gène *gspA* et réintroduit ailleurs dans la bactérie, menant à une surexpression de la protéine GspA : **GspA OE** (overexpressed, *pilEp-gspA*). Finalement, un troisième mutant a été créé, dans lequel *gspA* a d'abord été inactivé, puis réintroduit ailleurs sous un promoteur fort. Cette souche, appelée **GspA Compl** (complémenté, $\Delta gspA$ -*pilEp-gspA*), permet de s'assurer que tout phénotype observé dans le mutant KO est dû à l'absence d'expression du gène *gspA* et non aux manipulations génétiques que cette souche a subies. Pour vérifier la surexpression, la délétion et la complémentation de *gspA* dans ces mutants, leur ARN a été extrait et une RT-qPCR a été réalisée contre le transcrite codant pour GspA (figure S1). Les souches KO et Compl expriment environ 70 fois plus la protéine GspA par rapport à la souche sauvage (WT), tandis que la souche KO en exprime une quantité indétectable. Ces résultats suggèrent que les mutants générés sont de outils adéquats pour étudier les fonctions biologiques de GspA.

Étant donné que GspA n'était qu'une protéine hypothétique avant cette étude et qu'elle ne possède qu'une faible homologie avec d'autres protéines mieux caractérisées, plusieurs tests phénotypiques ont dû être réalisés sur les quatre souches (WT, OE, KO, Compl) afin de trouver les fonctions potentielles de cette nouvelle protéine. L'ensemble des expériences où aucune différence significative n'a été observée entre ces mutants est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3 : Récapitulatif des phénotypes testés où GspA ne semble pas avoir d'implication

| Phénotype testé | Méthodes utilisées | Conditions testées |
|--------------------------------------|---|---|
| Croissance | Croissance en milieu liquide (DO600) | Avec ou sans CO ₂ , avec ou sans agitation |
| | Croissance en milieu solide (CFU, test de spotting) | |
| Sensibilité au pH | Croissance en milieu solide (CFU, test de spotting) | pH 5-10 |
| Résistance au stress oxydatif | Disque d'inhibition | H ₂ O ₂ , tBOOH, paraquat |
| | Croissance en milieu solide (CFU, test de spotting) | |
| | Croissance en milieu liquide (DO600) | |
| Résistance à la mutagenèse | Mutagenèse physique | UV |
| | Mutagenèse chimique | EMS |
| Sensibilité aux métaux | Disque d'inhibition | Manganèse, fer, cobalt, magnésium, zinc, nickel, cuivre, cadmium et aluminium |
| | Croissance en milieu solide (CFU, test de spotting) | |
| | Croissance en milieu liquide (DO600) | |
| Morphologie et piliation | Microscopie électronique à transmission | Milieu liquide riche (GCB) |

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, tBOOH : t-butylhydroperoxyde, UV : ultraviolets, EMS : éthyle méthanesulfonate, DO600 : Absorbance mesurée à une longueur d'onde de 600 nm.

4.2.1 Tests de croissance

En premier lieu, l'impact de l'expression de *gspA* sur la croissance de *N. meningitidis* en milieu optimal a été évalué (figure 11). Cette expérience était nécessaire avant tout autre test phénotypique, car la majorité de ces derniers implique la croissance de suspensions bactériennes et le dénombrement des unités formant colonie (CFU). Une différence de croissance entre les souches en conditions normales aurait donc biaisé tout test ultérieur. Pour monitorer la croissance des bactéries en milieu liquide sous agitation, la densité optique a été mesurée périodiquement. On observe pour chaque mutant une courbe correspondant aux trois phases de croissances ; phase latente, phase exponentielle et phase stationnaire. Les quatre courbes se superposent précisément, indiquant qu'aucune différence de croissance significative n'est associée à la mutation de *gspA*. Chaque culture entre en phase exponentielle après une heure d'incubation

lors de laquelle le temps de génération est de 20 minutes, et atteint un plateau dès la quatrième heure. Puisque la densité optique reflète la quantité totale de cellules, mortes comme vivantes, on n'observe pas de phase de déclin suite à une incubation prolongée (données non montrées). Dans ces conditions, on peut en conclure que GspA n'est pas une protéine essentielle à la bactérie.

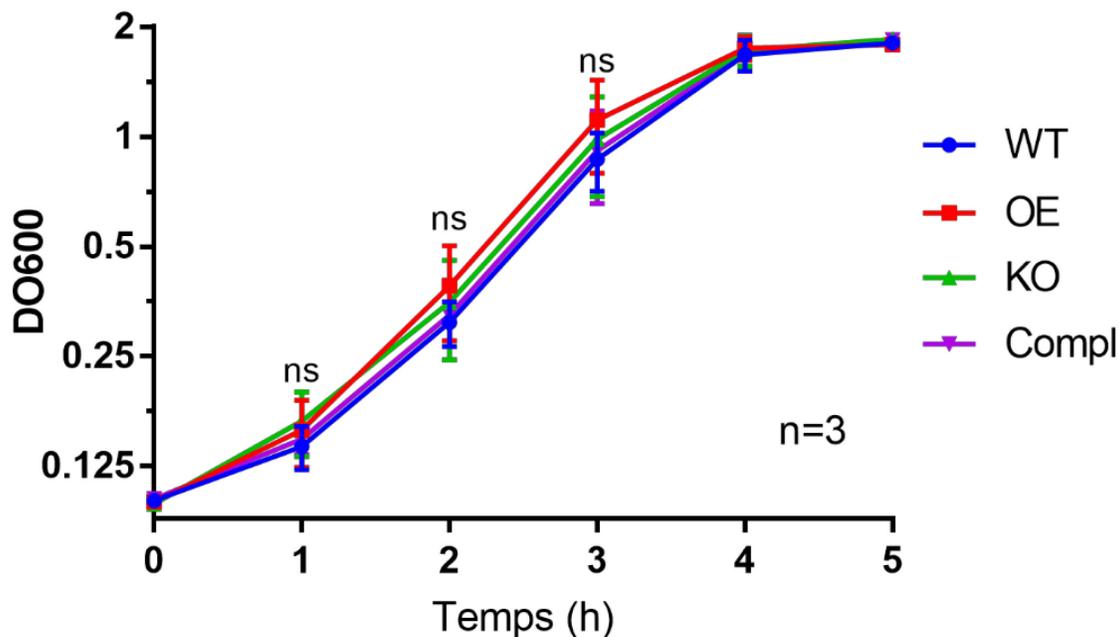


Figure 11 : Croissance en milieu liquide des différents mutants de GspA
L'expérience a été répétée trois fois de façons indépendantes. Les moyennes et écarts-types sont présentés.

4.2.2 Sensibilité au pH, au stress oxydatif, à la mutagenèse et aux métaux

Puisque la surexpression ou la délétion de GspA n'entraîne pas d'avantage ou de déficit de croissance en conditions optimales, nous avons voulu évaluer la croissance des quatre souches lorsque celles-ci sont soumises à différentes conditions et stress. Une différence de croissance entre les mutants pour une condition donnée serait un bon indicateur de la fonction biologique de GspA.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour étudier différents stress, soit la mesure de la densité optique, le décompte de CFU, l'inhibition de disque ou encore le test de spotting. Ce dernier a l'avantage de pouvoir cribler de nombreuses conditions de façon rapide. Il a été utilisé pour évaluer notamment la sensibilité des mutants au pH ainsi qu'à de fortes concentrations de différents métaux (tableau 3). Aucun mutant ne s'est démarqué des autres souches lors de ces tests, signifiant que GspA n'a probablement pas de fonctions associées à l'homéostasie des métaux ou au transport de protons (données non-montrées).

Pour écarter la possibilité que GspA soit impliquée dans la réponse au stress oxydatif, la technique d'inhibition de disque a été utilisée (figure 12). 2 agents oxydants ont été testés sur les différents mutants de GspA ; le peroxyde d'hydrogène (500 mM H₂O₂) et le paraquat (100 mM). Dans les deux cas, la zone d'inhibition de chaque souche est identique. Dans ces conditions, GspA n'a aucune fonction évidente dans la réponse au stress oxydatif.

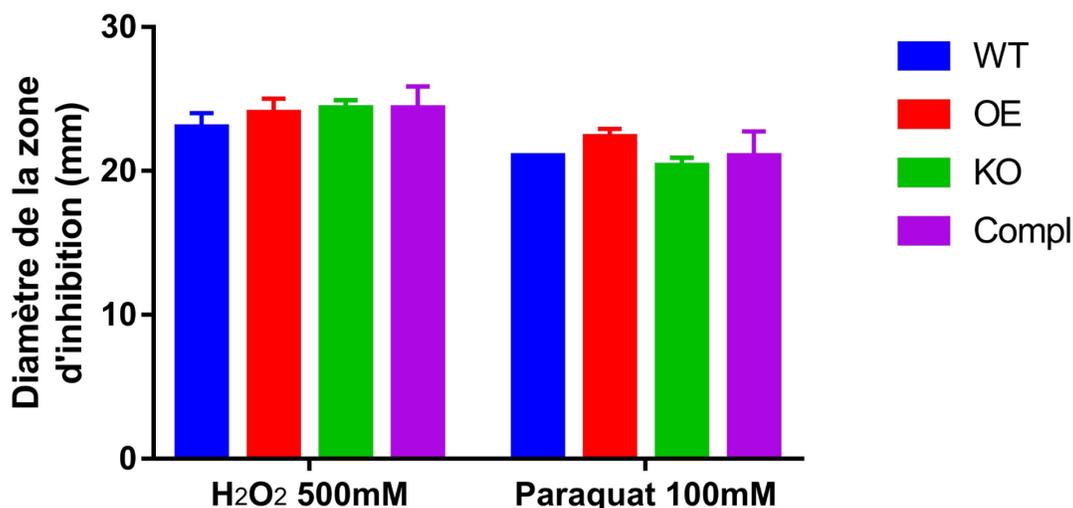


Figure 12 : Sensibilité au stress oxydatif des différents mutants de GspA

La technique d'inhibition de disque a été utilisée. La moyenne et l'écart-type de 3 répliques sont affichés. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

Le potentiel rôle de GspA dans la réparation de l'ADN a également été évalué. Chaque souche a été soumise à deux types de mutagenèse. La mutagenèse physique d'abord, a été réalisée en exposant des géloses fraîchementensemencées à des rayons ultraviolets, qui causent des mutations aléatoires dans le génome de la bactérie. Quant à elle, la mutagenèse chimique a été réalisée par exposition à l'éthyle méthanesulfonate (EMS), qui cause des mutations ponctuelles menant à des substitutions de nucléotides. Dans les deux cas, le taux de survie des bactéries n'était pas significativement différent entre les mutants, suggérant que GspA n'aide pas à la réparation de ce genre de dommages à l'ADN (données non-montrées).

4.2.3 Morphologie et piliation des mutants de *gspA*

Puisque le gène *gspA* se trouve à proximité immédiate de gènes codants pour les pili dans *N. meningitidis* 2C4.3 et que la séquence répétée est souvent retrouvée près de ces gènes, la piliation des mutants de GspA a été évaluée par microscopie électronique à transmission, de même que leur morphologie cellulaire (figure 13). Puisque le bruit de fond des images provenant de la souche complémentée était trop fort pour y distinguer des pili, cette souche est exclue de cette analyse et devra être réimagée. Pour les trois autres souches (WT, OE, KO), la morphologie

caractéristique des *Neisseria* pathogènes a été observée, soit des diplocoques à surface rugueuse. Aucune différence n'a été constatée par rapport à la taille des cellules. Plusieurs pili ont pu être observés dans chaque mutant. Leur nombre et longueur n'ont pas été évalués en raison du faible nombre de cellules analysables, mais aucune différence flagrante n'a été constatée entre ces mutants. GspA ne semble donc pas avoir d'effet observable sur la piliation des cellules.

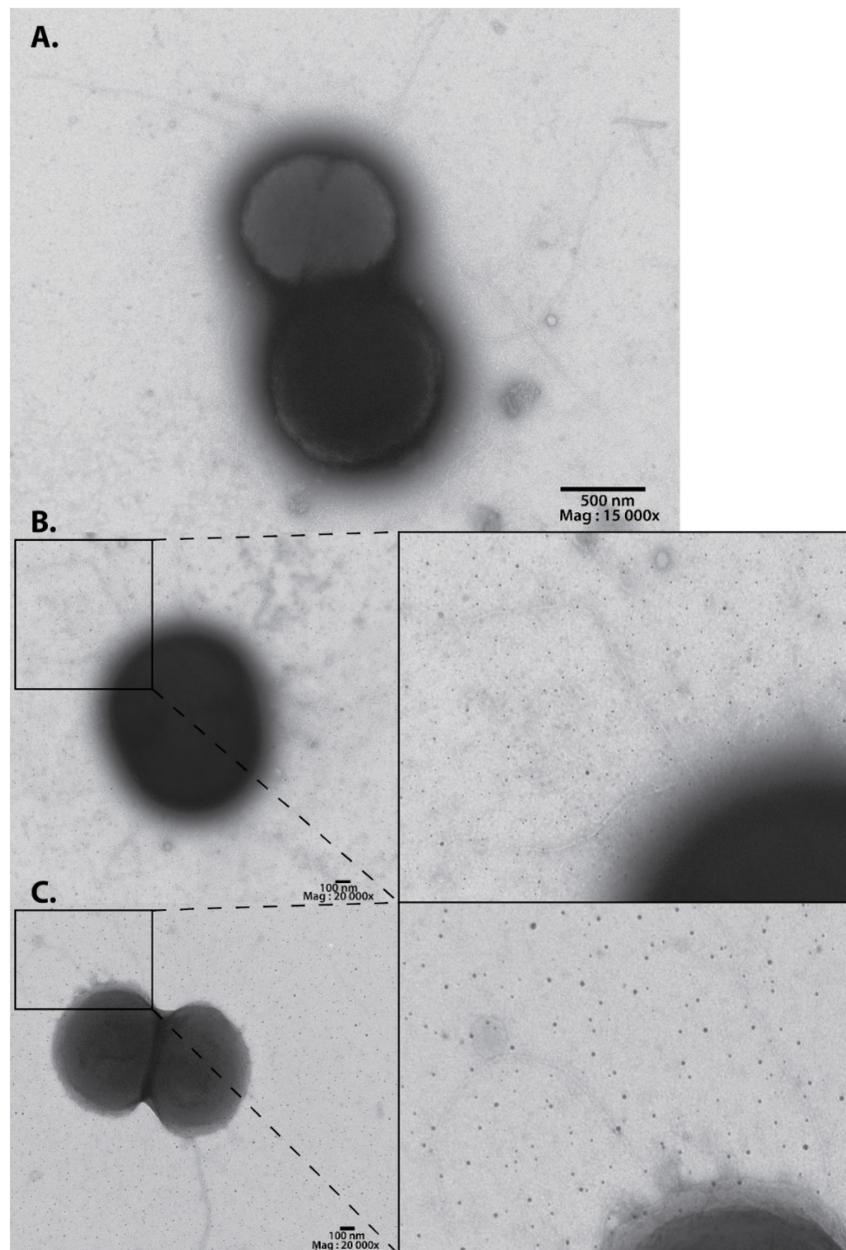


Figure 13 : Piliation des mutants de GspA chez *N. meningitidis*

A. Souche WT B. Souche OE C. Souche KO

Les images ont été obtenues en microscopie électronique à transmission aux grossissements indiqués. Des cellules représentatives de deux expériences indépendantes sont montrées. Les panneaux de droite représentent un zoom sur les panneaux de gauche. Le focus a été fait sur les pili plutôt que sur la bactérie.

4.3 Études transcriptomiques

En plus de la recherche de phénotypes associés aux mutations de GspA, l'hypothèse comme quoi cette protéine pourrait être un régulateur transcriptionnel a été vérifiée. Pour ce faire, l'ARN des souches WT, OE et KO a été extrait, et des RT-qPCR ont été réalisées sur différentes cibles (figure 14). La souche Compl n'ayant pas encore été créée à cette étape du projet, le transcriptome de celle-ci n'a pas été évalué. Deux stratégies ont été utilisées pour déterminer des cibles potentielles de GspA. La première cible l'expression de gènes entourés de nombreuses copies de la séquence répétée. La seconde cible quant à elle les gènes situés à proximité immédiate du gène *gspA*. Aucune différence significative entre les 3 souches n'a été trouvée pour une cible donnée, à l'exception de *lldA*. Les écarts-types sont cependant assez grands, probablement en raison de la variabilité intrinsèque des *Neisseria* ou d'une transcription inverse sous-optimale. Une surexpression de NMV0034 et NMV1689, deux protéines hypothétiques, semble être associée à la souche KO. Cependant, l'inverse n'est pas observé dans la souche OE, donc ce résultat aurait besoin d'être confirmé à l'aide de la souche complétée. Le transcrite correspondant à la L-lactate déshydrogénase (*LldA*) est significativement surexprimé dans la souche OE et sous-exprimé dans la souche KO. Cette protéine est impliquée, mais non nécessaire, dans l'utilisation du L-lactate comme source de carbone (Erwin & Gotschlich, 1996). Selon ces résultats, GspA ne semble pas être un important régulateur transcriptionnel. Une analyse plus large comme du séquençage d'ARNm pourrait confirmer cela.

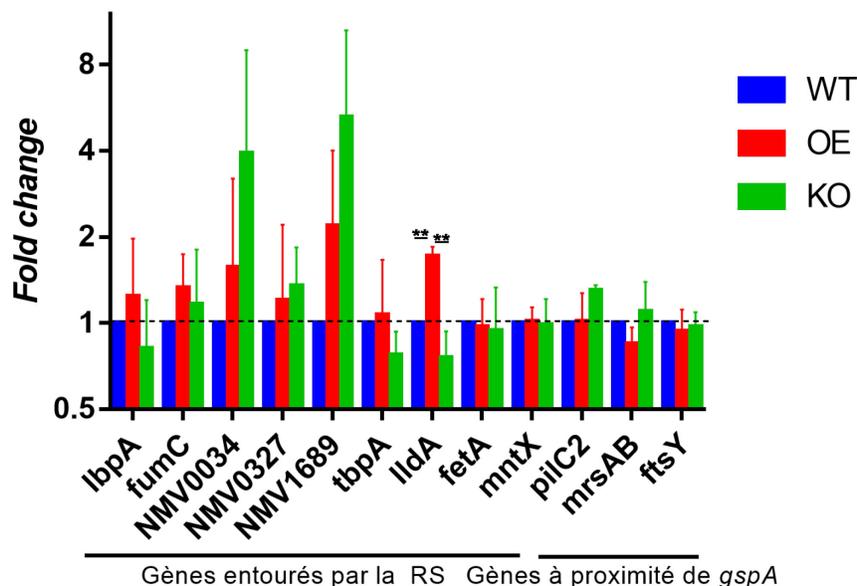


Figure 14 : Expression relative de gènes associés à la séquence répétée ou à *gspA*

Les moyennes et écarts-types de 3 répliques biologiques provenant d'extractions d'ARN différentes sont présentés. La ligne pointillée indique l'expression basale de la souche WT, établie à 1. L'échelle est en base logarithmique. L'analyse statistique a été réalisée par des tests de Student non-pairés. ** : p-valeur ≤ 0.01 .

4.4 Implication de GspA dans la compétence naturelle de *N. meningitidis*

Les éléments répétés sont souvent impliqués dans le transfert horizontal de gènes, et tout particulièrement chez les *Neisseria*. En effet, dans ce genre bactérien, la compétence naturelle est sélective pour l'ADN provenant d'espèces très proches contenant au moins une copie de la *DNA-uptake sequence* (DUS). En absence de ce court élément répété, la fréquence d'import et d'intégration de l'ADN exogène dans le chromosome de *Neisseria* est très faible (Frye *et al.*, 2013). Pour vérifier si la protéine GspA, intimement liée à la RS, possède un rôle dans la compétence naturelle de *N. meningitidis*, des tests de transformation ont été réalisés.

Lors de ces tests, de l'ADN plasmidique a été utilisé, contenant à la fois un ou plusieurs DUS, des régions d'homologie avec le génome bactérien ainsi qu'une cassette de résistance à un antibiotique. Ces plasmides possèdent les caractéristiques nécessaires à leur intégration par double recombinaison homologue dans le chromosome de la bactérie, en plus de permettre la sélection des clones transformés par croissance sur milieu avec antibiotique. Dans chaque test de transformation, une quantité fixe d'ADN plasmidique est ajoutée à une suspension de chaque souche de *N. meningitidis* (WT, OE, KO, Compl). Ce mélange est incubé quelques heures, avant d'être dilué puis étalé sur gélose avec et sans antibiotiques. Le nombre de colonies ayant poussé sur milieu avec antibiotique représente alors le nombre de clones transformés, qu'il est possible de normaliser sur le nombre total de colonies ayant poussé sur milieu non sélectif.

4.4.1 Transformation d'un plasmide ne contenant pas la séquence répétée

Les premiers tests de transformations ont été réalisés avec le plasmide pCompInd, qui ne contient pas la RS (figure 15). Dans ces conditions, très peu de colonies transformées étaient obtenues, et ce peu importe la souche utilisée. Avec moins de 1 transformant par million de CFU, les écarts entre les souches ne sont pas statistiquement significatifs à l'exception de la souche surexprimée comparée à la sauvage. Cet écart ne reflète cependant pas un phénotype biologique puisqu'aucune différence n'est détectée entre la souche délétée et la surexprimée ou complémentée. L'absence de phénotype flagrant indique que GspA n'est pas impliquée dans la compétence naturelle de *N. meningitidis* dans ces conditions.

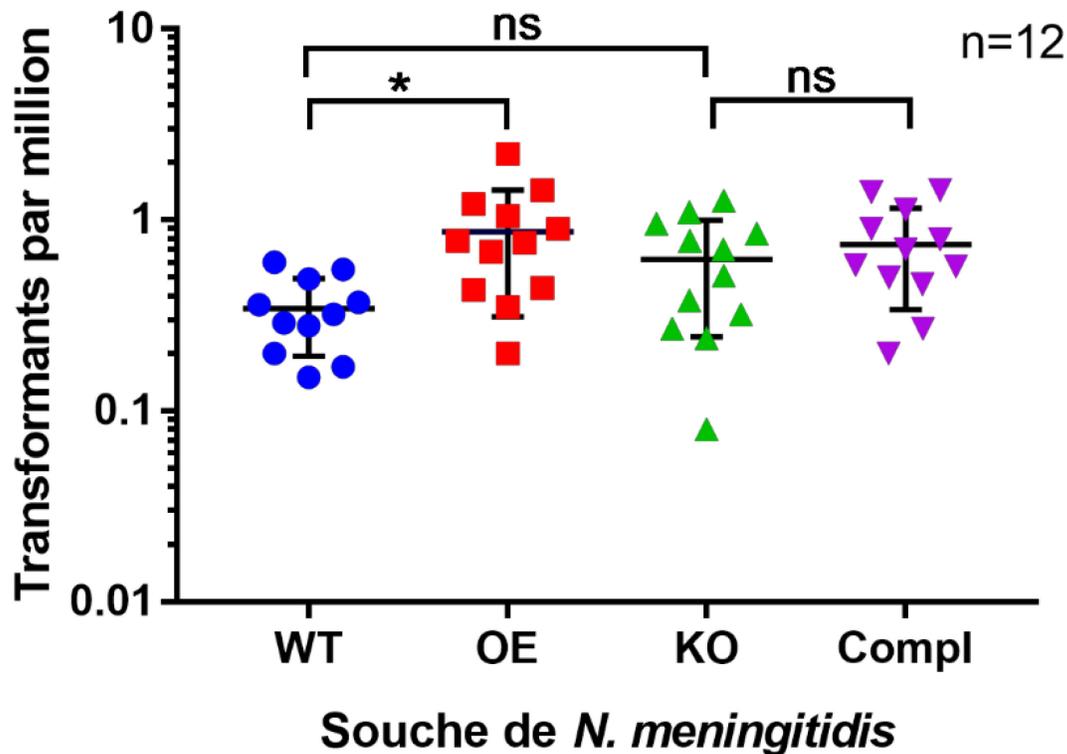


Figure 15 : Test de transformation avec le plasmide pComplnd

Du plasmide pComplnd, qui ne contient pas la RS, a été ajouté à des suspensions de *N. meningitidis*. Le taux de transformation a ensuite été évalué. L'expérience a été réalisée en triplicatas biologiques à 4 reprises indépendantes. Les moyennes et écarts-types sont présentés. ns : non significatif, * : p-valeur < 0.05 (1-way ANOVA avec comparaisons multiples de Tukey).

4.4.2 Transformation d'un plasmide contenant la séquence répétée

Des tests similaires ont été réalisés avec un second plasmide, pKOYebN, qui lui possède plusieurs copies de la RS mais ne s'intègre pas au même endroit que pComplnd (figure 16). Dans ces conditions, la souche sauvage donne lieu à environ 15 transformants par million, soit beaucoup plus que la même souche avec le premier plasmide. Lorsque GspA est surexprimé, le nombre de colonies transformées diminue significativement (-3.75x). Au contraire, lorsque GspA est délétée, ce nombre augmente considérablement (5.7x), soit de 20 fois celui de la souche OE. Le phénotype de cette dernière souche est parfaitement complémenté lorsque *gspA* est réintroduit sous un promoteur fort (Compl), avec environ 4 transformants/million.

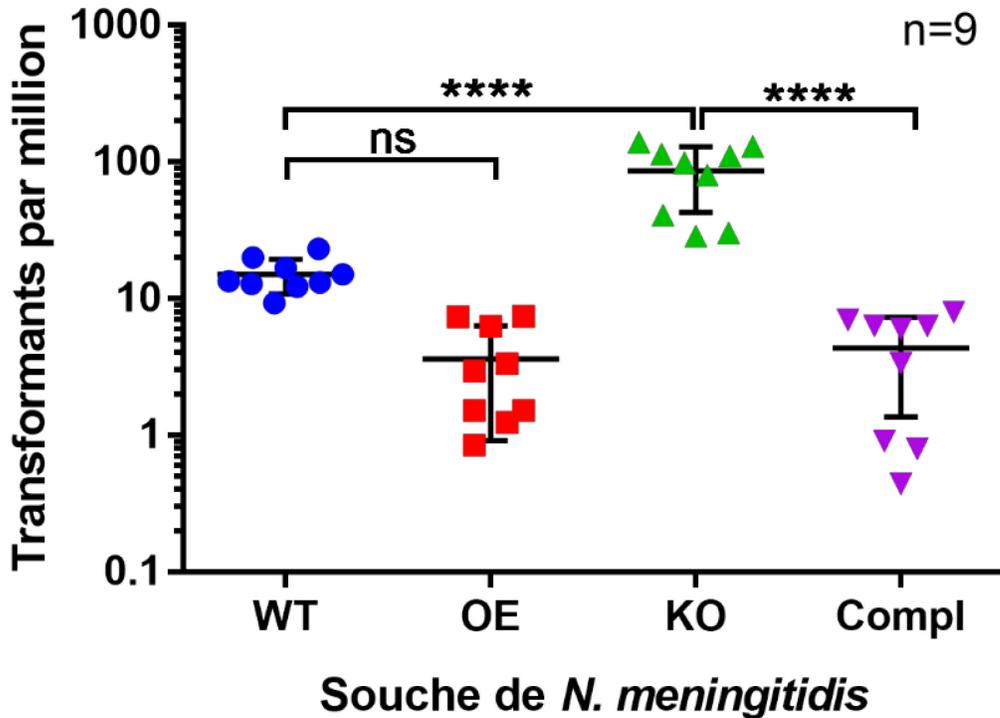


Figure 16 : Test de transformation avec le plasmide pKOYebN

Similaire à la figure précédente, mais avec le plasmide pKOYebN qui contient plusieurs copies de la RS. L'expérience a été réalisée en triplicatas biologiques à trois reprises indépendantes. Les moyennes et écarts-types sont présentés. ns : non-significatif, **** : p-valeur < 0.0001 (1-way ANOVA avec comparaisons multiples de Tukey).

On peut donc constater qu'en présence de la RS dans le plasmide transformant, GspA diminue la fréquence de transformation de façon significative. En effet, le taux de transformation est inversement proportionnel à l'expression de cette protéine.

Des expériences complémentaires ont été réalisées pour déterminer si la linéarisation du plasmide était nécessaire à son intégration dans le chromosome de *N. meningitidis* (données non-montrées). De façon générale, aucune différence significative n'a été observée pour une même quantité de plasmide circulaire et linéaire. Les taux de transformation sont sensiblement les mêmes et les différences entre les souches testées ne changent pas. Ces résultats indiquent que la bactérie importe autant de l'ADN circulaire que linéaire, et qu'elle linéarise avec sa propre machinerie enzymatique l'ADN exogène.

5 DISCUSSION

Ces travaux mettent en lumière une courte séquence répétée de 25 pb (RS), présente en plusieurs centaines de copies dans le génome de plusieurs membres de la famille *Neisseriaceae* ainsi que dans d'autres espèces bactériennes en plus faible nombre. Suite à une analyse bio-informatique poussée, une protéine hypothétique a été identifiée comme interagissant probablement avec cette RS. Cette protéine, que nous avons appelée GspA (GIY-YIG small protein A), est en effet quasi systématiquement entourée de nombreuses copies de la RS dans tous les génomes analysés, et est généralement absente des génomes dans lesquels on ne retrouve aucune RS. Ce rapport présente une caractérisation fonctionnelle de la protéine GspA, dont les résultats obtenus sont discutés ci-dessous.

5.1 Études phénotypiques et transcriptomiques

De nombreux tests phénotypiques ont été réalisés dans le but de déterminer les fonctions biologiques de la protéine GspA chez la bactérie pathogène *N. meningitidis*. Le choix de ces tests était principalement basé sur l'identité des gènes entourés de plusieurs copies de la RS, dont plusieurs sont associés au métabolisme de métaux, à la piliation ainsi qu'à la réparation de l'ADN. En effet, une de nos hypothèses était que GspA interagit avec cette RS pour effectuer un rôle de régulation d'expression génique.

En conditions optimales, la délétion ou surexpression de GspA n'a aucun effet sur la croissance et la morphologie de *N. meningitidis*. Cette protéine n'est donc pas essentielle au métabolisme de la bactérie en milieu riche. Nous avons ensuite soumis les quatre mutants de GspA (WT, OE, KO, Compl) à différents stress environnementaux et physiologiques pour tenter d'associer cette protéine à un stress particulier. Aucune différence marquée n'a été décelée entre les mutants lorsque la bactérie est exposée à différents pH ou encore à la présence de fortes concentrations de différents métaux. De la même façon, une exposition aux rayons UV ou à l'agent mutagène EMS n'a pas davantage affecté un mutant par rapport à un autre. Finalement, l'induction chimique de stress oxydatif n'a également pas révélé de phénotype flagrant. Selon ces résultats, GspA n'est pas impliquée dans la réparation d'ADN ou la réponse au stress.

La RS est fréquemment retrouvée autour des gènes codants pour les différentes pilines comme PilC1, PilC2, PilH-I-J-K (figure 5). De plus, le gène *gspA* est situé immédiatement en amont du gène *pilC2*. Pour vérifier si GspA avait un impact sur la piliation de *N. meningitidis*, chaque mutant a été observé en microscopie électronique à transmission, ne révélant aucune

différence. Cette analyse phénotypique caractérise le nombre et la longueur des pili, mais ne permet pas de vérifier la composition précise de ces derniers dans chaque mutant. L'expression de PilC2 a donc été vérifiée par RT-qPCR, ne révélant aucun écart significatif entre les souches. Une analyse transcriptomique des autres pilines n'a pas été réalisée, mais pourrait potentiellement révéler une régulation du métabolisme de synthèse des pili par GspA. Il serait aussi nécessaire de réaliser un western-blot en avec des anticorps anti-PilE afin de comparer leur abondance dans les mutants de *gspA*.

La RS est également présente en plusieurs copies autour de protéines d'acquisition, de stockage et de régulation du fer, comme Tbp1, LbpA-B, FetA et TruA (figure 5). Nous avons donc voulu vérifier si une carence en fer plutôt qu'une forte concentration de ce métal aurait un effet sur l'expression de *gspA*. Encore une fois, aucune différence significative n'a été démontrée, suggérant que GspA n'est pas associée au métabolisme du fer. Par contre, on a observé une légère surexpression de *lldA* dans la souche OE ainsi qu'une sous-expression dans la souche KO. Ce gène code pour une lactate déshydrogénase, qui permet la croissance avec du L-lactate comme seule source de carbone, un composé non produit par les cellules humaines mais qui peut être retrouvé dans le nasopharynx, lieu de colonisation primaire de *N. meningitidis* (Erwin & Gotschlich, 1993). Puisque cette espèce possède deux enzymes aux fonctions identiques (Erwin & Gotschlich, 1996), il pourrait être pertinent d'évaluer l'expression de la seconde déshydrogénase. Si un résultat similaire est observé, des tests de croissance sur lactate permettront d'évaluer si cette régulation transcriptomique a des conséquences biologiques, ce qui définirait une fonction supplémentaire de GspA.

La majorité des gènes flanqués par la RS sont intimement associés à la virulence de *N. meningitidis*, incluant ceux mentionnés précédemment dans l'acquisition de fer (compilé dans Rohde & Dyer, 2003). En effet, Tbp1 (Transferrin-binding protein) permet l'utilisation de la transferrine humaine comme source de fer, un attribut unique aux *Neisseria* pathogènes (Cornelissen *et al.*, 1992). Similairement, LbpA (Lactoferrin-binding protein) permet d'arracher le fer de la lactoferrine de l'hôte (Pettersson *et al.*, 1994). *N. meningitidis* ne possède pas de sidérophores, mais peut se servir de ceux produits par les bactéries environnantes grâce à la protéine FetA (ferric enterobactine transporter) (Beucher & Sparling, 1995). Non reliées au métabolisme du fer, les gènes *opaA-B-C* sont eux aussi entourés de la RS et associés à la virulence de ce pathogène. Ces protéines sont essentielles à l'invasion de la bactérie dans les cellules épithéliales (compilé dans Hauck & Meyer, 2003). Les gènes codant pour les différentes pilines sont également essentiels à la virulence, puisqu'ils permettent l'adhésion initiale de la

bactérie aux cellules épithéliales de l'hôte (Nassif *et al.*, 1994). Pour ces raisons, il serait très pertinent d'évaluer la virulence des mutants de GspA *in vivo*. Plusieurs modèles murins permettent d'étudier la pathogénicité de *N. meningitidis* dans la souris, qui n'est normalement pas susceptible à la colonisation par ce pathogène (Johansson *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003; Zarantonelli *et al.*, 2007). D'autres expériences *ex vivo* pourraient également fournir des informations précieuses sur l'impact de GspA sur la virulence. Par exemple, la capacité du sérum humain de tuer la bactérie pourrait être évaluée, tel que décrit dans (McQuillen *et al.*, 1994).

5.2 Activité endonucléase *in vitro*

Nous avons démontré *in vitro* que GspA est une endonucléase de type « nicking », aussi appelée NEase (Nicking Endonuclease) ou nickase. En effet, lorsque purifiée et mise en présence d'ADN plasmidique surenroulé, celle-ci est capable de cliver un brin d'ADN. Cette activité a été observée avec de nombreux plasmides différents, ce qui soulève plusieurs hypothèses ; (1) GspA reconnaît une structure particulière d'ADN comme la forme surenroulée, ou alors (2) GspA reconnaît un profil de méthylation particulier. Par contre, entre nos mains, GspA n'a jamais été en mesure de digérer totalement l'ADN plasmidique de la forme surenroulée vers la forme circulaire relâchée, et ce dans toutes les conditions testées. Cette dernière observation indique que la condition optimale de l'enzyme n'a pas été atteinte, qu'une trop faible concentration a été utilisée ou encore que son activité est très rapidement perdue dans les conditions testées. Certaines endonucléases nécessitent de l'ATP pour leur activité catalytique, notamment celles associées à des systèmes de restriction-modification dépendants de la méthylation (Dryden *et al.*, 2001). Ce paramètre devrait donc également être testé. Afin de prouver que le clivage simple brin de l'ADN observé est bel et bien dû à GspA et non à une DNase contaminante, il sera important de générer des variants de la protéine, mutés à plusieurs acides aminés clés comme le site prédit de liaison à un métal, puis de comparer leur activité endonucléase. Ces expériences permettraient également de confirmer les sites catalytiques de GspA.

Pour vérifier l'hypothèse comme quoi GspA peut potentiellement reconnaître ou cliver l'ADN au niveau de la séquence répétée, certains plasmides testés contenaient plusieurs copies de cette dernière, tandis que d'autres n'en contenaient pas du tout. Puisqu'une activité endonucléase a été démontrée dans tous ces plasmides, il semble que la séquence nucléotidique de la RS n'est pas nécessaire au clivage de l'ADN par l'enzyme dans ces conditions. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que la spécificité de cette enzyme puisse être différente *in*

vitro lorsque la protéine est pure par rapport à *in vivo* lorsque celle-ci est en présence d'autres potentiels effecteurs protéiques.

Pour préciser le ou les sites de reconnaissance de l'enzyme GspA, une seconde approche a été utilisée. Des produits de PCR provenant de différentes sources ont été radiomarqués au ^{32}P en 5', puis exposés à la protéine purifiée GspA. Les deux brins d'ADN ont ensuite été dénaturés, puis les fragments ont été séparés par électrophorèse et visualisés grâce à leur radioactivité. Cette méthode a l'avantage de permettre l'utilisation de petits fragments d'ADN, en plus de permettre l'observation de fragments en très faible concentration. Un plasmide où une activité endonucléase avait déjà été observée par la méthode précédente a été divisé en plusieurs produits de PCR marqués, puis testé par cette seconde technique. Étonnamment, il nous a été impossible de détecter des produits de clivage par cette approche. Une hypothèse pouvant expliquer que le plasmide entier est digéré par GspA mais pas lorsqu'il est fragmenté par PCR est que l'enzyme reconnaît une structure secondaire particulière de l'ADN, comme un surenroulement, ou bien une modification spécifique de l'ADN comme la méthylation qui aurait été perdue pendant la PCR. Plusieurs enzymes bien connues possèdent ces caractéristiques, comme les topoisomérases qui clivent uniquement l'ADN surenroulé (Corbett *et al.*, 2005), les hélicases qui dénaturent l'ADN aux origines de réplication (Windgassen *et al.*, 2018), ainsi que toutes les enzymes de restriction de type IV qui reconnaissent l'ADN méthylé (Loenen *et al.*, 2014).

Nous avons par la suite démontré par la même technique que des produits de PCR provenant de différentes régions génomiques de *N. meningitidis* MC58 et 2C4.3 étaient clivés par GspA. Similairement aux digestions de plasmides entiers, la digestion de ces produits de PCR était incomplète, confirmant que les conditions optimales de l'enzyme ne sont pas atteintes ou qu'une trop faible quantité a été utilisée. Malgré la présence de plusieurs copies de la RS dans un substrat d'ADN, une seule bande additionnelle a été détectée en présence de GspA. On ne peut cependant pas exclure que GspA clive au niveau de la RS. En effet, le marquage en 5' de l'ADN avant l'ajout de GspA ne permet pas de discriminer plusieurs coupures d'un même brin. Il serait pertinent de réitérer l'expérience, cette fois en marquant l'ADN après l'incubation avec GspA. Le marquage additionnel ou en parallèle des extrémités 3' avec l'enzyme transférase terminale permettrait également d'obtenir une image plus précise de nombre et de l'emplacement des coupures occasionnées par GspA.

À ce jour, la spécificité de reconnaissance et de clivage de GspA n'est pas encore très claire. Plusieurs expériences supplémentaires pourraient définir cette spécificité, à commencer par tester davantage de plasmides, de produits de PCR mais aussi de l'ADN lambda. Il serait également pertinent de tester l'activité endonucléase sur de l'ARN, de l'ADN simple-brin, ainsi que sur des ADN avec différents profils de méthylation. Les produits digérés par GspA peuvent ensuite être analysés par « run-off sequencing ». Cette technique est basée sur le séquençage Sanger. Lorsque la polymérase rencontre une coupure sur un brin d'ADN, celle-ci se détache et arrête l'incorporation de nucléotides. En comparant les profils obtenus, il est possible de déterminer précisément quel brin d'ADN est clivé et à quel endroit. Une analyse *in silico* permet ensuite de déterminer si le site de clivage est à proximité d'une séquence nucléotidique conservée (Xu *et al.*, 2007).

La grande majorité des endonucléases de restriction clivent les deux brins de l'ADN. La sous-famille II regroupe entre autres des homodimères dont chaque monomère clive un brin d'ADN, ou encore des monomères avec deux sites catalytiques. Ces caractéristiques sont exploitées pour créer des nickases artificielles, pour lesquelles la dimérisation est bloquée (Higgins *et al.*, 2001) ou bien le second site catalytique est inactivé (Zhu *et al.*, 2004). Les nickases se divisent en deux groupes. Le premier groupe, dit de type V, est systématiquement associé à des méthyltransférases qui reconnaissent les mésappariements G-T afin de réparer ces derniers. Le second, de type N, s'apparente aux enzymes de restriction en possédant une séquence de reconnaissance spécifique de 3-7 pb (Roberts *et al.*, 2003). Selon nos résultats, il est difficile de déterminer à quelle classe de nickase GspA appartient. Une façon simple de savoir si l'enzyme appartient au groupe V serait de tester son activité sur des ADN avec un mésappariement G-T. Cette technique a déjà été utilisée pour caractériser des protéines similaires dans *N. gonorrhoeae* (Kwiatek *et al.*, 2010). Il est également possible qu'en conditions physiologiques, GspA s'homodimérise pour former une enzyme de restriction de type IIP (Chan *et al.*, 2011; Loenen *et al.*, 2014). Cependant, cela signifierait que sa forme monomérique est prédominante et active lors de nos tests *in vitro*. Une chromatographie d'exclusion stérique en conditions natives permettrait de caractériser l'oligomérisation potentielle de GspA. Cette technique sépare à l'aide d'un tamis moléculaire les différentes formes multimériques de la protéine selon leur taille, et permet d'analyser la quantité relative de chacune (Sakashita *et al.*, 2018).

5.3 Rôles de GspA dans la compétence naturelle de *N. meningitidis*

Puisque l'activité endonucléase de GspA a été confirmée *in vitro*, nous nous sommes penché sur les conséquences biologiques de cette activité. Pour ce faire, nous avons généré des souches de *N. meningitidis* avec le gène *gspA* muté. Nous avons ensuite évalué la compétence naturelle de chacune de ces souches en présence d'ADN plasmidique, à l'aide de tests quantitatifs de transformation. Nous avons démontré *in vivo* que l'expression de GspA est associée à une diminution de la compétence naturelle de *N. meningitidis*. En effet, une souche surexprimant GspA montre des taux de transformation plus faibles que la souche sauvage, alors qu'une souche ayant le gène *gspA* inactivé est transformée avec beaucoup plus de succès. Pour affirmer avec certitude que ces écarts sont dus à GspA, une souche dite complémentée a été créée. Celle-ci donne un phénotype similaire à la souche surexprimant *gspA*, confirmant que ces phénotypes sont causés par la protéine GspA. Cependant, ces résultats ont été obtenus uniquement avec un plasmide qui contient plusieurs copies de la séquence répétée (RS). Lorsque les mêmes expériences ont été réalisées avec un plasmide n'en contenant pas, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les mutants. Ces résultats corroboreraient une hypothèse ; *in vivo*, GspA reconnaît et clive l'ADN au niveau de la RS, ce qui réduit sa fréquence de recombinaison au génome et donc, diminue le nombre de transformants obtenu. En absence de la RS dans l'ADN transformant, GspA ne le clive pas, donnant un taux de transformation stable même lorsque la protéine est délétée ou surexprimée. Pour conclure avec certitude que la différence de niveau de compétence entre les souches de *N. meningitidis* est bien due à la présence de RS dans l'ADN transformant, il sera nécessaire de répéter l'expérience avec plusieurs autres plasmides sans ou avec la RS, en plus de faire varier son nombre de copies.

Pour confirmer les résultats des tests de transformation, une seconde approche pourrait être utilisée afin de quantifier la compétence naturelle des différents mutants de GspA. À la place d'un gène de résistance à un antibiotique, l'opéron *luxCDABE* de la bactérie *Photobacterium luminescens* pourrait être cloné dans des plasmides intégratifs sous un promoteur fort. Cet opéron, lorsqu'intégré dans le génome de *N. meningitidis*, rend la bactérie luminescente lorsqu'elle est métaboliquement active (Agnememel *et al.*, 2016; Guiddir *et al.*, 2014). Suite à des transformations en milieu liquide, la luminescence pourrait directement être évaluée par un lecteur de plaque, ce qui donnerait une quantification fiable et sensible du nombre de transformants en temps réel, tout en évitant les inconvénients du décompte des CFUs. Cette technique a déjà été testée avec succès chez *Acinetobacter baylyi*, une autre bactérie naturellement compétente (Santala *et al.*, 2016).

À ce jour, on ne sait pas à quel niveau de la compétence naturelle GspA agit. En effet, trois étapes de la compétence pourraient être affectées ; (1) l'import d'ADN, (2) le traitement de l'ADN au niveau du périplasme et sa translocation, et (3) la recombinaison au génome chromosomique. Plusieurs approches peuvent être utilisées pour déterminer l'étape qui est en jeu. La première implique le marquage fluorescent de l'ADN transformant, qui peut être fait avec du Cy-3. Lorsqu'une culture de *Neisseria* est mise en présence de l'ADN-Cy3, puis traité à la DNase pour éliminer l'ADN non-incorporé, il est possible de visualiser l'ADN intracellulaire de façon précise en microscopie à fluorescence (Gangel *et al.*, 2014b). Une analyse d'image permet ensuite de compter les bactéries fluorescentes dans un champ donné, ou même de quantifier l'intensité de fluorescence par cellule (Hepp *et al.*, 2016). Cette première expérience devra être réalisée dans une souche mutée pour le gène *recA*, essentiel à la recombinaison dans le chromosome bactérien, pour éviter la perte du signal lors de l'intégration. Pour vérifier si l'étape de translocation au travers de la membrane interne est impliquée dans l'inhibition de la compétence naturelle par GspA, les mêmes expériences devraient être répétées dans des souches avec le gène *comA* délété. ComA est la protéine transmembranaire responsable de la translocation de l'ADN transformant du périplasme vers le cytoplasme. Si les mêmes résultats sont obtenus lorsque ComA est délétée, cela signifierait que GspA agit en amont de la translocation cytoplasmique, et donc au niveau de l'import dans le périplasme (Gangel *et al.*, 2014a). La dernière étape de la compétence naturelle chez les *Neisseriaceae*, la double recombinaison homologue au génome chromosomique, est la plus difficile à étudier indépendamment des étapes d'import et de translocation de l'ADN transformant. Concrètement, si les expériences proposées pour identifier l'influence de GspA dans l'import et la translocation de l'ADN ne révèlent aucun écart significatif entre les mutants, alors c'est l'étape de recombinaison qui est affectée, auquel cas il faudra étudier une potentielle interaction avec les protéines DprA, Ssb et RecA qui contrôle la recombinaison (Berge *et al.*, 2003; Hovland *et al.*, 2017).

La découverte de GspA comme étant un inhibiteur de la compétence naturelle dans certaines conditions a des conséquences biologiques majeures. En effet, puisque la compétence est un mécanisme d'évolution et d'adaptation important via les transferts horizontaux de gènes, inhiber cette caractéristique semble à première vue nuisible à la bactérie. Cependant, plusieurs inconvénients sont associés à la compétence, dont des coûts énergétiques importants, ainsi que la possibilité de remplacer des gènes sains par des gènes tronqués ou mutés. Les *Neisseria* sont naturellement compétentes de façon constitutive, c'est-à-dire sans contrainte de phase de croissance ou de stress particulier, chose quasi unique à ce genre bactérien (Seitz & Blokesch,

2013). Ainsi, il n'est pas surprenant d'y retrouver plusieurs mécanismes régulateurs, tant positifs que négatifs. Deux mécanismes de régulation négative ont déjà été démontrés chez ces espèces. Le premier est la sélectivité qu'ont les *Neisseria* pour capter uniquement de l'ADN provenant d'autres *Neisseria*, caractérisé par la présence d'une courte séquence répétée dénommée DUS. Ce favoritisme est assuré par les pilines à la surface des pili de type IV (Cehovin *et al.*, 2013a). Le second est assuré par la protéine PilV, qui inhibe l'import d'ADN par antagonisme de la piline ComP (Aas *et al.*, 2002). Ces deux mécanismes agissent donc uniquement sur l'étape d'import de l'ADN, mais pas sur la modification de cet ADN ni sa recombinaison au génome.

Un dernier système, commun à la majorité des bactéries, sert à protéger les cellules contre l'ADN exogène, principalement viral. Ces systèmes, dits de restriction-modification (RM), se basent sur la présence d'enzymes de restriction associées à des méthyltransférases. Ces enzymes reconnaissent et clivent des séquences spécifiques d'ADN, parfois retrouvées dans l'ADN viral, tandis que les méthyltransférases modifient l'ADN de la bactérie pour protéger son propre génome de ces enzymes. Les bactéries naturellement compétentes possèdent généralement plus de systèmes RM que les autres, supportant leur rôle dans la protection contre l'ADN exogène (Vasu & Nagaraja, 2013). Les *Neisseria* pathogènes sont reconnues pour en avoir un nombre particulièrement élevé, soit près de 14 par souche (Rotman & Seifert, 2014). Une étude montre même que la distribution de ces systèmes coïncide avec la distribution phylogénétique des différents clades de *N. meningitidis*, favorisant les transferts horizontaux de gènes au sein d'un même clade mais inhibant les échanges interclades (Budroni *et al.*, 2011). Dans cette espèce, des systèmes RM ont déjà été directement associés à une diminution du taux de transformation (Ambur *et al.*, 2012). De plus, une étude récente publiée dans Cell en août 2019 montre que ces systèmes de protection sont exploités par les *Neisseria* commensales pour tuer les *Neisseria* pathogènes (Kim *et al.*, 2019). En effet, le profil de méthylation distinct des espèces commensales rend leur ADN toxique pour *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* lorsqu'il est intégré à leur génome, puisque cet ADN peut alors être clivé par les enzymes de restriction de la bactérie, menant à sa mort. En raison de l'activité endonucléase de GspA ainsi que de son implication dans la régulation négative de la compétence naturelle, il est plausible que cette protéine fasse partie d'un système RM non caractérisé. Pour confirmer cette hypothèse, il faudra déterminer la spécificité de clivage de GspA, et vérifier si une méthyltransférase connue chez les *Neisseria* modifie la même séquence.

5.4 Nouvelle courte séquence répétée chez les *Neisseria*

À l'origine, le gène codant pour GspA a été mis en lumière par une analyse bio-informatique poussée d'une séquence répétée non répertoriée chez les *Neisseria*. Cette courte séquence est retrouvée plusieurs fois de part et d'autre de *gspA* dans presque toutes les espèces possédant ce gène, mais est aussi retrouvée à proximité de plusieurs gènes importants à la bactérie, impliqués dans la réparation de l'ADN, la piliation et l'homéostasie des métaux. Une hypothèse a été soulevée comme quoi GspA et la RS avaient fort probablement un lien. Plusieurs expériences ont tenté de révéler ce lien, mais les résultats ne permettent pas de confirmer ce lien avec certitude. *In vitro*, la protéine purifiée est capable de cliver un brin d'ADN dans une variété de plasmides entiers, sans spécificité particulière pour la RS. Sur des produits de PCR par contre, une activité endonucléase a été associée à GspA uniquement lorsque l'ADN contenant au moins une copie de la RS. De plus, *in vivo*, la présence de cette RS dans un plasmide transformant affecte grandement les taux de transformations obtenus avec différents mutants de GspA. Il n'est pas exclu que GspA reconnaisse la RS mais clive l'ADN ailleurs. Pour vérifier cette hypothèse, une technique appelée EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) pourrait être utilisée. Celle-ci consiste à mettre en présence de GspA différentes constructions d'ADN, puis de faire migrer ces ADN sur un gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes. Si la protéine se fixe à l'ADN, ce dernier sera ralenti et un écart (un *shift*) sera observé. Pour éviter la dégradation de l'ADN par l'activité endonucléase de GspA, il suffit d'enlever le magnésium du mélange réactionnel, ce qui rendra l'enzyme inactive sans toutefois empêcher sa liaison (Saravanan *et al.*, 2004). Curieusement, cette méthode a déjà été utilisée sur le domaine isolé GIY-YIG d'une autre protéine chez la plante *Arabidopsis thaliana*, associée à la réparation de l'ADN. Cette étude démontre que ce domaine, qui est le seul domaine fonctionnel de GspA, se fixe préférentiellement à des structures d'ADN ramifiées, comme les jonctions Holiday et les fourches de réplication (Fukui *et al.*, 2018). Ces résultats n'ont pas été reproduits entre nos mains avec GspA (données non montrées), ce qui peut être expliqué par la faible homologie entre leurs domaines GIY-YIG.

De façon intéressante, les systèmes CRISPR sont également un moyen de défense des bactéries contre l'ADN exogène invasif. Il a été mentionné précédemment que la RS que nous avons identifiée possède certaines similarités structurales avec les CRISPR, malgré l'absence de protéine Cas (CRISPR-associated) dans la souche *N. meningitidis* 8013 (2C4.3) ici étudiée. Une recherche de la RS dans CRISPR Database montre même que celle-ci est un CRISPR « confirmé » dans plusieurs espèces de *Neisseria*, dont *N. meningitidis* 8013 (<https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>), c'est-à-dire qu'elle répond aux mêmes critères que des

CRISPR associés à des Cas. De plus, les protéines Cas sont presque toutes des endonucléases, tout comme GspA (Makarova & Koonin, 2015). Cependant, il faut noter que GspA est beaucoup plus petite que ces enzymes. Des expériences complémentaires dans cette direction seraient donc pertinentes, notamment dans la souche *N. meningitidis* MC58 qui elle possède un système CRISPR-Cas9 fonctionnel (Zhang, 2017).

L'absence de conclusion ferme quant à l'association entre GspA et la RS n'enlève en rien l'importance potentielle de cette séquence répétée dans l'évolution des *Neisseria* pathogènes. En effet, la localisation stratégique de ces répétitions autour des gènes *opa*, *pilC*, *pilE*, *fetA* et plusieurs autres laisse à penser que celle-ci serait impliquée dans la flexibilité génétique de ces bactéries. Les protéines issues de ces gènes ont toutes été associées aux phénomènes suivants ; la variation antigénique et la variation de phase. La variation antigénique permet à un microorganisme de modifier ses protéines de surface comme les pili afin de favoriser l'évasion immunitaire ou l'adaptation à une nouvelle niche écologique. Quant à elle, la variation de phase permet une expression différentielle de certaines protéines de surface au sein d'une population bactérienne, favorisant la survie de certaines cellules si l'environnement change (van der Woude & Bäumler, 2004). Une étude récente démontre l'implication concrète de certaines séquences répétées dans la variation de phase chez *N. gonorrhoeae* (Zelevska et al., 2016). On pourrait imaginer une fonction similaire de la RS, dont la structure secondaire en épingle suggère qu'elle peut interférer avec la transcription des gènes en aval.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces travaux présentent la découverte d'une courte séquence de 25 nucléotides, répétée plusieurs centaines de fois chez les *Neisseria*, tout particulièrement dans les espèces pathogènes. Cette RS s'amasse autour de plusieurs gènes importants à la bactérie, ce qui soulève l'hypothèse qu'elle possède une fonction régulatrice importante comme de nombreuses autres séquences répétées dans ce genre bactérien. Puisqu'un tel élément est très difficile à étudier *in vivo* en raison de sa taille et de son nombre de copies, nous nous sommes intéressés à un potentiel effecteur protéique qui interagirait avec la RS. Une petite protéine hypothétique, dénommée GspA dans cet ouvrage, a été sélectionnée en raison de sa forte cooccurrence avec la RS. En effet, presque toutes les espèces où la RS est retrouvée codent pour le gène *gspA*, tandis que les espèces n'arborant pas la RS ne possèdent pas ce gène. De plus, un très grand nombre de copies de la RS est retrouvé de part et d'autre du gène *gspA* dans plusieurs espèces, dont le pathogène *Neisseria meningitidis*. Une seconde hypothèse a donc été émise, comme quoi la protéine GspA interagit avec la RS pour effectuer un rôle régulateur, potentiellement associé à la réparation de l'ADN, la réponse au stress, la transcription, ou à la compétence naturelle de la bactérie.

Le premier objectif de cette étude était de déterminer si GspA possède une activité endonucléase, comme le suggère son unique domaine fonctionnel. Cette protéine a donc été exprimée dans *E.coli*, purifiée, puis étudiée *in vitro*. Nos résultats démontrent clairement une activité de type *nicking* de GspA sur plusieurs substrats d'ADN, autant plasmidiques que génomiques. Cette activité est dépendante de la présence de magnésium comme cofacteur, un attribut typique des enzymes de restriction de type II dont le potentiel biotechnologique en ingénierie génétique est fortement établi. Cependant, il nous a été impossible de déterminer la spécificité de clivage simple-brin de GspA, ni son site de reconnaissance.

Le second objectif de cette étude consistait à définir les fonctions biologiques de la protéine GspA. Pour ce faire, des mutants de la souche *N. meningitidis* 2C4.3 ont été créés dans lesquels le gène *gspA* est inactivé (KO), surexprimé (OE), ou complété (Compl). Ces souches ont ensuite été soumises à de nombreux tests phénotypiques et transcriptomiques. Nous avons démontré que GspA n'est pas une protéine essentielle à la bactérie. Nos résultats indiquent également que cette enzyme n'est pas impliquée dans la piliation, la résistance à différents stress physiologiques ou encore dans la réparation de l'ADN. Par contre, nous avons démontré une fonction régulatrice importante de GspA dans la compétence naturelle de *N. meningitidis* face à

de l'ADN plasmidique abritant la RS. En présence de cet ADN, la souche surexprimant GspA est plus difficilement transformée, tandis que la souche délétée montre des taux de transformation jusqu'à 10x supérieurs à la souche sauvage, indiquant que cette protéine est un inhibiteur fort de ce mécanisme. Nous proposons que GspA reconnait de l'ADN exogène contenant la RS et le dégrade à l'aide de son activité endonucléase, ce qui a pour effet de prévenir son intégration dans le génome (figure 17). Puisque plusieurs gènes importants à la bactérie sont flanqués de la RS, nous proposons que ce système soit un mécanisme de protection contre des recombinaisons nuisibles pouvant compromettre la survie ou la virulence du pathogène.

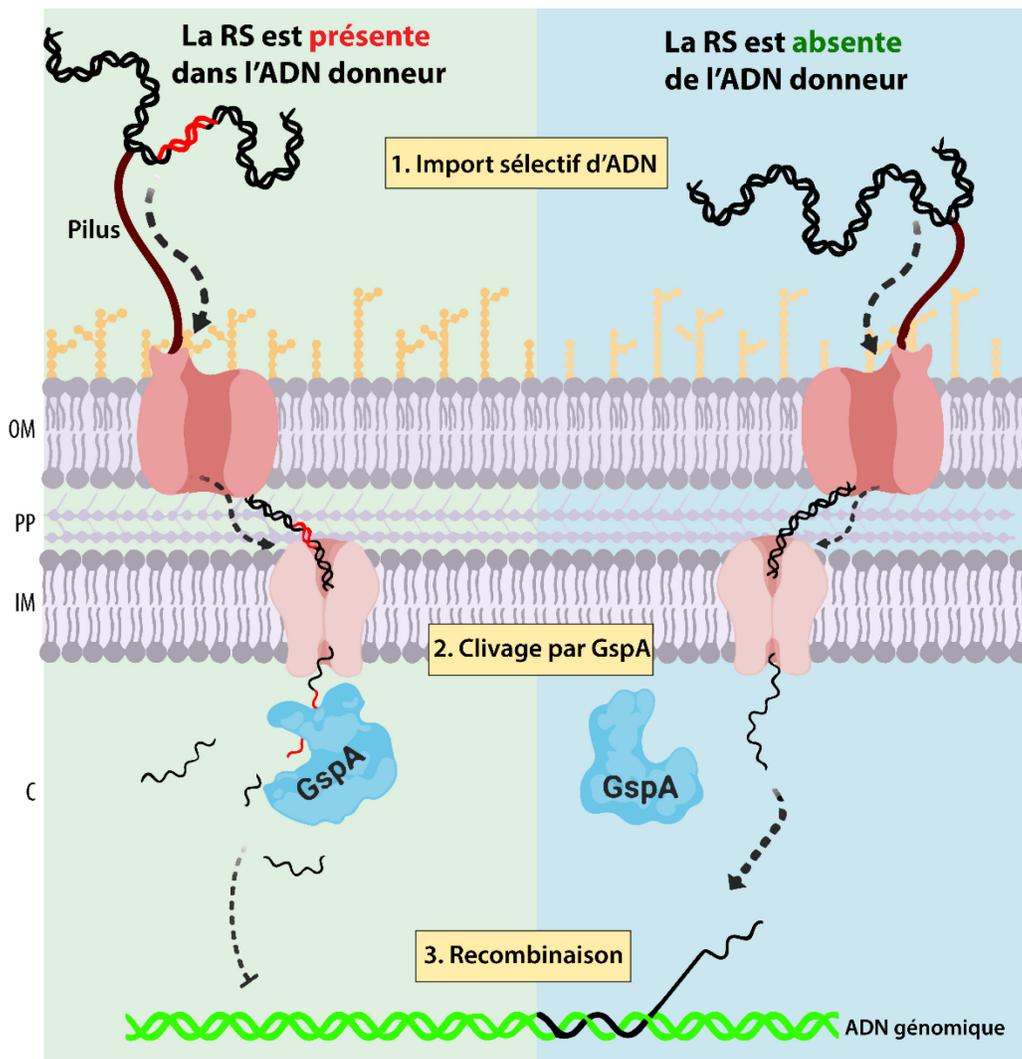


Figure 17 : Mécanisme d'action proposé de GspA dans la compétence de *N. meningitidis*

L'ADN exogène est capté par les pili de la bactérie, qui se rétractent ensuite pour le rapprocher de la membrane externe. L'ADN est alors importé dans le périplasme par la protéine transmembranaire PilQ. La protéine ComA permet ensuite la translocation d'un seul brin au travers de la membrane interne. Nous proposons ici que GspA est une endonucléase qui clive l'ADN simple-brin uniquement lorsque celui-ci contient la séquence répétée (RS). Ces fragments auraient alors une plus faible homologie avec le génome de la bactérie en raison de leur taille réduite, ce qui diminuerait leur fréquence d'intégration à ce génome.

Le troisième et dernier objectif était de caractériser expérimentalement les liens prédits *in silico* entre GspA et la séquence répétée. Les résultats par rapport à cela sont peu conclusifs. *In vitro*, cette enzyme clive un plasmide surenroulé sans influence de la RS, mais ne clive un produit de PCR qu'en présence de cette répétition. *In vivo*, lors des tests visant à déterminer le niveau de compétence des souches mutantes testées, la diminution du taux de transformation associée à la présence de GspA n'est observée qu'en présence de RS dans le plasmide transformant. Des tests complémentaires seront donc nécessaires pour confirmer la relation entre GspA et la RS.

6.1 Perspectives

Potentiel biotechnologique

Plusieurs milliers d'enzymes de restriction ont été caractérisées au cours des dernières décennies, et quelques centaines sont maintenant commercialisées (Roberts *et al.*, 2015). Ces endonucléases possèdent une spécificité de séquence qui en font un atout majeur en biologie moléculaire. Leur capacité à couper l'ADN avec grande fidélité est exploitée dans plusieurs systèmes de clonage (Cohen *et al.*, 1973), mais aussi pour cartographier l'ADN (Danna & Nathans, 1972), étudier l'environnement épigénétique (Cohen-Karni *et al.*, 2011) ou encore créer des bibliothèques d'ADN (de Wit & de Laat, 2012; Velculescu *et al.*, 1995). Cependant, l'énorme majorité de ces enzymes clive les deux brins d'ADN. À ce jour, seulement 15 nickases différentes sont commercialement disponibles, reconnaissant au total 11 séquences spécifiques de 3-7 nt (REBASE 08-01-2019; Roberts *et al.*, 2015). Parmi celles-ci, toutes sauf 3 sont d'origine synthétique, signifiant qu'elles proviennent d'enzymes de restriction conventionnelles qui ont été modifiées pour ne cliver qu'un brin d'ADN (Zhu *et al.*, 2004). En raison de leur rareté, ces protéines ont été relativement peu exploitées par le passé, mais leur application plus fine que les enzymes traditionnelles ouvre la porte à des technologies émergentes prometteuses. Plusieurs de ces technologies visent l'amplification de matériel génétique, comme l'amplification par déplacement de brin (SDA), l'amplification à cercle roulant (RCA), la réaction d'amplification exponentielle (EXPAR) ou l'amplification par signal étendu de NEase (NESA) (Compilé dans Chan *et al.*, 2011). Les nickases sont également utilisées dans des technologies de séquençage (Song *et al.*, 2010), d'édition de génome (Smith *et al.*, 2009; van Nierop *et al.*, 2009), ou même comme moteur moléculaire (Bath *et al.*, 2005).

Ce rapport présente la découverte d'une endonucléase de type *nicking* possédant probablement une spécificité de séquence. Celle-ci a été exprimée et purifiée dans *E.coli*, et a montré une activité catalytique relativement stable, suggérant qu'elle pourrait être produite de

façon industrielle pour être commercialisée. Le potentiel biotechnologique de cette protéine est donc important, ce pour quoi il sera essentiel de caractériser ses propriétés biochimiques plus en détail. La spécificité de reconnaissance et de clivage devra d'abord être identifiée par *run-off sequencing* de plusieurs constructions d'ADN clivées par l'enzyme. L'arrêt du séquençage pour un fragment donné indiquera précisément le site de coupure, et la comparaison de la séquence avoisinant ce site entre plusieurs fragments permettra d'inférer la séquence de reconnaissance. Ensuite, des cinétiques de clivage pourront être réalisées, ce qui permettra notamment de calculer la constante de Michaelis (K_m) et de comparer l'activité de GspA à d'autres nickases ou enzymes de restriction. Évidemment, la cristallisation de la protéine serait un atout majeur. Cela pourrait être fait en présence ou absence d'ADN pour montrer leur interaction, ce qui pourrait révéler de précieuses informations sur le mécanisme d'action de GspA. Tous ces tests devront être faits sur plusieurs mutants de la protéine, caractérisés par des substitutions d'acides aminés à des endroits prédits comme étant clés à l'activité de l'enzyme, par exemple le site de liaison au magnésium. Ces mutants fourniront davantage d'indices sur le mécanisme d'action de GspA, surtout par rapport à son domaine C-terminal qui n'est homologue à aucun domaine fonctionnel prédit.

Autres pistes à explorer

La découverte d'une forte régulation négative de la compétence naturelle par GspA chez *N. meningitidis* ouvre également la porte à de nombreuses expériences complémentaires *in vivo*. D'abord, il serait intéressant d'évaluer les interactions possibles entre GspA et d'autres effecteurs de la compétence par des analyses transcriptomiques et phénotypiques. Des tests de transformation pourront être réalisés sur des doubles mutants (délétion de GspA et d'autres protéines impliquées dans la compétence) afin de situer ce nouveau régulateur dans les mécanismes déjà connus de compétence. L'utilisation d'ADN marqué avec un fluorochrome permettra également de suivre l'étape d'import d'ADN en microscopie dans les différents mutants. Il sera ensuite possible de quantifier l'ADN importé dans les cellules. Finalement, l'implication de GspA dans la compétence implique probablement des conséquences au niveau de la virulence de *N. meningitidis*. Pour tester cette hypothèse, des souris pourront être inoculées avec chaque mutant, et plusieurs paramètres pourront être étudiés comme leur survie et le nombre de CFU dans différents organes.

Finalement, puisque GspA ainsi que la séquence répétée sont retrouvées dans d'autres espèces bactériennes plus ou moins éloignées des *Neisseria*, incluant des espèces qui ne sont pas naturellement compétentes, il sera pertinent d'étudier la protéine dans celles-ci pour tenter de décrire un mécanisme général de cette nouvelle enzyme.

Pour conclure, l'activité endonucléase de type *nicking* de la protéine GspA caractérisée dans cet ouvrage lui suggère un potentiel biotechnologique qu'il sera nécessaire d'étudier plus en détail. De plus, GspA régule négativement la compétence naturelle de *N. meningitidis* et potentiellement aussi de *N. gonorrhoeae*, deux pathogènes causant des millions d'infections parfois mortelles partout autour du globe. La compétence naturelle des *Neisseria* pathogènes leur a permis d'évoluer et de s'adapter à l'hôte humain, en plus de développer de nombreux facteurs de virulence et de résistances aux antibiotiques. La découverte d'une toute nouvelle protéine impliquée dans ce phénomène permettra d'en connaître davantage sur l'évolution de ce genre bactérien, et ultimement aidera à prédire l'apparition de nouveaux pathogènes ou l'évolution de ceux déjà existants.

BIBLIOGRAPHIE

- Aas FE, Lovold C & Koomey M (2002) An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Mol Microbiol* 46(5):1441-1450.
- Achaz G, Rocha EP, Netter P & Coissac E (2002) Origin and fate of repeats in bacteria. *Nucleic Acids Res* 30(13):2987-2994.
- Agnememel A, Hong E, Giorgini D, Nuñez-Samudio V, Deghmane A-E & Taha M-K (2016) *Neisseria meningitidis* Serogroup X in Sub-Saharan Africa. *Emerg Infect Dis* 22(4):698-702.
- Ambur OH, Frye SA, Nilsen M, Hovland E & Tønjum T (2012) Restriction and Sequence Alterations Affect DNA Uptake Sequence-Dependent Transformation in *Neisseria meningitidis*. *PLOS ONE* 7(7):e39742.
- Andersson SG & Kurland CG (1998) Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* 6(7):263-268.
- Antonova ES, Bernardy EE & Hammer BK (2012) Natural competence in *Vibrio cholerae* is controlled by a nucleoside scavenging response that requires CytR-dependent anti-activation. *Molecular Microbiology* 86(5):1215-1231.
- Aravind L & Koonin EV (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.
- Babakhani S & Oloomi M (2018) Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology* 58(11):905-917.
- Bachellier S, Clement JM, Hofnung M & Gilson E (1997) Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are a major source of sequence polymorphism in *Escherichia coli* intergenic regions including specific associations with a new insertion sequence. *Genetics* 145(3):551-562.
- Baltrus DA, Guillemin K & Phillips PC (2008) Natural transformation increases the rate of adaptation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Evolution* 62(1):39-49.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA & Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)* 315(5819):1709-1712.
- Bath J, Green SJ & Turberfield AJ (2005) A Free-Running DNA Motor Powered by a Nicking Enzyme. *Angewandte Chemie International Edition* 44(28):4358-4361.
- Berge M, Mortier-Barriere I, Martin B & Claverys JP (2003) Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Mol Microbiol* 50(2):527-536.
- Bernstein H, Bernstein C & Michod R (2012) DNA repair as the primary adaptive function of sex in bacteria and eukaryotes. *Int J Med Biol Front* 18:1-50 p
- Beucher M & Sparling PF (1995) Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 177(8):2041-2049.
- Blokesch M (2016) Natural competence for transformation. *Curr Biol* 26(21):R1126-R1130.

- Bobay L-M & Ochman H (2017) The Evolution of Bacterial Genome Architecture. *Frontiers in Genetics* 8(72).
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A & Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(8):2551-2561.
- Broad J & Snape MD (2017) Where next? The emergence of hypervirulent W meningococcus in the Netherlands. *The Lancet. Public health* 2(10):e443-e444.
- Brooks AN, Turkarslan S, Beer KD, Lo FY & Baliga NS (2011) Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3(5):544-561.
- Brynildsrud OB, Eldholm V, Bohlin J, Uadiale K, Obaro S & Caugant DA (2018) Acquisition of virulence genes by a carrier strain gave rise to the ongoing epidemics of meningococcal disease in West Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(21):5510.
- Budroni S, Siena E, Hotopp JCD, Seib KL, Serruto D, Nofroni C, Comanducci M, Riley DR, Daugherty SC, Angiuoli SV, Covacci A, Pizza M, Rappuoli R, Moxon ER, Tettelin H & Medini D (2011) *Neisseria meningitidis*; is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(11):4494.
- Caugant DA, Tzanakaki G & Kriz P (2007) Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev* 31(1):52-63.
- Cehovin A, Simpson PJ, McDowell MA, Brown DR, Noschese R, Pallett M, Brady J, Baldwin GS, Lea SM, Matthews SJ & Pelicic V (2013a) Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(8):3065-3070.
- Chan S-H, Stoddard BL & Xu S-Y (2011) Natural and engineered nicking endonucleases--from cleavage mechanism to engineering of strand-specificity. *Nucleic acids research* 39(1):1-18.
- Chen Z, Yang H & Pavletich NP (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 453:489.
- Cohen-Karni D, Xu D, Apone L, Fomenkov A, Sun Z, Davis PJ, Morey Kinney SR, Yamada-Mabuchi M, Xu S-y, Davis T, Pradhan S, Roberts RJ & Zheng Y (2011) The MspJI family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27):11040.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW & Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(11):3240-3244.
- Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND & Berger JM (2005) The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol* 351(3):545-561.
- Cornelissen CN, Biswas GD, Tsai J, Paruchuri DK, Thompson SA & Sparling PF (1992) Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *J Bacteriol* 174(18):5788-5797.
- Correia FF, Inouye S & Inouye M (1988) A family of small repeated elements with some transposon-like properties in the genome of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* 263(25):12194-12198.

- Coureur M, Join-Lambert O, Lécuyer H, Bourdoulous S, Marullo S & Nassif X (2012) Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence* 3(2):164-172.
- Danna KJ & Nathans D (1972) Bidirectional replication of Simian Virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(11):3097-3100.
- Darmon E & Leach DR (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 78(1):1-39.
- Davidson T & Tønrum T (2006) Meningococcal genome dynamics. *Nature Reviews Microbiology* 4(1):11-22.
- de Wit E & de Laat W (2012) A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes & development* 26(1):11-24.
- Deasy AM, Guccione E, Dale AP, Andrews N, Evans CM, Bennett JS, Bratcher HB, Maiden MC, Gorringer AR & Read RC (2015) Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: a controlled human infection study. *Clinical Infectious Diseases* 60(10):1512-1520.
- Delilhas N (2008) Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Molecular microbiology* 67(3):475-481.
- Delilhas N (2011) Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution. *Genome Biol Evol* 3:959-973.
- Dorer MS, Fero J & Salama NR (2010) DNA Damage Triggers Genetic Exchange in *Helicobacter pylori*. *PLOS Pathogens* 6(7):e1001026.
- Dryden DT, Murray NE & Rao DN (2001) Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic acids research* 29(18):3728-3741.
- Dubnau D (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews* 55(3):395-424.
- Dubnau D (1999) DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology* 53:217-244.
- Dunin-Horkawicz S, Feder M & Bujnicki JM (2006) Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily. *BMC Genomics* 7:98.
- Engelmoer DJP, Donaldson I & Rozen DE (2013) Conservative Sex and the Benefits of Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Pathogens* 9(11):e1003758.
- Erwin AL & Gotschlich EC (1993) Oxidation of D-lactate and L-lactate by *Neisseria meningitidis*: purification and cloning of meningococcal D-lactate dehydrogenase. *Journal of bacteriology* 175(20):6382-6391.
- Erwin AL & Gotschlich EC (1996) Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-lactate dehydrogenase (L-LDH): evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. *J Bacteriol* 178(16):4807-4813.
- Evgen'ev MB & Arkhipova IR (2005) Penelope-like elements--a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenetic and genome research* 110(1-4):510-521.
- Frank T, Hong E, Mbecko JR, Lombart JP, Taha MK & Rubbo PA (2018) Emergence of *Neisseria meningitidis* Serogroup W, Central African Republic, 2015-2016. *Emerg Infect Dis* 24(11):2080-2083.
- Frye SA, Nilsen M, Tonjum T & Ambur OH (2013) Dialects of the DNA uptake sequence in *Neisseriaceae*. *PLoS Genet* 9(4):e1003458.

- Fukui K, Harada A, Wakamatsu T, Minobe A, Ohshita K, Ashiuchi M & Yano T (2018) The GIY-YIG endonuclease domain of *Arabidopsis* MutS homolog 1 specifically binds to branched DNA structures. *FEBS Lett* 592(24):4066-4077.
- Gangel H, Hepp C, Müller S, Oldewurtel ER, Aas FE, Koomey M & Maier B (2014a) Concerted spatio-temporal dynamics of imported DNA and ComE DNA uptake protein during gonococcal transformation. *PLoS pathogens* 10(4):e1004043-e1004043.
- Gangel H, Hepp C, Müller S, Oldewurtel ER, Aas FE, Koomey M & Maier B (2014b) Concerted Spatio-Temporal Dynamics of Imported DNA and ComE DNA Uptake Protein during Gonococcal Transformation. *PLOS Pathogens* 10(4):e1004043.
- Gomes AÉI, Stuchi LP, Siqueira NMG, Henrique JB, Vicentini R, Ribeiro ML, Darrieux M & Ferraz LFC (2018) Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. *Scientific Reports* 8(1):9001.
- Guiddir T, Deghmane AE, Giorgini D & Taha MK (2014) Lipocalin 2 in cerebrospinal fluid as a marker of acute bacterial meningitis. *BMC Infect Dis* 14:276.
- Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT & Dillard JP (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 55(6):1704-1721.
- Hansen CM, Himschoot EA, Hare RF, Meixell BW, Hemert CV & Hueffer K (2017) *Neisseria arctica* sp. nov., isolated from nonviable eggs of greater white-fronted geese (*Anser albifrons*) in Arctic Alaska. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(5):1115-1119.
- Hauck CR & Meyer TF (2003) 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Current opinion in microbiology* 6(1):43-49.
- Håvarstein L, Coomaraswamy G & Morrison DA (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(24):11140-11144.
- Hepp C, Gangel H, Henseler K, Günther N & Maier B (2016) Single-Stranded DNA Uptake during Gonococcal Transformation. *Journal of bacteriology* 198(18):2515-2523.
- Higgins LS, Besnier C & Kong H (2001) The nicking endonuclease N.BstNBI is closely related to type IIs restriction endonucleases MlyI and PleI. *Nucleic acids research* 29(12):2492-2501.
- Hill SA & Davies JK (2009) Pilin gene variation in *Neisseria gonorrhoeae*: reassessing the old paradigms. *FEMS microbiology reviews* 33(3):521-530.
- Hovland E, Beyene GT, Frye SA, Homberset H, Balasingham SV, Gomez-Munoz M, Derrick JP, Tonjum T & Ambur OH (2017) DprA from *Neisseria meningitidis*: properties and role in natural competence for transformation. *Microbiology* 163(7):1016-1029.
- Hülter N, Sørum V, Borch-Pedersen K, Liljegren MM, Utne ALG, Primicerio R, Harms K & Johnsen PJ (2017) Costs and benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *BMC Microbiology* 17(1):34.
- Iaffaldano L, Granata I, Pagliuca C, Esposito MV, Casaburi G, Salerno G, Colicchio R, Piccirillo M, Ciacci C, Del Vecchio Blanco G, Guarracino MR, Salvatore P, Salvatore F, D'Argenio V & Sacchetti L (2018) Oropharyngeal microbiome evaluation highlights *Neisseria* abundance in active celiac patients. *Scientific Reports* 8(1):11047.

- Ieva R, Alaimo C, Delany I, Spohn G, Rappuoli R & Scarlato V (2005) CrgA is an inducible LysR-type regulator of *Neisseria meningitidis*, acting both as a repressor and as an activator of gene transcription. *Journal of bacteriology* 187(10):3421-3430.
- Jesse J, Bloom, FR., Trinh, T. (2005) *Methods for lyophilizing competent cells*. (USA) Attribué.
- Johansson L, Rytönen A, Bergman P, Albiger B, Kallstrom H, Hokfelt T, Agerberth B, Cattaneo R & Jonsson AB (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science (New York, N.Y.)* 301(5631):373-375.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P & Claverys J-P (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12:181.
- Kim WJ, Higashi D, Goytia M, Rendon MA, Pilligua-Lucas M, Bronnimann M, McLean JA, Duncan J, Trees D, Jerse AE & So M (2019) Commensal *Neisseria* Kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-Dependent Mechanism. *Cell Host Microbe* 10.1016/j.chom.2019.07.003.
- Kisiela DI, Chattopadhyay S, Libby SJ, Karlinsey JE, Fang FC, Tchesnokova V, Kramer JJ, Beskhebnaya V, Samadpour M, Grzymajlo K, Ugorski M, Lankau EW, Mackie RI, Clegg S & Sokurenko EV (2012) Evolution of *Salmonella enterica* Virulence via Point Mutations in the Fimbrial Adhesin. *PLOS Pathogens* 8(6):e1002733.
- Konkol MA, Blair KM & Kearns DB (2013) Plasmid-Encoded ComI Inhibits Competence in the Ancestral 3610 Strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 195(18):4085.
- Kuo C-H, Moran NA & Ochman H (2009) The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. *Genome research* 19(8):1450-1454.
- Kwiatkiewicz A, Luczkiewicz M, Bandyra K, Stein DC & Piekarczyk A (2010) *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 carries genes encoding two classes of Vsr endonucleases. *J Bacteriol* 192(15):3951-3960.
- Lerminiaux NA & Cameron ADS (2019) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* 65(1):34-44.
- Levin BR & Cornejo OE (2009) The population and evolutionary dynamics of homologous gene recombination in bacterial populations. *PLoS Genet* 5(8):e1000601.
- Liu G, Tang CM & Exley RM (2015) Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology* 161(7):1297-1312.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4):402-408.
- Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M & de la Cruz Fd F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* 45(1):1-8.
- Loenen WAM, Dryden DTF, Raleigh EA, Wilson GG & Murray NE (2014) Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic acids research* 42(1):3-19.
- Londoño-Vallejo JA & Dubnau D (1994) Membrane association and role in DNA uptake of the *Bacillus subtilis* PriA anaigoue ComF1. *Molecular Microbiology* 13(2):197-205.
- Lynch M & Conery JS (2003) The Origins of Genome Complexity. *Science (New York, N.Y.)* 302(5649):1401.

- MacFadyen LP, Chen D, Vo HC, Liao D, Sinotte R & Redfield RJ (2001) Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Mol Microbiol* 40(3):700-707.
- Makarova KS & Koonin EV (2015) Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1311:47-75.
- Matthey N & Blokesch M (2016) The DNA-Uptake Process of Naturally Competent *Vibrio cholerae*. *Trends in Microbiology* 24(2):98-110.
- McCarthy C, Snyder ML & Parker RB (1965) The Indigenous Oral Flora Of Man. I. The Newborn To The 1-Year-Old Infant. *Archives of oral biology* 10:61-70.
- McQuillen DP, Gulati S & Rice PA (1994) Complement-mediated bacterial killing assays. *Methods in enzymology* 236:137-147.
- Mejean V & Claverys JP (1993) DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 268(8):5594-5599.
- Mell JC & Redfield RJ (2014) Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol* 196(8):1471-1483.
- Messing SAJ, Ton-Hoang B, Hickman AB, McCubbin AJ, Peaslee GF, Ghirlando R, Chandler M & Dyda F (2012) The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindrome bound to its associated nuclease. *Nucleic acids research* 40(19):9964-9979.
- Moe GR & Granoff DM (2001) Molecular Mimetics of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Polysaccharide. *International Reviews of Immunology* 20(2):201-220.
- Mojica FJ, Díez-Villasenor C, García-Martínez J & Soria E (2005a) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 60(2):174-182.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J & Soria E (2005b) Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of molecular evolution* 60(2):174-182.
- Morrison DA, Mortier-Barriere I, Attaiech L & Claverys JP (2007) Identification of the major protein component of the pneumococcal eclipse complex. *J Bacteriol* 189(17):6497-6500.
- Mortier-Barriere I, Velten M, Dupaigne P, Mirouze N, Pietrement O, McGovern S, Fichant G, Martin B, Noirot P, Le Cam E, Polard P & Claverys JP (2007) A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* 130(5):824-836.
- Moxon R, Bayliss C & Hood D (2006) Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annual review of genetics* 40:307-333.
- Moxon R & Kussell E (2017) The impact of bottlenecks on microbial survival, adaptation, and phenotypic switching in host-pathogen interactions. *Evolution; international journal of organic evolution* 71(12):2803-2816.
- Nassif X, Beretti JL, Lowy J, Stenberg P, O'Gaora P, Pfeifer J, Normark S & So M (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(9):3769-3773.

- Neisser A (1879) Über eine des Gonorrhoe eigenthümliche Micrococcusform. *Centralblatt für medizinische Wissenschaft* 17:497-500.
- Norlander L, Davies J & Normark S (1979) Genetic exchange mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of bacteriology* 138(3):756-761.
- Parkinson JS (2016) Classic Spotlight: the Discovery of Bacterial Transduction. *Journal of Bacteriology* 198(21):2899.
- Pettersson A, Maas A & Tommassen J (1994) Identification of the *iroA* gene product of *Neisseria meningitidis* as a lactoferrin receptor. *Journal of Bacteriology* 176(6):1764.
- Piepenbrink KH (2019) DNA Uptake by Type IV Filaments. *Front Mol Biosci* 6:1.
- Pourcel C, Salvignol G & Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151(3):653-663.
- 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, Cham10.1007/978-3-319-69078-0_13. p 327-370.
- Pron B, Taha MK, Rambaud C, Fournet JC, Pattey N, Monnet JP, Musilek M, Beretti JL & Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood- brain barrier correlates with an increased expression of PilC. *Journal of Infectious Diseases* 176(5):1285-1292.
- Provedi R, Chen I & Dubnau D (2001) NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 40(3):634-644.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B & Claverys JP (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science (New York, N.Y.)* 313(5783):89-92.
- Roberts RJ (2005) How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(17):5905.
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw P-C, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JMB, Wilson GG & Xu S-y (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic acids research* 31(7):1805-1812.
- Roberts RJ, Vincze T, Posfai J & Macelis D (2015) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic acids research* 43(Database issue):D298-D299.
- Rocha EPC (2005) Inference and Analysis of the Relative Stability of Bacterial Chromosomes. *Molecular Biology and Evolution* 23(3):513-522.
- Rohde KH & Dyer DW (2003) Mechanisms of iron acquisition by the human pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8:d1186-1218.

- Rotman E & Seifert HS (2014) The Genetics of *Neisseria* Species. *Annual review of genetics* 48(1):405-431.
- Rouphael NG & Stephens DS (2012) *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol* 799:1-20.
- Rusniok C, Vallenet D, Floquet S, Ewles H, Mouz -Soulama C, Brown D, Lajus A, Buchrieser C, M digue C, Glaser P & Pelicic V (2009) NeMeSys: a biological resource for narrowing the gap between sequence and function in the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genome Biology* 10(10):R110.
- Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H & Hattori M (2014) Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 21(1):15-25.
- Sakashita G, Kiyoi H, Naoe T & Urano T (2018) Analysis of the oligomeric states of nucleophosmin using size exclusion chromatography. *Scientific Reports* 8(1):4008.
- Santala V, Karp M & Santala S (2016) Bioluminescence-based system for rapid detection of natural transformation. *FEMS Microbiol Lett* 363(13).
- Saravanan M, Bujnicki JM, Cymerman IA, Rao DN & Nagaraja V (2004) Type II restriction endonuclease R.KpnI is a member of the HNH nuclease superfamily. *Nucleic Acids Research* 32(20):6129-6135.
- Schmitz JE & Stratton CW (2015) Chapter 98 - *Neisseria meningitidis*. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I & Schwartzman J ( dit.) Academic Press, Boston 10.1016. p 1729-1750.
- Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Gl ck A, Brandt P, M ller T, Goesmann A, Joseph B, Konietzny S, Kurzai O, Schmitt C, Friedrich T, Linke B, Vogel U & Frosch M (2008) Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(9):3473-3478.
- Seitz P & Blokesch M (2013) Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37(3):336-363.
- Shmakov SA, Sitnik V, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV & Koonin EV (2017) The CRISPR Spacer Space Is Dominated by Sequences from Species-Specific Mobilomes. *mBio* 8(5):e01397-01317.
- Siguier P, Gourbeyre E & Chandler M (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38(5):865-891.
- Singh PK, Ramachandran G, Duran-Alcalde L, Alonso C, Wu LJ & Meijer WJ (2012) Inhibition of *Bacillus subtilis* natural competence by a native, conjugative plasmid-encoded comK repressor protein. *Environmental microbiology* 14(10):2812-2825.
- Smith AM, Takeuchi R, Pellenz S, Davis L, Maizels N, Monnat RJ & Stoddard BL (2009) Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-Anil LAGLIDADG homing endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(13):5099-5104.

- Song Q, Wu H, Feng F, Zhou G, Kajiyama T & Kambara H (2010) Pyrosequencing on nicked dsDNA generated by nicking endonucleases. *Analytical chemistry* 82(5):2074-2081.
- Stephens DS, Hoffman LH & McGee ZA (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 148(3):369-376.
- Sutherland TC, Quattroni P, Exley RM & Tang CM (2010) Transcellular Passage of *Neisseria meningitidis* across a Polarized Respiratory Epithelium. *Infection and Immunity* 78(9):3832.
- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu L-J, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD & Stephens DS (1997) Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(1):271-276.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U & Magrini N (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases* 18(3):318-327.
- Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA & Unemo M (2009) Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert review of anti-infective therapy* 7(7):821-834.
- Tobiason DM & Seifert HS (2006) The Obligate Human Pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, Is Polyploid. *PLOS Biology* 4(6):e185.
- Tønjum T & van Putten J (2017) *Neisseria*. *Infectious Diseases*, 10.1016/b978-0-7020-6285-8.00179-9. p 1553-1564.e1551.
- Treangen TJ, Abraham A-L, Touchon M & Rocha EPC (2009) Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiology Reviews* 33(3):539-571.
- Tsang RS, Law DK, Tyler SD, Stephens GS, Bigham M & Zollinger WD (2005) Potential capsule switching from serogroup Y to B: The characterization of three such *Neisseria meningitidis* isolates causing invasive meningococcal disease in Canada. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology* 16(3):171-174.
- Tzeng Y-L, Bazan JA, Turner AN, Wang X, Retchless AC, Read TD, Toh E, Nelson DE, Del Rio C & Stephens DS (2017) Emergence of a new *Neisseria meningitidis* clonal complex 11 lineage 11.2 clade as an effective urogenital pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(16):4237.
- Tzeng YL, Martin LE & Stephens DS (2014) Environmental survival of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 142(1):187-190.
- van der Woude MW & Bäumlér AJ (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17(3):581-611.
- van Nierop GP, de Vries AA, Holkers M, Vrijzen KR & Goncalves MA (2009) Stimulation of homology-directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res* 37(17):5725-5736.
- Vashishtha AK, Wang J & Konigsberg WH (2016) Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *J Biol Chem* 291(40):20869-20875.

- Vasu K & Nagaraja V (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(1):53-72.
- Veening JW & Blokesch M (2017) Interbacterial predation as a strategy for DNA acquisition in naturally competent bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15(10):621-629.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B & Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science (New York, N.Y.)* 270(5235):484-487.
- Verhoeven EE, van Kesteren M, Moolenaar GF, Visse R & Goosen N (2000) Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *J Biol Chem* 275(7):5120-5123.
- Veyrier FJ, Biais N, Morales P, Belkacem N, Guillhen C, Ranjeva S, Sismeiro O, Pehau-Arnaudet G, Rocha EP, Werts C, Taha MK & Boneca IG (2015) Common Cell Shape Evolution of Two Nasopharyngeal Pathogens. *PLoS Genet* 11(7):e1005338.
- Veyrier FJ, Boneca IG, Cellier MF & Taha M-K (2011) A Novel Metal Transporter Mediating Manganese Export (MntX) Regulates the Mn to Fe Intracellular Ratio and *Neisseria meningitidis* Virulence. *PLOS Pathogens* 7(9):e1002261.
- Vouga M & Greub G (2016) Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. *Clinical Microbiology and Infection* 22(1):12-21.
- Wang J, Zheng J, Shi W, Du N, Xu X, Zhang Y, Ji P, Zhang F, Jia Z, Wang Y, Zheng Z, Zhang H & Zhao F (2018) Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus. *Gut* 67(9):1614.
- Wendt KE & Pakrasi HB (2019) Genomics Approaches to Deciphering Natural Transformation in Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 10(1259).
- Weyand NJ, Ma M, Phifer-Rixey M, Taku NA, Rendón MA, Hockenberry AM, Kim WJ, Agellon AB, Biais N, Suzuki TA, Goodyer-Sait L, Harrison OB, Bratcher HB, Nachman MW, Maiden MCJ & So M (2016) Isolation and characterization of *Neisseria musculli* sp. nov., from the wild house mouse. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(9):3585-3593.
- WHO (2011) Meningococcal vaccines: WHO position paper, November 2011. *Releve epidemiologique hebdomadaire* 86(47):521-539.
- Wiedenbeck J & Cohan FM (2011) Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev* 35(5):957-976.
- Windgassen TA, Leroux M, Satyshur KA, Sandler SJ & Keck JL (2018) Structure-specific DNA replication-fork recognition directs helicase and replication restart activities of the PriA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(39):E9075.
- Wolf YI & Koonin EV (2013) Genome reduction as the dominant mode of evolution. *Bioessays* 35(9):829-837.
- Woodford N & Ellington MJ (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 13(1):5-18.
- Wroblewski D, Cole J, McGinnis J, Perez M, Wilson H, Mingle LA, Musser KA & Wolfgang WJ (2017) *Neisseria dumasiana* sp. nov. from human sputum and a dog's mouth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(11):4304-4310.
- Wu Z, Periaswamy B, Sahin O, Yaeger M, Plummer P, Zhai W, Shen Z, Dai L, Chen SL & Zhang Q (2016) Point mutations in the major outer membrane protein drive hypervirulence of a

- rapidly expanding clone of *Campylobacter jejuni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 10.1073/pnas.1605869113:201605869.
- Xu S-Y, Zhu Z, Zhang P, Chan S-H, Samuelson JC, Xiao J, Ingalls D & Wilson GG (2007) Discovery of natural nicking endonucleases Nb.BsrDI and Nb.BtsI and engineering of top-strand nicking variants from BsrDI and BtsI. *Nucleic acids research* 35(14):4608-4618.
- Yang Y, Feye KM, Shi Z, Pavlidis HO, Kogut M, J. Ashworth A & Ricke SC (2019) A Historical Review on Antibiotic Resistance of Foodborne *Campylobacter*. *Frontiers in Microbiology* 10(1509).
- Yi K, Stephens DS & Stojiljkovic I (2003) Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infection and immunity* 71(4):1849-1855.
- Zarantonelli ML, Szatanik M, Giorgini D, Hong E, Huerre M, Guillou F, Alonso JM & Taha MK (2007) Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. *Infect Immun* 75(12):5609-5614.
- Zaura E, Keijser BJ, Huse SM & Crielaard W (2009) Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology* 9(1):259.
- Zelevska MA, Pulijala M, Spencer-Smith R, Mahmood H-T-NA, Norman B, Churchward CP, Calder A & Snyder LAS (2016) Phase variable DNA repeats in *Neisseria gonorrhoeae* influence transcription, translation, and protein sequence variation. *Microbial genomics* 2(8):e000078-e000078.
- Zhang Y (2017) The CRISPR-Cas9 system in *Neisseria* spp. *Pathogens and disease* 75(4):ftx036.
- Zhou K, Aertsen A & Michiels CW (2014) The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiol Rev* 38(1):119-141.
- Zhu Z, Samuelson JC, Zhou J, Dore A & Xu SY (2004) Engineering strand-specific DNA nicking enzymes from the type IIS restriction endonucleases BsaI, BsmBI, and BsmAI. *J Mol Biol* 337(3):573-583.

ANNEXE I : FIGURES SUPPLEMENTAIRES

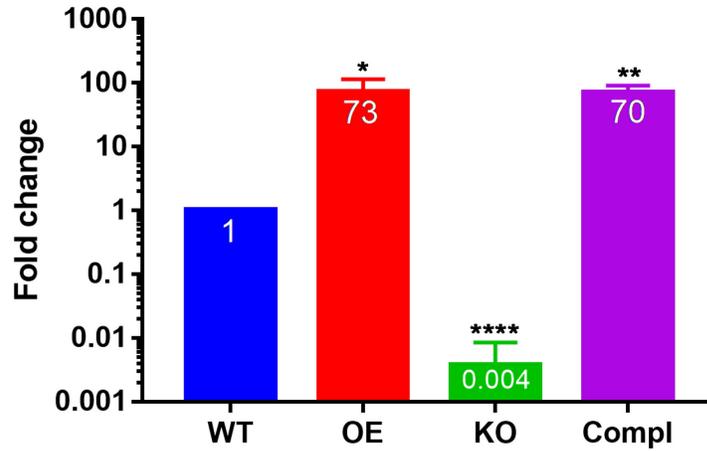


Figure S18 : Expression relative de GspA dans les mutants

Les transcrits de *gspA* ont été quantifiés par RT-qPCR dans les quatre souches de cette étude. La moyenne et l'écart-type de 3 réplicas biologiques provenant d'extractions d'ARN différentes sont présentés. Les mutants ont été comparés au WT par des tests de Student non-pairés. * : p-valeur<0.05, ** : <0.01, *** : <0.001, **** : <0.0001

ANNEXE II : MATERIELS ET METHODES SUPPLEMENTAIRES

Tableau S1 : Liste des amorces utilisées

| Nom | Séquence (5'→3') | Usage |
|------------------|---|----------------------------------|
| ERAM3 | GCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG | PCR (érytromycine ^R) |
| ERAMup | CCAAGAAGCTAAAGAGGTCCCATTTCAGACG GCAAGCTT | PCR (érytromycine ^R) |
| NMV0044_flank_F | GTCTATCGGTAAACTCGCCAAATA | PCR (gspA) |
| NMV0044_flank_R | TTATCTGAAAGTCCGGGATTCTAG | PCR (gspA) |
| GspABspHIF | GGTTCATGATGCAGCCTGCGGTTTAT | PCR (gspA) |
| GspAPstIR | CGCCTGCAGGGGAATGACGGGCTA | PCR (gspA) |
| POEG44F | GGGGGATCCATGCAGCCTGCGGTTT | PCR (pilEp-gspA) |
| POE44R | CGGGAATTCCGGGCTAAATAATATCAAAC | PCR (pilEp-gspA) |
| Km7-up | GCCGTCTGAATGCTTTTTAGACATCTAAATC TAGG | PCR (Kanamycine ^R) |
| Km6 | CCTCAAATGGTTCGCTGGG | PCR (Kanamycine ^R) |
| qNMV_0034F | TTTGTTCGGTCCGCTGAT | qPCR |
| qNMV_0034R | TCGTTGACCTGTTTGAAGTTG | qPCR |
| qlbpAF | TTCCGCAACCGCTATACC | qPCR |
| qlbpAR | AATCTCTGTCAATCGTCCTGTT | qPCR |
| qNMV_0327F | AACGCTACGGTTACAAC | qPCR |
| qNMV_0327R | CAAGCATGGCATCAACTC | qPCR |
| qfumcF | TGTTTCGTTGAAGCTGTTG | qPCR |
| qfumcR | CGTCTATATGCCTGTTATCG | qPCR |
| qTbpA_2C4.3_F | CGATAAAGACACTTGGGCGG | qPCR |
| qTbpA_2C4.3_R | GCACTCGGACGGCAATATTT | qPCR |
| qLldA_2C4.3_F | TGTCTGCCATCAAAGCCTTG | qPCR |
| qLldA_2C4.3_R | ATCATTGTACCTTTTCGCGCC | qPCR |
| qFetA_2C4.3_F | ACGCACAAAGACAAGCTGTT | qPCR |
| qFetA_2C4.3_R | CCAGCCGATTTCCAGATTCG | qPCR |
| qNMV_1689F | AAGCATTACCGAAGCTGAC | qPCR |
| qNMV_1689R | CTCGCCTAATTTCTTACCTT | qPCR |
| qmrsABF2 | TTTAATCAGCGTCCGTTT | qPCR |
| qmrsABR2 | GCACACTTTATCCACTTTG | qPCR |
| gspAMC F | GCGTTACATCTGATTTGGTGC | qPCR |
| gspAMC R | TGCAATTTCCAAGCCCTGTT | qPCR |
| qRT-ftsY-F | AAGTAGAATCTGAAGTTGCTCAA | qPCR |
| qRT-ftsY-R | CCTTTGACGCTTTCTGCTA | qPCR |
| qPilC2_2C4.3_F | GGTTGGGCGTGTCTTTCAAT | qPCR |
| qPilC2_2C4.3_R | CGTGGTGTGTTGTCCTGATGG | qPCR |
| qMntX_2C4.3_F | CCACCCCGACTATCATGGAA | qPCR |
| qMntX_2C4.3_R | CCAAGCCGTTTATCAGCGAA | qPCR |
| gyrAF | ACTCCGCTGCAAGACAGTTT | qPCR (endogène) |
| gyrAR | GAAAAGCGTACGTCCGGTAA | qPCR (endogène) |
| pGEM_SeqNick_F12 | TAACGATCTGGCCGATGTGG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F11 | AGCTGGTGGGAGAAAATGAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F10 | TGCTTGAAACCCAGGACAAT | PCR avec radiomarquage |

| | | |
|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| pGEM_SeqNick_F9 | TTTCCCAGTCACGACGTTGT | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F8 | GCCCACTACGTGAACCATCA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F7 | AGGGTTATTGTCTCATGAGCGG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F6 | GAATAGTGTATGCGGCGACC | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F5 | AATAAACCCAGCCAGCCGGAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F4 | CAGCAGATTACGCGCAGAAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F3 | CTCCAAGCTGGGCTGTGTG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F2 | CAGCTCACTCAAAGGCGGTA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_F1 | GCATTCAGACGGCAATCACT | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R12 | CTCCCATATGGTCGACCTGC | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R11 | AAAATCATACAGCTCGCGCG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R10 | TGTCCTTTTCCCGTTCCACA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R9 | TCGACGGAGCCGATTTTGAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R8 | GGCCAATTCGCCCTATAGT | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R7 | TCAAGCTCTAAATCGGGGGC | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R6 | GCATCAGGTGGCACTTTTCG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R5 | ATGTGGCGCGGTATTATCCC | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R4 | CTCTAGCTTCCCGGCAACAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R3 | GCGTCAGACCCCGTAGAAAA | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R2 | AGTTACCGGATAAGGCGCAG | PCR avec radiomarquage |
| pGEM_SeqNick_R1 | TTTGCTGGCCTTTTGCTCAC | PCR avec radiomarquage |
| sRNABioF | CGGCATTTTTATCAAATTCAA | PCR avec radiomarquage (MC58) |
| sRNAR | GCGGATTCGATAGAAAAACATC | PCR avec radiomarquage (MC58) |
| RS_gspA_2C4.3_F | GAGAGCGCAATTACTCGGGA | PCR avec radiomarquage (2C4.3) |
| RS_gspA_2C4.3_R | ACCCGATAAGTTTCCGTGCC | PCR avec radiomarquage (2C4.3) |

Toutes les amorces proviennent de Sigma-Aldrich.