

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

Rôle des protéines BoliA dans la régulation des gènes et la morphologie de *Neisseria elongata*

Par
Florian Mickaël Coudray

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Salim Islam
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie
Institut National de la Recherche
scientifique (INRS)

Examineur externe

Sven van Teeffelen
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Frédéric Veyrier
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie
Institut National de la Recherche
scientifique (INRS)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Frédéric Veyrier pour m'avoir offert la chance de réaliser ma maîtrise au sein de son laboratoire. Je le remercie de m'avoir accueilli et de m'avoir guidé tout au long de mon projet. Grâce à son aide et à son soutien, j'ai su m'améliorer et découvrir de nouvelles méthodes essentielles à la recherche. Tu m'as montré une nouvelle façon d'approcher la recherche dans le but de bien faire les choses. Je l'ai comprise et je te remercie de m'avoir fait confiance jusqu'au bout. Merci pour tout.

Je remercie également le Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologies de l'Institut National de la Recherche Scientifique de Laval au Québec pour m'avoir proposé une formation unique en son genre. Je suis venu au Canada pour mélanger études et recherches et j'ai pris un réel plaisir à réaliser mon projet dans un tel centre de recherche.

Durant ces deux ans, mes collègues et amis ont toujours été là pour m'aider et me soutenir. Je veux remercier Sammy et Cécilia pour le soutien dont j'avais besoin et qu'ils m'ont offert. Merci beaucoup pour cette amitié, elle compte énormément pour moi.

Un grand merci à Martin et à Ève. Je vous connais depuis mon stage de 2019 et ça a toujours été agréable de travailler avec vous. Merci pour votre aide précieuse et pour les nombreux conseils que vous avez su me donner. Je n'y serais pas arrivé sans vous.

Merci à Alex, Laxmi et Garima, d'une part pour votre aide dans la réalisation de mon projet, mais également pour ces discussions agréables. Ça fait du bien de découvrir des personnes venues des quatre coins du monde.

Francisco et Arnaldo, je vous dois beaucoup. Votre aide m'a été très précieuse dans la réalisation de mes analyses et je ne vous remercierai jamais assez. Tout en prenant de votre temps inestimable, vous m'avez rendu de grands services. Je n'oublierai pas votre soutien.

Merci à toi Mathilde, ma voisine de paillasse. On a eu de la chance d'avoir réalisé notre maîtrise en même temps, sinon ça aurait été encore plus difficile. Merci pour avoir rendu chacune de mes journées, plus drôle que la précédente.

Merci à vous tous, chers collègues et amis pour votre aide si précieuse et pour tous ces bons moments passés ensemble.

RÉSUMÉ

Le genre *Neisseria* est composé d'espèces de bactéries dotées d'une capacité d'adaptation importante. Pour s'adapter et résister aux attaques du système immunitaire de l'être humain, les espèces de *Neisseria* commensales de la bouche ont évolué grâce à divers événements évolutifs. Entre autres, nous avons observé que certaines espèces de *Neisseria* ont modifié leur morphologie ainsi que la constitution de leur enveloppe afin de s'adapter à une nouvelle niche écologique, le nasopharynx.

Le laboratoire de Frédéric Veyrier tente de retracer les événements génétiques apparus lors de l'évolution des *Neisseria* afin de comprendre comment cette adaptation a amené l'apparition de pathogènes symbiotiques de l'être humain au niveau du nasopharynx. Les événements génétiques consistant en des insertions et suppressions de gènes ne suffisent pas à retracer l'évolution naturelle des *Neisseria*. Le laboratoire s'est alors tourné vers l'apparition de changements d'acides aminés dans les protéines. Grâce à la bio-informatique, nous avons identifié la protéine BolA1 dont une substitution d'acide aminé aurait accompagné la transition morphologique et la modification de l'enveloppe des *Neisseria*.

Nous nous sommes intéressés à cette protéine car elle appartient à une famille de régulateurs de réponse nommée BolA qui est souvent associée à l'intégrité de l'enveloppe et de la morphologie. Nous avons également identifié chez les *Neisseria* une deuxième protéine appartenant à cette famille que nous avons appelée BolA2. Ce projet consiste donc à comprendre l'impact de la mutation sur la fonction protéique de BolA1 et donc sur l'adaptation des *Neisseria*, mais également à comprendre le rôle des protéines BolA1 et BolA2 chez les *Neisseria*.

Mots-clés : évolution ; régulateur ; enveloppe ; stress ; morphologie

ABSTRACT

The genus *Neisseria* is composed of species with a significant capacity for adaptation. In order to adapt and resist the attacks of the human immune system, the oral commensal species of *Neisseria* have evolved through various evolutionary events. Among others, we have observed that some species of *Neisseria* have evolved a different morphology and a different constitution of their envelope in order to adapt to a new ecological niche, the nasopharynx.

Veyrier laboratory is trying to retrace the genetic events that occurred during the evolution of *Neisseria* in order to understand how this adaptation has led to the appearance of symbiotic pathogens in the nasopharynx of human beings. Genetic events consisting of gene insertions and deletions are not sufficient to trace the natural evolution of *Neisseria*. The laboratory then turned to the appearance of amino acid changes in proteins. Thanks to bioinformatics, we have identified the BolA1 protein whose amino acid substitution would have accompanied the morphological transition and the modification of the envelope of *Neisseria*.

We were interested in this protein because it belongs to a family of response regulators called BolA associated with envelope integrity and morphology. We have also identified a second protein belonging to this family in *Neisseria* that we have named BolA2. This project consists in understanding the impact of the mutation on the protein function of BolA1 and thus on the adaptation of *Neisseria*, but also to understand the role of BolA1 and BolA2 proteins in *Neisseria*.

Keywords: evolution; regulator; envelope; stress; morphology

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVI
1 INTRODUCTION	21
2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	22
2.1 LA FAMILLE DES <i>NEISSERIACEAE</i>	22
2.1.1 <i>Généralités</i>	22
2.1.2 <i>Niches écologiques des Neisseria</i>	24
2.1.3 <i>Les pathogènes au sein des Neisseria</i>	26
2.2 L'ÉVOLUTION DES <i>NEISSERIA</i>	29
2.2.1 <i>L'évolution de la morphologie</i>	30
2.2.2 <i>L'évolution de la composition de la paroi</i>	31
2.2.3 <i>Autres évènements génétiques associés au changement de morphologie</i>	33
2.3 LES PROTÉINES DE TYPE BOLA	36
2.3.1 <i>Généralités</i>	36
2.3.2 <i>La protéine BOLA d'E. coli est le régulateur le plus caractérisé au sein de cette famille</i> ...	38
2.3.3 <i>La protéine IbaG est un homologue de la protéine BOLA impliqué dans le stress et la morphologie</i>	47
3 HYPOTHESE ET OBJECTIFS	52
4 MATERIEL ET METHODES	54
4.1 SOUCHES BACTERIENNES, PLASMIDES ET AMORCES	54
4.1.1 <i>Souches bactériennes</i>	54
4.1.2 <i>Plasmides</i>	55
4.1.3 <i>Amorces</i>	56
4.2 PRÉPARATION DE MILIEUX DE CULTURES.....	58
4.2.1 <i>Généralités</i>	58
4.2.2 <i>Agents de sélection</i>	58
4.3 MANIPULATION DES SOUCHES	59
4.3.1 <i>Conservation des souches</i>	59
4.3.2 <i>Incubation et manipulation des souches</i>	59
4.4 ANALYSES IN SILICO.....	60

4.4.1	<i>Prédictions de structures protéiques AlphaFold</i>	60
4.4.2	<i>Prédictions de structures secondaires</i>	60
4.4.3	<i>Alignement de structures topologiques entre protéines</i>	61
4.4.4	<i>Alignements protéiques</i>	61
4.4.5	<i>Prédiction des potentiels sites de phosphorylation</i>	61
4.5	CREATION DE MUTANTS	62
4.5.1	<i>Méthode marquée</i>	62
4.5.2	<i>Méthode non marquée</i>	62
4.6	SEQUENÇAGE DES ARN	65
4.7	ANALYSES PHENOTYPIQUES	67
5	RESULTATS	69
5.1	LES PROTEINES DE TYPE BOLA CHEZ LES <i>NEISSERIA</i>	69
5.2	ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES	77
5.2.1	<i>Le rôle de la protéine Bola1 dans la régulation des gènes de N. elongata</i>	77
5.2.2	<i>Le rôle de la protéine Bola2 dans le transcriptome de N. elongata</i>	87
5.3	ANALYSES PHENOTYPIQUES	91
5.3.1	<i>Le rôle de la protéine Bola1 dans la morphologie de N. elongata</i>	91
5.3.2	<i>Le rôle de la protéine Bola2 dans la morphologie de N. elongata</i>	95
6	DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	100
6.1	LE ROLE TRANSCRIPTOMIQUE DES PROTEINES DE TYPE BOLA CHEZ LES <i>NEISSERIA</i>	100
6.2	LE ROLE DES PROTEINES DE TYPE BOLA DANS LA MORPHOLOGIE DE <i>NEISSERIA</i>	102
6.3	LA PROTEINE BOLA1 N'EST PAS LA SEULE A AVOIR SUBI DES CHANGEMENTS D'ACIDE AMINE LORS DE LA TRANSITION MORPHOLOGIQUE	104
7	BIBLIOGRAPHIE	107
8	ANNEXE	118

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	ARBRE EVOLUTIF DE LA FAMILLE DES NEISSERIACEAE.....	23
FIGURE 2.2	REPRESENTATION DES VOIES RESPIRATOIRES DE L'ETRE HUMAIN.....	24
FIGURE 2.3	VUE SAGITTALE DES VOIES GENITALES DE LA FEMME ET DE L'HOMME.....	25
FIGURE 2.4	<i>N. MENINGITIDIS</i> EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (12 000×).....	27
FIGURE 2.5	<i>N. GONORRHOEAE</i> EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (55 000×).....	28
FIGURE 2.6	ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE DES <i>NEISSERIACEAE</i>	29
FIGURE 2.7	EVOLUTION <i>IN VITRO</i> REALISEE CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	30
FIGURE 2.8	REPRESENTATION DES CHAINES PEPTIDIQUES LATERALES RETROUVEES AU SEIN DU PEPTIDOGLYCANE	31
FIGURE 2.9	QUANTIFICATION <i>IN VITRO</i> DE LA RECONNAISSANCE DU PEPTIDOGLYCANE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	32
FIGURE 2.10	DESCRIPTION DU CONCEPT DU LOGICIEL CAPRIB.....	34
FIGURE 2.11	L'APPARITION DE LA MUTATION A93K AU NIVEAU DE LA PROTEINE BOLA1 EST LIEE A LA TRANSITION MORPHOLOGIQUE DES <i>NEISSERIA</i>	35
FIGURE 2.12	REPARTITION DES HOMOLOGUES DES PROTEINES DE TYPE BOLA DANS LE VIVANT	36
FIGURE 2.13	ALIGNEMENT DE LA PROTEINE BOLA PROVENANT D' <i>E. COLI</i> ET DE <i>S. TYPHIMURIUM</i>	37
FIGURE 2.14	PREDICTION ALPHAFOLD DE LA PROTEINE BOLA D' <i>E. COLI</i> (CODE PDB 2DHM).....	38
FIGURE 2.15	ACTIVITE DU PROMOTEUR <i>BOLA1P</i> CHEZ <i>E. COLI</i>	40
FIGURE 2.16	DIFFERENTES ETAPES DE LA FORMATION D'UN BIOFILM.....	41
FIGURE 2.17	LA PROTEINE BOLA MODULE LA MORPHOLOGIE CHEZ <i>E. COLI</i>	42
FIGURE 2.18	REPRESENTATION DE LA MACHINERIE D'ELONGATION AINSI QUE DE LA MACHINERIE DE DIVISION AU SEIN D'UN BACILLE	43
FIGURE 2.19	L'EXPRESSION DE LA PROTEINE MREB MESUREE PAR WESTERN BLOT DEPEND DE LA PRESENCE DE LA PROTEINE BOLA CHEZ <i>E. COLI</i>	44
FIGURE 2.20	CHANGEMENTS DE LA MORPHOLOGIE CHEZ <i>E. COLI</i> EN LIEN AVEC LES PBP5 ET 6 ET BOLA.....	45
FIGURE 2.21	L'EXPRESSION DE MREB CHEZ <i>E. COLI</i> EST MEDIEE PAR BOLA ET DES PBP5 ET 6.....	46
FIGURE 2.22	LA PERTE DU GENE <i>FTSZ</i> ASSOCIEE A LA SUREXPRESSION DE LA PROTEINE BOLA EMPECHE LA FORMATION DE BACTERIES RONDRES.....	47

FIGURE 2.23	PREDICTION ALPHAFOLD DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE IBAG D' <i>E. COLI</i> (CODE PDB 1NY8)	48
FIGURE 2.24	POSITION DU GENE <i>IBAG</i> AU SEIN DU GENOME D' <i>E. COLI</i>	49
FIGURE 2.25	IBAG EST IMPLIQUE DANS L'INTEGRITE DE L'ENVELOPPE ET DANS LA MORPHOLOGIE CHEZ <i>V. CHOLERAE</i>	50
FIGURE 2.26	GENES REGULES PAR IBAG CHEZ <i>V. CHOLERAE</i>	50
FIGURE 5.1	CONTEXTE GENOMIQUE DU GENE <i>BOLA1</i> CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	69
FIGURE 5.2	PREDICTION ALPHAFOLD DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE BOLA1 (N°AF-A0A378U1L1-F1) CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	70
FIGURE 5.3	PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES DE LA PROTEINE BOLA1 DE <i>N. ELONGATA</i>	70
FIGURE 5.4	CONTEXTE GENOMIQUE DU GENE <i>BOLA2</i> CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	71
FIGURE 5.5	PREDICTION ALPHAFOLD DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE BOLA2 CHEZ <i>N. ELONGATA</i> (N°AF-D4DPH8-F1)	72
FIGURE 5.6	PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES DE LA PROTEINE BOLA2 DE <i>N. ELONGATA</i>	72
FIGURE 5.7	PREDICTION ALPHAFOLD DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE BOLA1 _{NM} CHEZ <i>N. MENINGITIDIS</i> (N°AF-C6SBS6-F1)	75
FIGURE 5.8	ALIGNEMENT DE LA PROTEINE BOLA1 (<i>N. ELONGATA</i> ET <i>N. MENINGITIDIS</i>) AVEC L'HOMOLOGUE BOLA (<i>E. COLI</i>) ET PREDICTION DES POTENTIELS SITES DE PHOSPHORYLATION	76
FIGURE 5.9	PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES DE LA PROTEINE BOLA1 DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	76
FIGURE 5.10	GENES SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES PAR <i>BOLA1</i> CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	77
FIGURE 5.11	LES GENES <i>FHS</i> ET <i>METF</i> SONT REPRIMES PAR BOLA1	79
FIGURE 5.12	LIEN ENTRE LE COFACTEUR SYNTHETISE PAR LA VOIE DU OCP ET LE GENE <i>METE</i> DANS LA SYNTHESE DE METHIONINE	80
FIGURE 5.13	IMPLICATION DE L'EXONUCLEASE VII DANS LA REPARATION DE MISMATCHS.....	83
FIGURE 5.14	DE NOMBREUX GENES CODANT POUR DES PROTEINES RIBOSOMALES SONT IMPACTES PAR LA SUREXPRESSION DE BOLA1 _{NM}	84
FIGURE 5.15	CYCLE DE LA METHIONINE ET DU FOLATE, LIES A LA SYNTHESE DE CYSTEINE.....	86
FIGURE 5.16	PILA FAIT PARTIE D'UN ENSEMBLE DE NOMBREUSES PROTEINES ESSENTIELLES A LA FORMATION DU PILUS DE TYPE IV.....	87
FIGURE 5.17	GENES SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES PAR BOLA2 CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	88

FIGURE 5.18	ROLE DE LA PROTEINE PUTA DANS L'OXYDATION DE LA PROLINE EN GLUTAMATE.....	91
FIGURE 5.19	ETUDE DE LA PROTEINE BOLA1 CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	92
FIGURE 5.20	REPARTITION DE LA LONGUEUR DES CELLULES DANS LES DIFFERENTES SOUCHES DE <i>N. ELONGATA</i>	93
FIGURE 5.21	ETUDE DE LA PROTEINE BOLA2 CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	96
FIGURE 5.22	REPARTITION DE LA LONGUEUR DES CELLULES DANS LES DIFFERENTES SOUCHES DE <i>N. ELONGATA</i>	97
FIGURE 8.1	ARBRE PHYLOGENETIQUE BASE SUR 84 PROTEINES DE TYPE BOLA.....	118

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 4.1	SOUCHES UTILISEES LORS DE CE PROJET	55
TABLEAU 4.2	PLASMIDES UTILISES LORS DE CE PROJET.....	56
TABLEAU 4.3	AMORCES UTILISEES LORS DE CE PROJET	57
TABLEAU 4.4	AGENTS DE SELECTION ET DIFFERENTES CONCENTRATIONS UTILISES LORS DE CE PROJET	59
TABLEAU 5.1	POURCENTAGES D'IDENTITE ENTRE LES PROTEINES DE TYPE BOLA RETROUVEES CHEZ <i>E. COLI</i> ET CHEZ <i>N. ELONGATA</i>	74
TABLEAU 5.2	GENES SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES LORSQUE <i>BOLA1</i> EST SUPPRIME CHEZ <i>N. ELONGATA</i> (SOURCE UNIPROT).....	78
TABLEAU 5.3	GENES SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES PAR LA SUREXPRESSION DU GENE <i>BOLA1_{NM}</i> (SOURCE UNIPROT) 82	
TABLEAU 5.4	GENES SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES PAR <i>BOLA2</i> CHEZ <i>N. ELONGATA</i> (SOURCE UNIPROT)...	89
TABLEAU 5.5	COMPARAISONS DE LA LONGUEUR DES CELLULES DANS LE CADRE DE L'ETUDE DE <i>BOLA1</i> (TEST DE MANN-WHITNEY).....	94
TABLEAU 5.6	COMPARAISONS DE LA LONGUEUR DES CELLULES DANS LE CADRE DE L'ETUDE DE <i>BOLA2</i> (TEST DE MANN-WHITNEY).....	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

A : Alanine
ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNe : Acide DésoxyriboNucléique environnemental
ADNsb : Acide DésoxyriboNucléique simple brin
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert

B

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool Program

C

CDS : CoDing Sequences
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

D

DO : Densité Optique

E

E. : *Escherichia*
EMS : Electron Microscopie Science

F

FC : Fold Change
FtsZ : Filamenting temperature-sensitive mutant Z

G

GCB: Gonococcal Base

H

HCH : Hélice-Coude-Hélice
hNod: human Nucleotide oligomerization domain
HP : Hypothetical Protein

I

IbaG : Influenced by acid Gene
IPTG : IsoPropyl β -D-1-ThioGalactoyranoside

K

K_2HPO_4 : Hydrogénophosphate de potassium
 KH_2PO_4 : Phosphate de potassium monobasique

L

L : Lysine
LB : Lysogeny Broth

M

MET : Microscopie Électronique à
Transmission

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison
by Log-Expectation)

MST : Maladie Sexuellement Transmissible

N

N. : *Neisseria*

NaCl : Chlorure de Sodium

NCBI : National Center for Biotechnology
Information

O

OCP : One Carbon Pool

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAPI : Poly(A) Polymerase I

Pb : Paire de base

PBB : Protein Data Bank

PCR : Polymerisation Chain Reaction

R

rpm : rotation par minute

RNAses : RiboNucléAses

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SAM : S-AdénosylMéthionine

U

US-Align : Universal Structural Alignment of
macromolecules

V

V. : *Vibrio*

1 INTRODUCTION

Ce mémoire présente le projet de recherche que j'ai réalisé au cours de ma maîtrise en microbiologie appliquée au sein du laboratoire du Pr. Frédéric Veyrier au Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie de l'Institut National de la Recherche Scientifique de Laval au Québec. Cette maîtrise a été réalisée à la suite d'un stage réalisé en 2019 à la fin de mon Diplôme Universitaire et Technologique en Analyses Biologiques et Biochimiques de l'Université Clermont Auvergne. Lors de ce stage, j'avais eu l'occasion d'apprendre à travailler en autonomie et en équipe au sein d'un laboratoire de confinement de niveau 2.

C'est durant ce stage-là que j'ai entamé mon travail sur les protéines de type BoIA. J'ai donc repris ce travail lorsque Pr. Veyrier m'a accepté en tant qu'étudiant en Maîtrise au sein de son laboratoire. Entretemps, le laboratoire a développé une nouvelle méthode de clonage qui a facilité nos manipulations génétiques au sein des *Neisseria*. J'ai également apporté mon expérience au projet, me permettant de figurer parmi les co-auteurs de l'article présentant cette méthode.

Cet article écrit par le doctorant Sammy Nyongesa s'intitule « *Sequential markerless genetic manipulations of species from the Neisseria genus* ». Nous y décrivons une méthode permettant de réaliser dans une même souche de *Neisseria* plusieurs modifications génétiques à la suite grâce à la recombinaison homologue, et sans laisser de gène de résistance à la fin du clonage. Grâce à cette méthode, nous avons été capables de réaliser sept événements génétiques consécutifs dans l'espèce *Neisseria elongata*. J'ai utilisé cette méthode au cours de mon projet et celle-ci est décrite dans la partie Matériel et Méthodes. Les résultats peuvent être retrouvés dans l'article « *Sequential markerless genetic manipulations of species from the Neisseria genus* » ([Nyongesa et al., 2022a](#)).

2 REVUE DE LA LITTERATURE

2.1 La famille des *Neisseriaceae*

2.1.1 Généralités

La famille des *Neisseriaceae* est constituée de bactéries à la paroi Gram négative appartenant au phylum des protéobactéries et à la classe des β -protéobactéries. Les espèces retrouvées au sein des *Neisseriaceae* présentent de multiples morphologies avec des bacilles, des coques et des bactéries multicellulaires à division longitudinale. Ces différentes morphologies sont les résultats de divers événements génétiques indépendants chez les *Neisseriaceae* (Figure 2.1) ([Nyongesa et al., 2022b](#); [Veyrier et al., 2015](#)). Ces événements génétiques ont été facilités par la compétence naturelle des espèces de la famille des *Neisseriaceae*. Ces bactéries sont capables d'acquérir de l'ADNe (ADN environnemental) qui provient notamment d'espèces appartenant à la même famille. Grâce à la recombinaison homologue, ces échanges de matériel génétique permettent à ces espèces de s'adapter et d'évoluer plus facilement face aux contraintes environnementales ([Rotman & Seifert, 2014](#)).

entraîner des infections du système respiratoire comme *N. meningitidis* ou des voies génitales comme *N. gonorrhoeae* ([Quillin & Seifert, 2018](#); [Sáez Nieto et al., 1998](#)).

2.1.2 Niches écologiques des *Neisseria*

Les *Neisseriaceae* sont capables de coloniser les humains, mais également d'autres mammifères comme les chiens et les primates non humains ([Cobiella et al., 2019](#); [Weyand et al., 2013](#)). Ces espèces sont retrouvées au niveau de la peau et des muqueuses ([Liu et al., 2015](#)). Chez l'être humain, on les retrouve au niveau de certaines muqueuses et plus précisément au niveau de la cavité buccale ainsi qu'au sein des voies respiratoires supérieures et des voies génitales ([Seifert, 2019](#)). Les voies respiratoires supérieures correspondent aux organes extra-thoraciques et sont composées du nez, de la cavité nasale, du larynx et du pharynx (Figure 2.2) ([Man et al., 2017](#)). De nombreuses espèces de *Neisseria* y sont retrouvées. *N. sicca* et *N. lactamica* sont retrouvées au niveau du rinopharynx, tandis que *N. meningitidis* est retrouvée au niveau du nasopharynx ([Evans et al., 2011](#); [Sáez Nieto et al., 1998](#)).

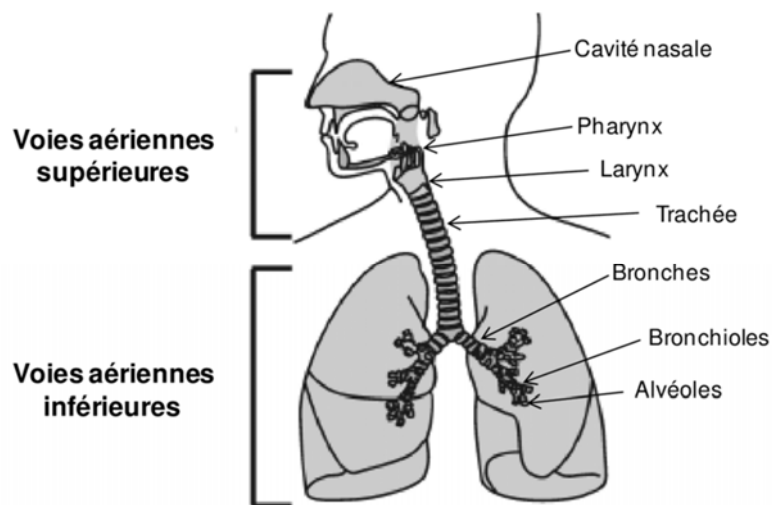


Figure 2.2 Représentation des voies respiratoires de l'être humain

Les voies respiratoires (ou aériennes) supérieures sont constituées du nez, de la cavité nasale, du pharynx, du larynx et de la bouche ([Loret, 2017](#)).

Les organes génitaux sont différents entre les hommes et les femmes. Chez ces dernières, ils sont composés de parties internes dont le vagin, l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires. Concernant les organes externes, on retrouve par exemple les grandes et les petites lèvres

ainsi que le clitoris (Figure 2.3). Chez l'homme, les organes externes comprennent les testicules, le scrotum ainsi que le pénis, tandis que les organes internes sont constitués en partie de la prostate, de la glande de Cowper et des vésicules séminales (Figure 2.3) ([R. Dewaele, 2019](#)).

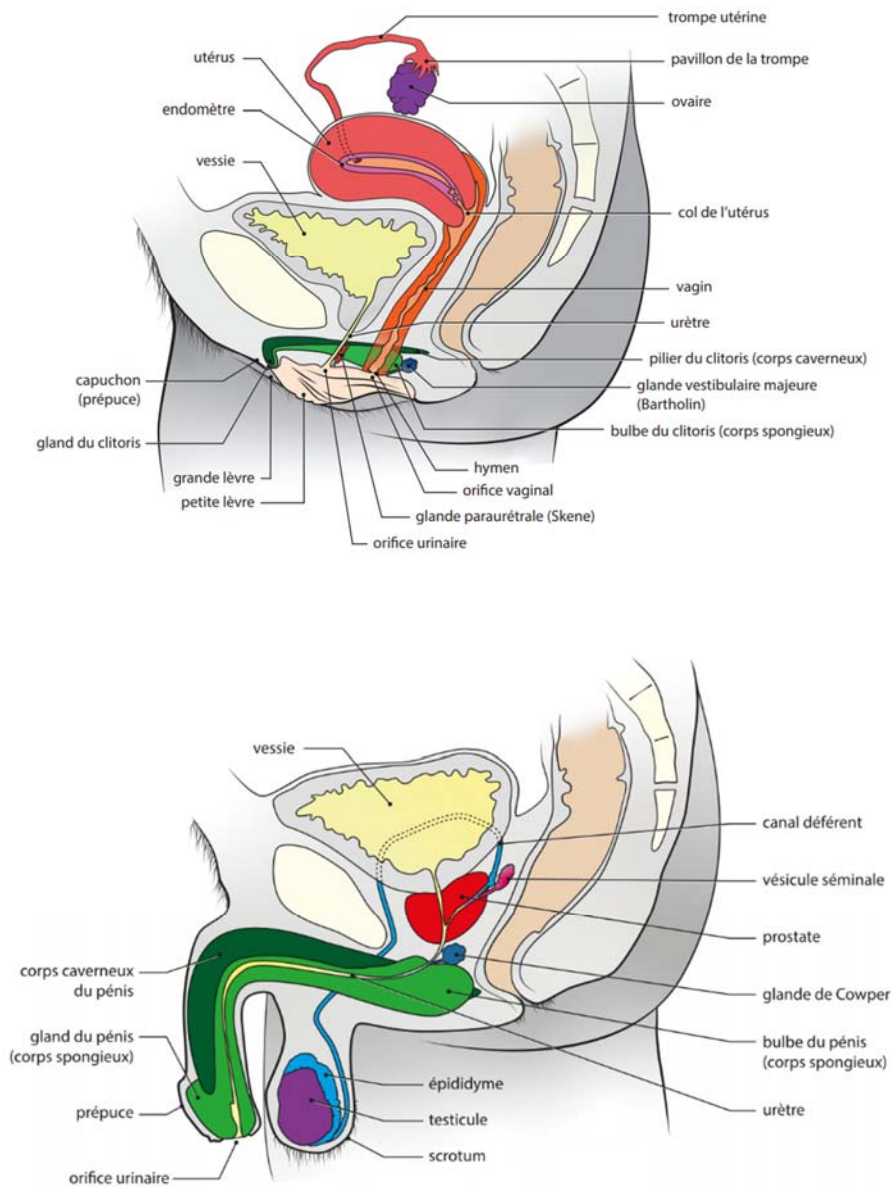


Figure 2.3 Vue sagittale des voies génitales de la femme et de l'homme
 Les voies génitales sont différentes entre l'homme et la femme ([R. Dewaele, 2019](#)).

La composition bactérienne des voies génitales est différente des voies respiratoires, mais elle est également différente entre les hommes et les femmes. Chez les hommes, on retrouve des espèces de staphylocoques et de streptocoques, d'entérocoques et de lactobacilles ([Koedooder et al., 2019](#); [Mändar, 2013](#)). Concernant le microbiote génital des femmes, on retrouve en majorité des lactobacilles qui permettent de limiter les infections liées aux genres *Gardnerella* ou *Clostridia* ([Koedooder et al., 2019](#); [Marrazzo et al., 2002](#)). Et sur l'ensemble du genre *Neisseria*, une seule espèce est capable de coloniser les voies génitales de l'homme et de la femme, il s'agit de *N. gonorrhoeae*. Cette espèce proche de *N. meningitidis* peut se révéler pathogène dans certaines conditions ([Quillin & Seifert, 2018](#)).

2.1.3 Les pathogènes au sein des *Neisseria*

Deux pathogènes sont retrouvés au sein du genre *Neisseria* : *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Ces bactéries colonisent différents organes mais se ressemblent étroitement au niveau génétique ([Rotman & Seifert, 2014](#)). Ces deux espèces sont naturellement compétentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'acquérir de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) provenant de l'environnement grâce à leurs pili membranaires afin de l'intégrer au sein de leur génome, leur offrant ainsi la capacité d'évoluer rapidement, et surtout d'acquérir de nouvelles résistances aux antibiotiques ([Aas et al., 2002](#)).

Le premier pathogène est *N. meningitidis*, un diplocoque découvert en 1887 par Anton Weichselbaum (Figure 2.4) ([Hort, 1917](#)). Le méningocoque provoque une colonisation généralement asymptomatique dans le nasopharynx mais peut se révéler pathogène dans certaines conditions et entraîner la mort de l'hôte. La bactérie peut entraîner de simples symptômes grippaux jusqu'à une septicémie et une méningite bactérienne. En effet, si la maladie n'est pas traitée, cet organisme peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Et dans le pire des cas, la mort de l'hôte peut être causée par une insuffisance respiratoire ([Stephens, 2007](#)).

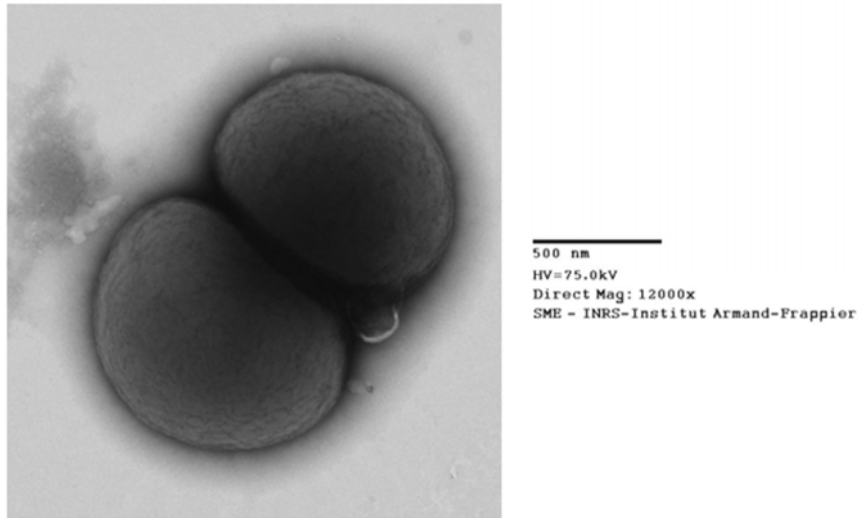


Figure 2.4 *N. meningitidis* en microscopie électronique à transmission (12 000×)
(Figure du laboratoire Veyrier, non publiée)

L'espèce est transmise entre humains par voie respiratoire au contact de gouttelettes ([Coureuil et al., 2019](#)). Les impacts décrits sur l'hôte dépendent de la souche, de sa virulence et de la force du système immunitaire de l'hôte. Il existe 13 sérogroupes, dont la plupart sont encapsulés par une capsule polysaccharidique. 5 sérogroupes, A, B, C, Y et W sont responsables de 90% des pathologies. Les sérogroupes B et C encapsulés sont associés aux épidémies dans les pays industrialisés tandis que les sérogroupes A et C sont quant à eux retrouvés dans les pays en voie de développement ([Vos, 2017](#)). Les traitements initiaux contre le méningocoque étaient à base de sulfonamide. Cependant, l'apparition de souches multirésistantes a entraîné l'utilisation de chloramphénicol et de pénicilline. A présent, le traitement est composé de céphalosporines de 3^{ème} génération à large spectre, comme le ceftriaxone ([Deghmane et al., 2017](#)).

Le deuxième pathogène retrouvé au sein du genre *Neisseria* est *N. gonorrhoeae*. Ce gonocoque non encapsulé a été découvert par Albert Neisser en 1879 (Figure 2.5) ([Neisser, 1879](#)). Cette espèce réside généralement de manière asymptomatique au niveau des muqueuses génitales. Transmise lors de rapports sexuels non protégés, la bactérie entraîne une MST (Maladie Sexuellement Transmissible) du nom de gonorrhée.

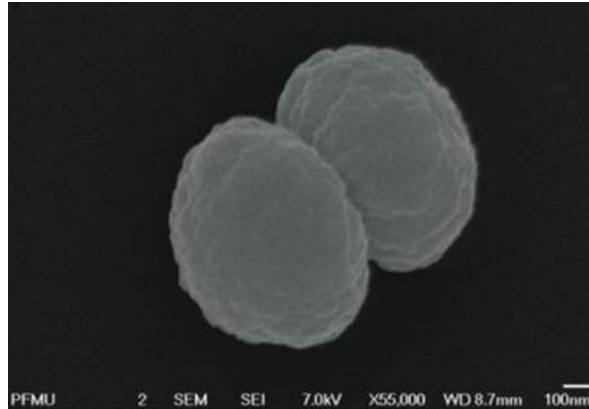


Figure 2.5 *N. gonorrhoeae* en microscopie électronique à balayage (55 000×)
Le gonocoque ressemble étroitement au méningocoque ([Williams et al., 2019](#)).

Cette espèce colonisatrice des organes génitaux n'entraîne pas les mêmes symptômes entre les hommes et les femmes. Dans le premier cas, les symptômes sont caractérisés par une urétrite et une dysurie (difficulté à uriner). Cependant chez les femmes, les pathologies sont plus complexes avec une dysurie, des douleurs au niveau des voies génitales voire une infection de celles-ci pouvant conduire à l'infertilité. Dans les deux cas, si la bactérie atteint le sang, une septicémie peut surgir pouvant entraîner la mort si la maladie n'est pas traitée ([Edwards & Apicella, 2004](#); [Zumla, 2010](#)). Les traitements usuels étaient formés à base de pénicillines, de sulfamides et de quinolones. Mais ces traitements ont montré une diminution de leur efficacité due à l'apparition de gonocoques multirésistants. Ces résistances sont dues à la surutilisation d'antibiotiques et à la facilité d'acquisition de gènes de résistances par la bactérie. A présent, un double traitement à base de ceftriaxone et d'azithromycine est utilisé, mais il a été récemment observé une résistance à ce traitement ([WHO, 2016](#)). Depuis, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a mis en place un plan d'action mondial nommé « *Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in N. gonorrhoeae* » dans l'objectif de lutter à grande échelle contre la pharmacorésistance et la maladie ([WHO, 2016](#)).

2.2 L'évolution des *Neisseria*

De nombreuses bactéries pathogènes telles que *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* sont retrouvées au niveau du nasopharynx humain et y sont parfaitement bien adaptées. Cependant, les ancêtres du méningocoque sont colonisateurs de la bouche, tandis que ce dernier réside dans le nasopharynx. Le laboratoire de Pr. Veyrier a donc cherché à comprendre l'adaptation à cette nouvelle niche écologique et à mettre en lien ce changement avec le développement d'une pathogénicité (Veyrier et al., 2015). Cette adaptation progressive s'est réalisée avec des modifications génétiques, notamment grâce à leur compétence naturelle permettant ainsi la sélection de certains événements géniques dans ces espèces (Aas et al., 2002). Cette adaptation correspondant au passage de la cavité buccale jusqu'au nasopharynx, est caractérisée par une transition morphologique de la forme de bâtonnet à la forme ronde, ainsi qu'une modification de la composition de la paroi cellulaire (Figure 2.6).

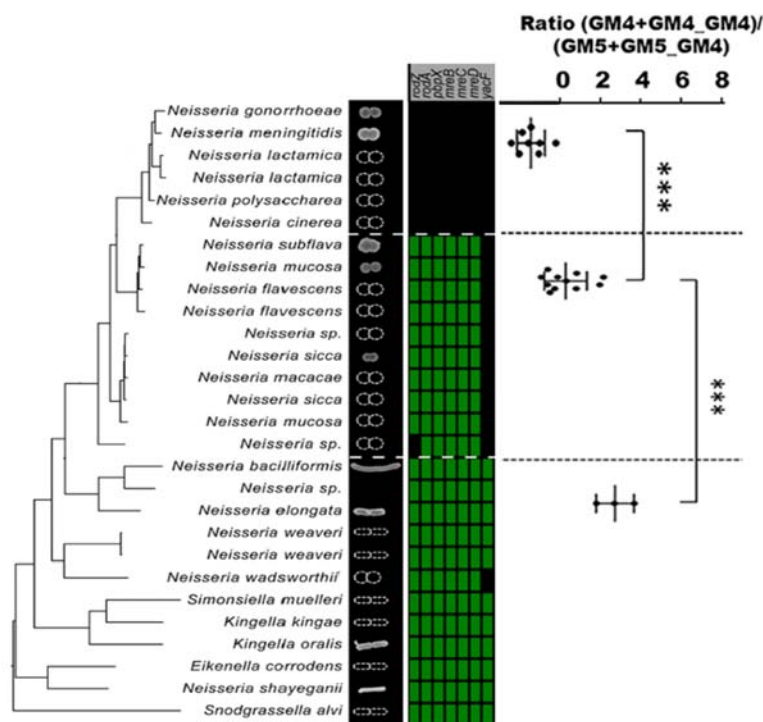


Figure 2.6 Arbre phylogénétique de la famille des *Neisseriaceae*

Arbre phylogénétique des *Neisseriaceae* avec la représentation des différentes morphologies cellulaires ainsi que les événements génétiques associés à la transition morphologique. Sur la droite figurent le ratio des différentes chaînes latérales peptidiques retrouvées au sein du peptidoglycane (Veyrier et al., 2015).

2.2.1 L'évolution de la morphologie

Des comparaisons génétiques réalisées par le Pr. Veyrier entre les différents génomes des espèces de *Neisseria* ont permis de mettre en lien cette transition morphologique avec la perte d'un gène nommé *yacF* (Figure 2.6). Il a été montré que la protéine YacF interagit avec la protéine FtsZ qui est impliquée dans la formation du divisome ([Vishniakov & Borkhsenius, 2007](#)). FtsZ est une protéine de type tubuline qui forme, avant la division cellulaire, une structure en forme d'anneau qui initie l'assemblage de la machinerie de division ([Erickson Harold et al., 2010](#)). Afin de reproduire l'évolution naturelle, le gène *yacF* a été supprimé chez le bacille *N. elongata*, un modèle de forme ancestrale du genre *Neisseria*. Mais au lieu d'imiter l'évolution naturelle des *Neisseria*, cette évolution *in vitro* a entraîné des défauts morphologiques (Figure 2.7). Cependant au cours de l'évolution naturelle, un autre événement de suppression génétique est apparu après la perte de *yacF*. Certains cocci du genre *Neisseria* ont également perdu plusieurs gènes nommés *rodA*, *rodZ*, *pbpX* ainsi que le locus *mreBCD* (Figure 2.6) ([Veyrier et al., 2015](#)). Ces gènes constituent la machinerie d'élongation et sont responsables de la synthèse de peptidoglycane lors de l'élongation des bacilles ([Errington & Wu, 2017](#)). La suppression des gènes *mreBCD*, *rodA*, *rodZ*, *pbpX* ainsi que du gène *yacF* chez *N. elongata* a finalement permis de reproduire la morphologie observée chez le pathogène *N. meningitidis* (Figure 2.4) ([Veyrier et al., 2015](#)). Il a alors été supposé que cette modification de la morphologie a participé à l'adaptation du genre *Neisseria* au nasopharynx et à sa tolérance par le système immunitaire.

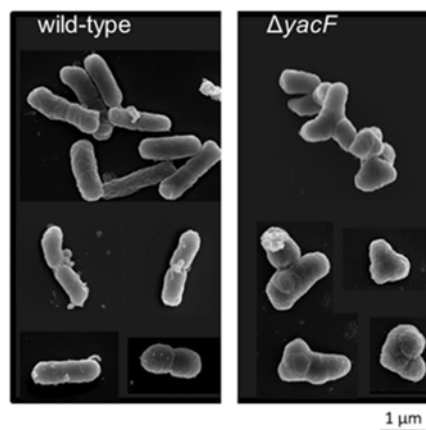


Figure 2.7 Evolution *in vitro* réalisée chez *N. elongata*
Chez *N. elongata* la suppression du gène *yacF* n'a pas suffi pas à reproduire la morphologie des cocci du genre *Neisseria* ([Veyrier et al., 2015](#)).

Cependant lors de la reproduction *in vitro* de la morphologie des coccus, ce sont également des caractéristiques de l'enveloppe du méningocoque qui ont été reproduites (Figure 2.6) ([Veyrier et al., 2015](#)).

2.2.2 L'évolution de la composition de la paroi

Cette modification de la composition de la paroi correspond à une modification de la longueur des chaînes peptidiques latérales. Ce sont des peptides retrouvés au sein du peptidoglycane et qui sont assemblés par les PBP (Penicillin Binding Proteins), des composants de la machinerie d'élongation ([Yin et al., 2020](#)). Ils permettent de relier les résidus d'acide muramique entre deux chaînes saccharidiques et peuvent être de différentes longueurs (Figure 2.8). La longueur de ces peptides a été modifiée au cours de l'évolution des *Neisseria* et ce changement peut être associé à l'adaptation des *Neisseria* (Figure 2.6).

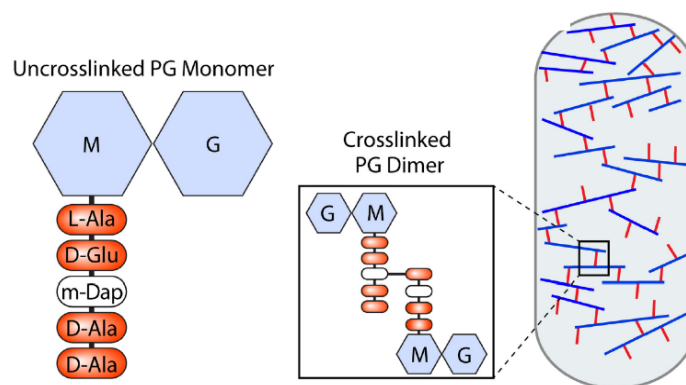


Figure 2.8 Représentation des chaînes peptidiques latérales retrouvées au sein du peptidoglycane. Entre deux chaînes saccharidiques, les chaînes latérales sont reliées par un pont inter-peptidique ([Yang et al., 2016](#)).

Le méningocoque possède à sa surface des structures permettant sa tolérance par le système immunitaire. Il a donc été supposé que cette évolution de la paroi avait joué un rôle dans cette tolérance. La structure de la paroi cellulaire entre la bactérie créée par évolution *in vitro* et celle de la souche mère (*N. elongata* sauvage) ont donc été comparées. La bactérie de forme ronde formée *in vitro* a ainsi montré une diminution des térapeptides pour une augmentation des pentapeptides (Figure 2.6) ([Veyrier et al., 2015](#)). Afin de savoir si ce changement de la composition du peptidoglycane a eu un impact sur les interactions avec le système immunitaire,

le peptidoglycane du mutant en forme de coccus et de la souche mère ont été mis en contact avec des cellules HEK-293 transfectées avec les récepteurs humains hNod1 et hNod2 (human Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins) (Veyrier et al., 2015). Les récepteurs Nod font partie du système immunitaire inné et permettent de reconnaître les composants bactériens retrouvés dans le cytoplasme des cellules de l'être humain (Zhong et al., 2013). La reconnaissance du peptidoglycane par le système immunitaire est donc proportionnelle à la capacité du peptidoglycane à activer ces récepteurs. Ces derniers sont liés à une luciférase fusionnée avec le facteur de transcription NF- κ B, permettant de représenter de manière quantitative la reconnaissance du peptidoglycane. Le mutant de forme ronde a montré une diminution de la capacité des récepteurs humains à reconnaître son peptidoglycane (Figure 2.9) (Veyrier et al., 2015).

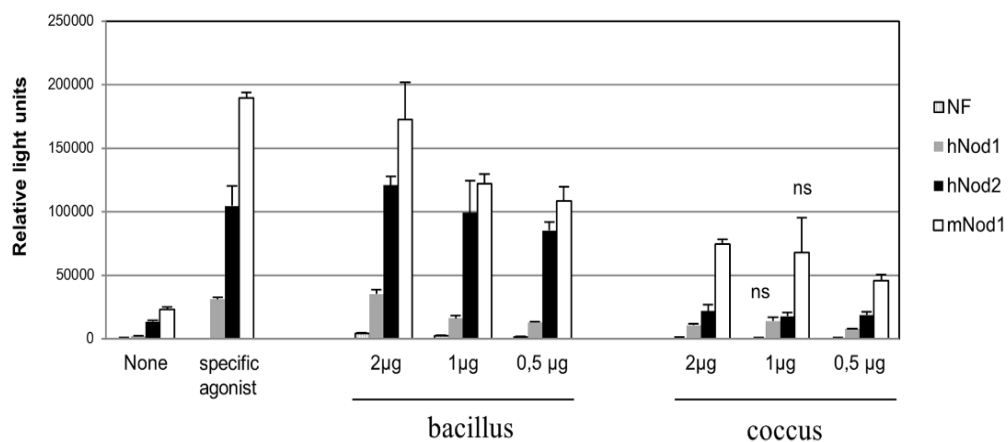


Figure 2.9 Quantification *in vitro* de la reconnaissance du peptidoglycane par le système immunitaire
Le coque correspond au bacille dépourvu de sa machinerie d'élongation, et le bacille correspond à la souche sauvage. Les données affichées correspondent à la moyenne ainsi qu'à l'écart-type (standard deviation) des différentes expériences réalisées en triplicata (Veyrier et al., 2015).

Le fait que le peptidoglycane du mutant *N. elongata* $\Delta yacF$, $mreBCD$, $pbpX$, $rodA$ soit moins reconnu par le système immunitaire laisse suggérer que cette modification de l'enveloppe a participé à la tolérance du système immunitaire du méningocoque et donc à son adaptation. Les divers événements génétiques apparus au cours de l'évolution ont permis aux espèces de *Neisseria* d'être moins exposées aux attaques immunitaires, d'une part en modifiant leur enveloppe, mais également en optant pour une morphologie ronde afin de réduire la surface en contact avec les cellules de l'immunité tout en gardant un volume cellulaire identique. Le genre

Neisseria a donc sélectionné notamment grâce à la compétence naturelle, ces différents événements génétiques dans le but de s'adapter à une nouvelle niche écologique qu'est le nasopharynx ([Veyrier et al., 2015](#)). Cependant chez les *Neisseria*, certaines espèces montrent une morphologie ronde ainsi qu'une évolution de la paroi mais possèdent encore la machinerie d'élongation (Figure 2.6). Il a alors été suggéré que d'autres changements génétiques qui ne correspondent pas à des événements de suppressions ou d'insertions, ont été nécessaires à la modification de la morphologie et du peptidoglycane. En d'autres termes, avant la suppression naturelle de la machinerie d'élongation, des changements d'acides aminés dans certaines protéines ont pu déréguler cette machinerie et ainsi participer à l'adaptation des *Neisseria* au nasopharynx.

2.2.3 Autres évènements génétiques associés au changement de morphologie.

Initialement, le laboratoire Veyrier s'était concentré sur les différents événements génétiques en lien avec la transition morphologique des *Neisseria* et leur adaptation au nasopharynx. La suppression du gène *yacF* est associée à cette transition, mais la reproduction de cet événement n'a pas permis de reproduire l'évolution naturelle. Il s'est produit un autre événement qui ne correspond pas à un événement de suppression ou d'insertion de gène. C'est pour cette raison que le laboratoire du Pr. Veyrier s'est concentré par la suite dans la recherche d'apparition de changements d'acides aminés dans certaines protéines en lien avec la transition morphologique. Ainsi, le laboratoire Veyrier a conçu un logiciel unique en son genre. Nommé CAPRIB, ce logiciel a pour intérêt de déterminer quelles protéines conservées entre deux groupes d'espèces phénotypiquement différentes (ici entre les bacilles et les coques du genre *Neisseria*) ont subi des changements d'acides aminés (Figure 2.10) ([Guerra Maldonado et al., 2020](#)).

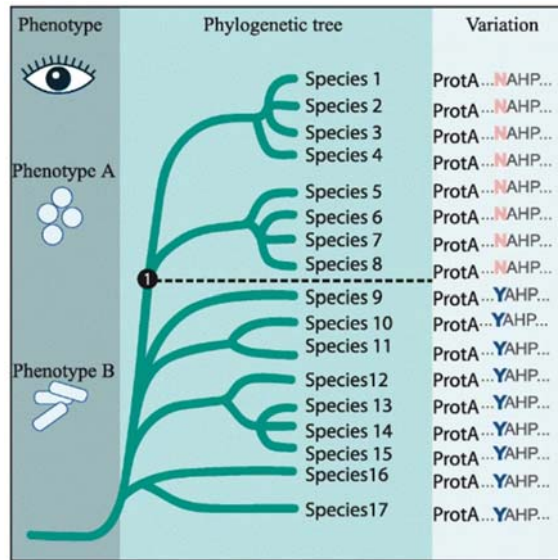


Figure 2.10 Description du concept du logiciel CAPRIB

Conçu par le laboratoire Veyrier, CAPRIB permet de déterminer quelles mutations protéiques sont apparues en même temps que l'apparition d'un nouveau phénotype ([Guerra Maldonado et al., 2020](#)).

Le logiciel est strict d'un point de vue comparatif. Concernant la comparaison des bacilles et des coques, le changement d'acides aminés doit être identique chez tous les coques mais doit être différent chez tous les bacilles. Également, le logiciel indique pour chacune des permutations trouvées deux scores représentant l'impact potentiel de la mutation sur la fonction protéique. Le premier score est appelé score de « GRANTHAM ». Ce score est basé sur le changement de la nature de l'acide aminé en question, comme sa taille et sa polarité. Par exemple, la substitution d'un acide aminé polaire pour un non-polaire va correspondre à un score de GRANTHAM élevé. Le deuxième score est nommé « Exchangeability Score » et il est basé sur une étude expérimentale. Dans cette étude, chaque acide aminé retrouvé dans un ensemble de 12 protéines humaines va être remplacé un à un par les 22 acides aminés protéinogènes (9 671 substitutions au total). Pour chacune des substitutions, la fonction de la protéine mutée va être comparée à la fonction initiale de la protéine sauvage et un « exchangeability score » va être accordé indiquant l'impact des différentes substitutions sur la fonction protéique. Plus l'impact est grand, plus le score sera petit. Un faible « Exchangeability Score » ainsi qu'un score de GRANTHAM élevé prédiront donc un fort impact de la permutation sur la fonction protéique ([Guerra Maldonado et al., 2020](#); [Yampolsky & Stoltzfus, 2005](#)).

Ainsi, entre les espèces qui ont divergé avant et après la transition morphologique, 900 protéines ont été conservées (protéines montrant au moins 50 % d'identité). Et sur ces 900

protéines, 102 acides aminés ont subi une substitution lors de la transition morphologique. Et sur les 6 mutations montrant un potentiel impact sur la fonction protéique (score GRANTHAM élevé, faible « Exchangeability Score »), 3 d'entre elles sont liées à la morphologie cellulaire. Il s'agit de FtsZ, FtsA et d'un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille BoIA appelé ici BoIA1. La protéine BoIA1 est constituée de 81 acides aminés pour une masse de 8,72 kDa. La permutation que cette protéine a acquise au cours de la transition morphologique correspond à la substitution d'une alanine à une lysine à la position 93 (Figure 2.11). Il est ainsi possible que l'apparition de la mutation A93K ait biaisé l'activité de la protéine et donc participé à la transition morphologique.

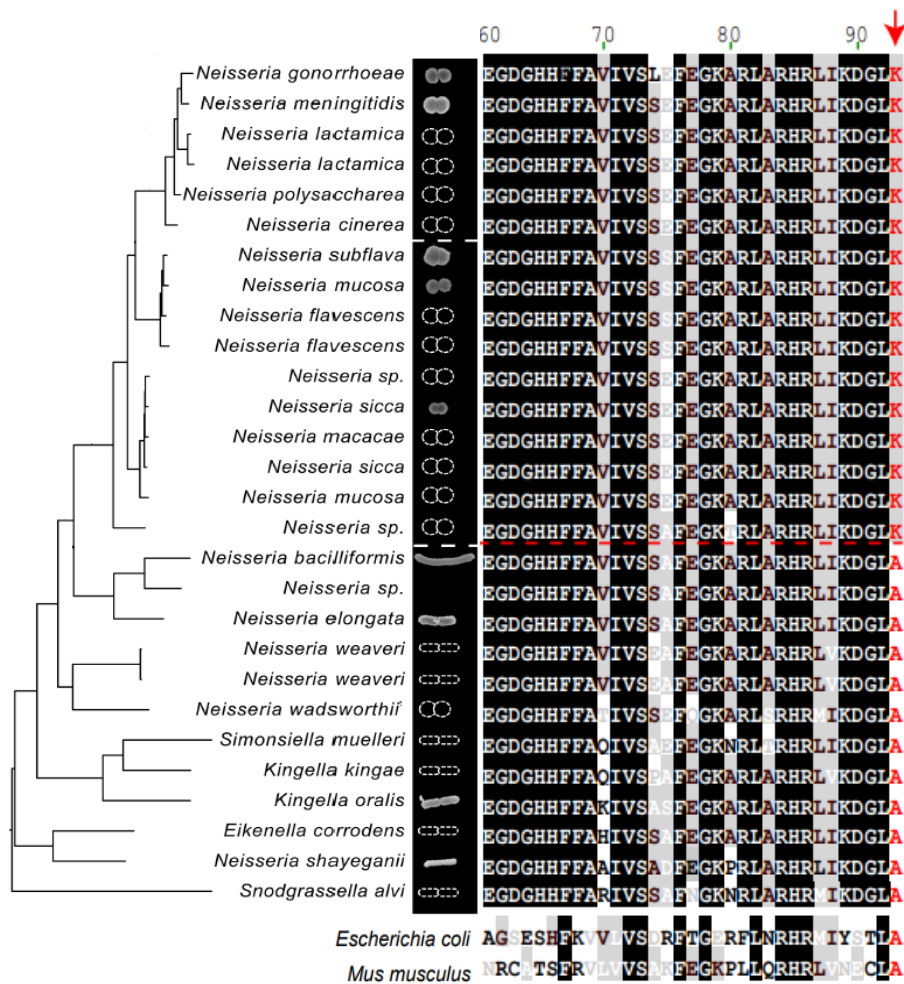


Figure 2.11 L'apparition de la mutation A93K au niveau de la protéine BoIA1 est liée à la transition morphologique des *Neisseria*

(Figure du laboratoire Veyrier, non publiée).

2.3 Les protéines de type BoIA

2.3.1 Généralités

Les protéines de types BoIA correspondent à une famille de régulateurs de réponses nommée BoIA. Au sein de cette famille, on retrouve de nombreux homologues répandus dans les trois domaines du vivant (Figure 2.12) ([Guinote et al., 2011](#)). Elles sont appelées ainsi depuis la découverte par des chercheurs espagnols de la première protéine de type BoIA chez *E. coli*. Nommé BoIA, le nom de cette protéine provient de la traduction du mot « boule » en espagnol, pour sa faculté à entraîner la formation de bactéries de forme ronde lorsqu'elle est surexprimée ([Aldea et al., 1989](#); [Roret, 2014](#)).

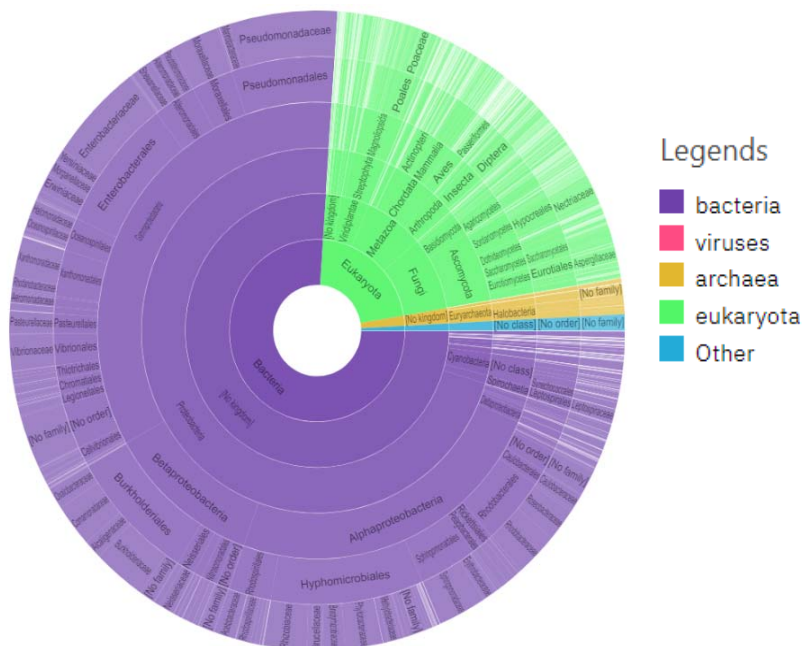


Figure 2.12 Répartition des homologues des protéines de type BoIA dans le vivant
On retrouve de nombreux homologues dans les trois domaines du vivant ([Blum et al., 2021](#)).

Les fonctions des protéines de type BoIA sont vastes et ne sont pas entièrement comprises. Mais des études ont été en mesure de démontrer la pléiotropie de ces régulateurs dans la réponse face au stress et dans la régulation de gènes impliqués dans l'intégrité de l'enveloppe ainsi que dans la morphologie cellulaire ([Dressaire et al., 2015](#); [Freire et al., 2009](#); [Guinote et al., 2011](#)).

Certains homologues des protéines de type BolA sont également susceptibles de se lier à d'autres protéines, notamment celles impliquées dans la régulation du fer. Les protéines de type BolA peuvent former un hétérodimère avec les Glutarédoxines aussi appelés Grx. Les glutarédoxines sont des protéines d'oxydoréductions qui interviennent comme transporteurs d'électrons et agissent sur des cluster Fe-S. Les protéines Fer-Soufre sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme du fer, de l'ADN, de l'ARN ainsi que dans la réponse au stress. Ces glutarédoxines forment un pont [2Fe-2S] au niveau d'une Histidine/Cystéine conservée chez les protéines de type BolA. Une fois formés, ces complexes peuvent fournir des électrons aux accepteurs d'électrons qui en ont besoin. Lorsque ces électrons sont transférés, ces glutarédoxines sont oxydées et le complexe BolA-Grx n'existe plus. Grx devra être à nouveau réduite par le glutathion pour pouvoir former un nouveau complexe et agir sur de nouveaux cluster Fe-S ([Dlouhy et al., 2016](#); [Li et al., 2012](#); [Talib & Outten, 2021](#)).

Les protéines de type BolA présentent une structure secondaire semblable qui est $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$. β_1 et β_2 sont antiparallèles, et β_3 est parallèle à β_2 (Figure 2.13) ([Kasai et al., 2004](#)). Au sein de ces protéines de type BolA, un motif HCH (Hélice-Coude-Hélice) conservé chez les protéines de type BolA est retrouvé. Ce motif qui peut être différent entre homologues, permet à ces protéines de se lier à l'ADN et de réguler l'expression de différents gènes (Figure 2.13) ([Aldea et al., 1989](#); [Kasai et al., 2004](#); [Mil-Homens et al., 2018](#)).

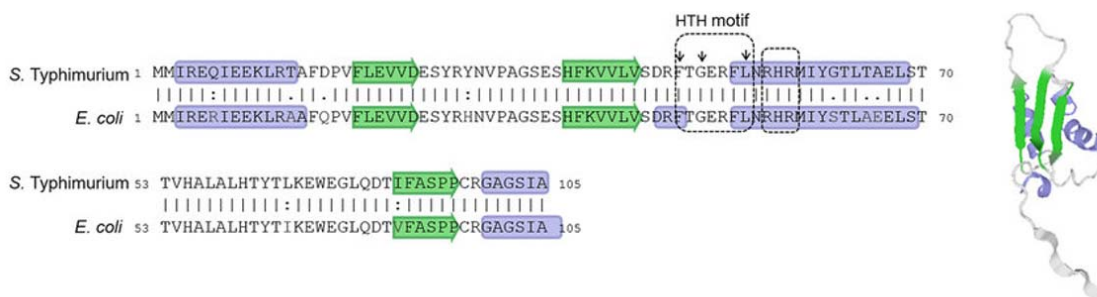


Figure 2.13 Alignement de la protéine BolA provenant d'*E. coli* et de *S. typhimurium*.

Ces deux homologues se ressemblent étroitement. La structure secondaire propre aux protéines de type BolA est retrouvée dans les deux espèces. Le motif HCH au sein des deux homologues est déjà connu ([Mil-Homens et al., 2018](#)).

2.3.2 La protéine BolA d'*E. coli* est le régulateur le plus caractérisé au sein de cette famille

Initialement mise en évidence chez *Escherichia coli* pour entraîner la formation de bactéries de forme ronde une fois surexprimée, elle porte depuis le nom de BolA (traduction du mot « boule » en espagnol). Cette protéine a été reconnue comme un régulateur transcriptionnel important à la survie bactérienne, s'exprimant naturellement en phase stationnaire ou dans des conditions non favorables au développement bactérien ([Santos et al., 1999](#)). La protéine BolA d'*E. coli* est composée de 107 acides aminés pour une masse de 12,3 kDa.

Cette protéine présente une structure secondaire typique des protéines de type BolA, et la séquence de son motif HCH qui a déjà été identifiée est FTGERFL (Figure 2.13 et 2.14) ([Kasai et al., 2004](#))

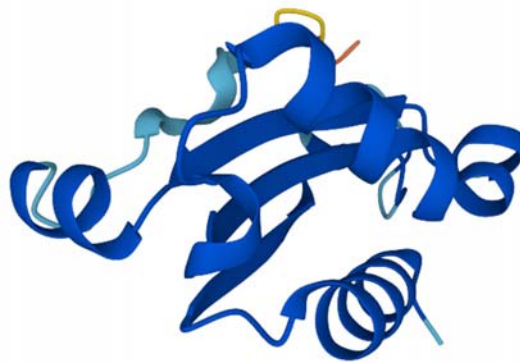


Figure 2.14 Prédiction AlphaFold de la protéine BolA d'*E. coli* (Code PDB 2DHM)

Les bases de données de l'European Bioinformatics Institute comprennent de nombreuses structures protéiques qui sont prédites automatiquement, et la protéine BolA d'*E. coli* en fait partie. Un score de confiance entre 0 et 100 est attribué à chaque résidu. La plupart des résidus montrent un score de plus de 90. ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

Il a également été montré que la forme stable de BolA c'est-à-dire sa forme active correspond à une forme phosphorylée. Lorsque ce n'est pas le cas, BolA est sous forme dimérique. Chez l'entérocoque, certains des acides aminés phosphorylés sont retrouvés dans le domaine de liaison à l'ADN. Un dysfonctionnement de la protéine est une conséquence de mutations au niveau de certains de ces acides aminés ([Galego et al., 2021](#)).

Le gène *bolA* montre en son amont deux promoteurs, un promoteur faible qui s'exprime de manière constitutive appelé *bolA2p*, ainsi qu'un promoteur principal *bolA1p* régulé par le taux de

croissance. L'expression de ce dernier promoteur « boîte de vitesse » est conduite par le facteur sigma S qui montre une activité inversement dépendante du taux de croissance. Dans des conditions optimales de croissance, la transcription du gène *bolA* est placée sous le contrôle du facteur sigma σ^{70} (house-keeping). Mais dans des conditions de stress, le gène *bolA* est transcrit en présence du facteur sigma σ^s ([Aldea et al., 1989](#); [Santos et al., 1999](#); [Yamamoto et al., 2000](#)). Le facteur σ^s codé par le gène *rpoS* est nécessaire à l'induction de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress chez *E. coli* ([Adnan et al., 2011](#)). Également, une liaison directe de la protéine cytoplasmique OmpR phosphorylée au niveau de la région promotrice du gène *bolA* a rapporté une répression de l'expression du régulateur ([Moreira et al., 2011](#); [Yamamoto et al., 2000](#)). Concernant la régulation post-transcriptionnelle du gène *bolA*, la RNase III et la poly(A) polymérase (PAPI) ont montré une implication dans la dégradation de son ARNm (Acide Ribonucléique messenger) ([Arraiano et al., 2010](#); [Santos et al., 2006](#)).

Les bactéries sont des êtres vivants capables de s'adapter de manière rapide et efficace aux différentes formes de stress. Le stress cellulaire peut induire chez les bactéries des adaptations physiologiques ainsi que moléculaires et ces réponses au stress comprennent de nombreux mécanismes afin d'assurer la survie bactérienne ([Dressaire et al., 2015](#)). Il a été montré chez *E. coli* que dans différentes conditions de stress, comme un choc thermique, un stress acide, oxyde ou dans des conditions de carence en carbone, le promoteur *bolA1p* est activé afin d'induire une réponse permettant de protéger la cellule (Figure 2.15) ([Guinote et al., 2014](#); [Santos et al., 1999](#)).

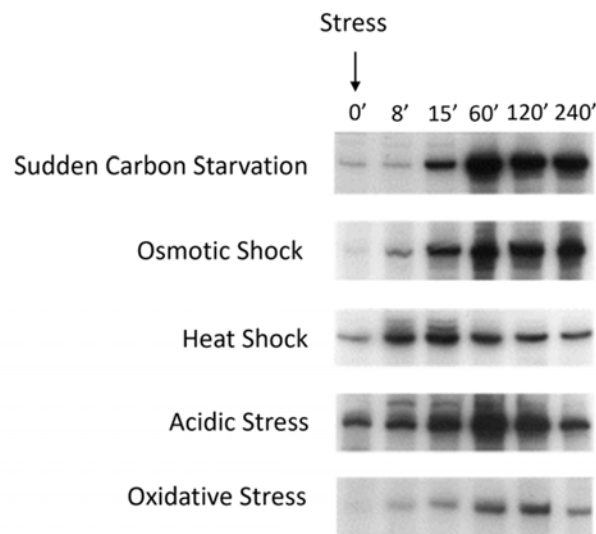


Figure 2.15 **Activité du promoteur *bolA1p* chez *E. coli***

Le promoteur « boîte de vitesse » *bolA1p* est régulé par certaines formes de stress chez *E. coli* ([Santos et al., 2002](#)).

Face à ces différentes formes de stress, la protéine BolA y répond en activant et en réprimant certains gènes dans le but de protéger la cellule, et tout d'abord par le renforcement de l'enveloppe. Il a été décrit que la surexpression de BolA est liée à une augmentation de la résistance de la paroi face aux agents toxiques tels que les détergents et les antibiotiques ([Heidrich et al., 2002](#)). BolA régit le ratio entre les protéines OmpC et OmpF, modulant la perméabilité membranaire. Ce sont des porines présentes dans la membrane externe, permettant le passage de solutés à partir du milieu extracellulaire. OmpF montre une meilleure perméabilité que OmpC. Ainsi, en conditions défavorables, la production de OmpC va dépasser celle de OmpF et l'échange de solutés, dont ceux qui sont nocifs pour la cellule, va être limité. ([Freire et al., 2006](#); [Nikaido, 1993](#); [Vieira et al., 2004](#); [Yamamoto et al., 2000](#)).

Une autre façon d'assurer la survie bactérienne en conditions de stress correspond à la formation de structures complexes appelées biofilms. Ces communautés multidimensionnelles et dynamiques peuvent se développer au sein de divers environnements au sein desquelles les cellules adhèrent de manière permanente à une surface par le biais de polymères extracellulaires ([Hall-Stoodley & Stoodley, 2002](#); [Magana et al., 2018](#)). Les réseaux formés au sein des biofilms confèrent aux bactéries la capacité d'échapper aux menaces environnementales telles que les antimicrobiens, les antibiotiques, les détergents et les

mécanismes de défense de l'hôte ([Freire et al., 2006](#); [Lebeaux et al., 2013](#)). Des structures de surface cellulaire telles que les adhésines, les pili, les lipopolysaccharides (LPS) ainsi que les molécules sécrétées comme l'ADN sont impliquées dans la formation des biofilms chez de nombreuses espèces bactériennes ([Freire et al., 2006](#); [Klausen et al., 2003](#); [O'Toole et al., 2000](#)). La dispersion est accomplie si le biofilm ne peut plus se développer correctement grâce à la synthèse de flagelles afin d'atteindre de nouvelles surfaces propices au développement bactérien (Figure 2.16) ([Klausen et al., 2003](#); [Van Houdt & Michiels, 2005](#)).

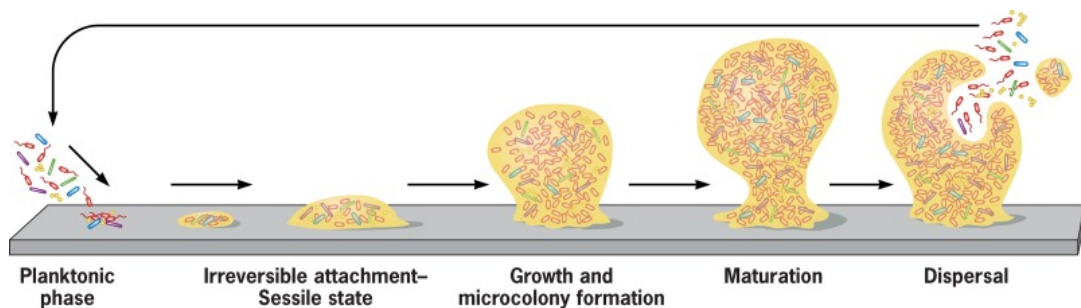


Figure 2.16 Différentes étapes de la formation d'un biofilm

Tandis que la phase d'adhésion nécessite l'arrêt de la synthèse des flagelles et l'activation d'adhésines, l'inverse est nécessaire pour la phase de dispersion.

Il a été montré que la protéine BolA est impliquée dans la formation de biofilms chez l'entérobactérie *E. coli* mais également chez *Pseudomonas fluorescens* ou *Chlamydomonas reinhardtii*. Sa surexpression implique la production de fimbriae-like adhesins, de curli et d'exopolysaccharides, tous nécessaires à l'adaptation bactérienne vers la forme sessile ([Adnan et al., 2010](#); [Dressaire et al., 2015](#); [Koch & Nybroe, 2006](#); [Vieira et al., 2004](#)). Lors de la formation d'un biofilm, l'assemblage des flagelles est arrêté. La surexpression de *bolA* a montré une répression de régulateurs transcriptionnels flagellaires (*flhDC*). De plus, cet arrêt de la synthèse des flagelles médié par BolA est associée à une augmentation de la synthèse d'adhésines ([Otto & Hermansson, 2004](#)) ([Dressaire et al., 2015](#); [Pratt & Kolter, 1998](#); [Prigent-Combaret et al., 2000](#)).

Enfin, une autre manière de survivre en cas de stress consiste à réduire la surface en contact avec l'environnement. Chez *E. coli*, ce processus médié par BolA correspond au passage de la

forme allongée à la forme ronde (Figure 2.17). C'est pour cette raison que la protéine BolA est appelé « morphogène » ([Santos et al., 1999](#)).

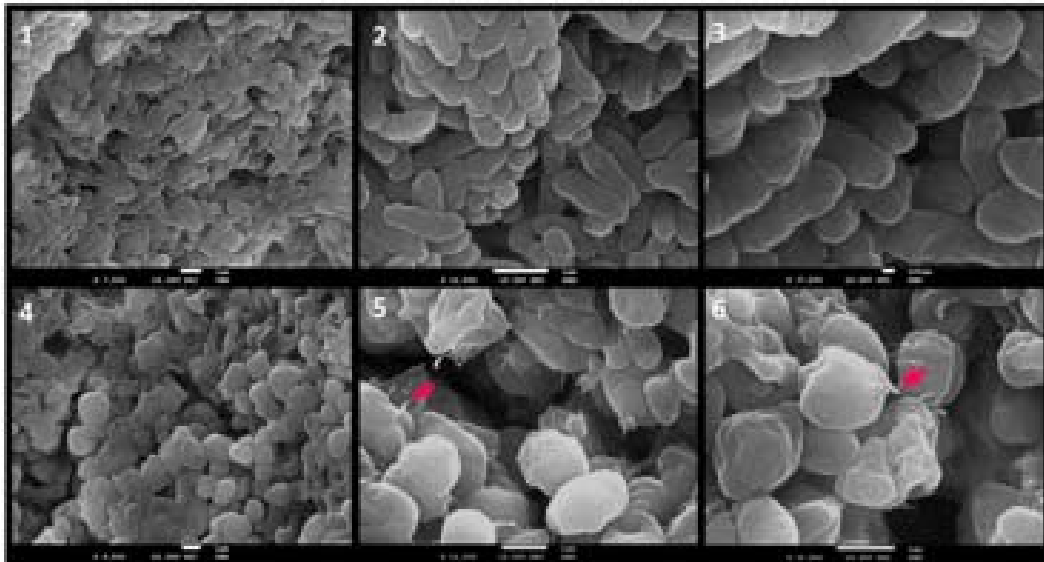


Figure 2.17 La protéine BolA module la morphologie chez *E. coli*

Obtenues par microscopie électronique à balayage, les trois images du haut correspondent à la souche sauvage. Les trois images du bas montrent l'entérocoque lorsque la protéine BolA aussi appelée « morphogène » est surexprimée. Les flèches en rouge montrent la présence de fimbriae liées à la surexpression de BolA ([Dressaire et al., 2015](#)).

Cette manière de réduire la surface en contact avec l'environnement est régie par une modification de la morphologie ainsi que de l'enveloppe. Cette modification est médiée par une voie complexe qui intègre les protéines PBP5, PBP6 (Penicillin Binding Protein) et MreB appartenant à la machinerie d'élongation ([Freire et al., 2009](#); [Lange & Hengge-Aronis, 1991](#)). La machinerie d'élongation permet la synthèse de peptidoglycane lors de l'élongation cellulaire précédant la division (Figure 2.18). Cette machinerie est retrouvée dans tous les bacilles, cependant elle n'est pas retrouvée chez les coques, sauf dans certains cas particuliers comme certains cocci du genre *Neisseria* dans lesquels la machinerie est encore présente.

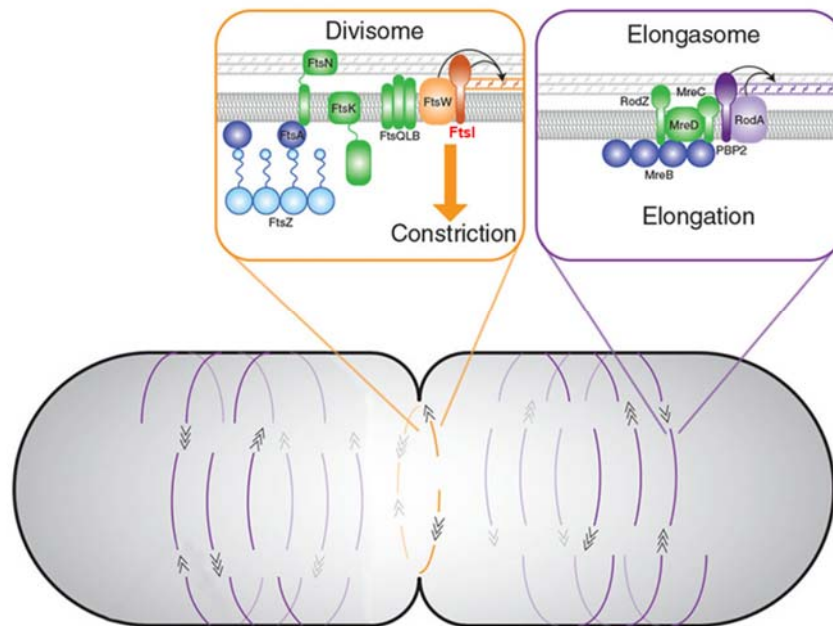


Figure 2.18 Représentation de la machinerie d'élongation ainsi que de la machinerie de division au sein d'un bacille

Lors de la division cellulaire, l'activité de la machinerie d'élongation diminue au profit de celle de la machinerie de division ([Daitch & Goley](#)).

La protéine MreB possède une structure homologue à l'actine qui s'est révélée être importante dans la formation du cytosquelette des bacilles. Impliquée dans l'intégrité de la morphologie des bacilles, le dynamisme intracellulaire de MreB est expliqué par son association avec de l'adénosine-triphosphate, la membrane ainsi que d'autres composants de la machinerie d'élongation (Figure 2.18) ([Knapp et al., 2022](#)). En plus de faire partie des protéines impliquées dans la morphologie, MreB est retrouvée dans différents processus comme la division cellulaire ainsi que la ségrégation du chromosome bactérien ([Awuni, 2019](#)).

Il a été tout d'abord montré chez *E. coli* que la surexpression de la protéine BolA entraîne une diminution significative de la transcription de l'opéron *mreBCD* (Figure 2.19) ([Aldea et al., 1988](#); [Freire et al., 2009](#)).

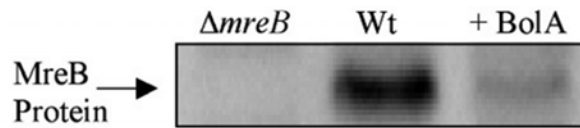


Figure 2.19 L'expression de la protéine MreB mesurée par Western Blot dépend de la présence de la protéine BolA chez *E. coli*

BolA réprime l'expression de la protéine MreB ([Freire et al., 2009](#)).

Les protéines de liaison à la pénicilline sont des acteurs essentiels dans les mécanismes d'élongation et de division cellulaire. Par exemple chez *E. coli*, la protéine PBP2 est responsable de la synthèse de peptidoglycane lors de l'extension de la paroi latérale, et PBP3 est spécifique à la production de peptidoglycane au niveau septal lors de la division cellulaire. ([Aldea et al., 1989](#); [Freire et al., 2009](#); [Santos et al., 2002](#)). La protéine BolA agit comme un activateur transcriptionnel des gènes *dacA* et *dacC*, qui codent respectivement pour les deux DD-carboxypeptidases PBP5 et PBP6. BolA active leur transcription en interagissant directement avec l'opérateur des promoteurs *dacA* et *dacC*. ([Freire et al., 2009](#); [Guinote et al., 2011](#); [Santos et al., 2002](#)). Lorsque ces deux protéines sont indépendamment supprimées, aucun changement morphologique chez *E. coli* n'est observé (Figure 2.20). Mais une double suppression entraîne cependant la formation de cellules filamenteuses, rappelant l'incapacité de ces deux protéines à se substituer malgré leur forte homologie et leur rôle coopératif dans l'intégrité de la morphologie ([Chowdhury et al., 2010](#); [Nelson et al., 2002](#); [Nelson & Young, 2001](#)). Dans les souches où les gènes *pbp5* ou *pbp6* sont individuellement supprimés, la formation de bactéries de forme ronde peut être observée uniquement lorsque la protéine BolA est surexprimée. Ce phénotype n'est cependant pas retrouvé avec la double délétion des *pbp5* et 6, montrant un lien coopératif entre BolA et ces deux PBP (Figure 2.20) ([Santos et al., 2002](#)).

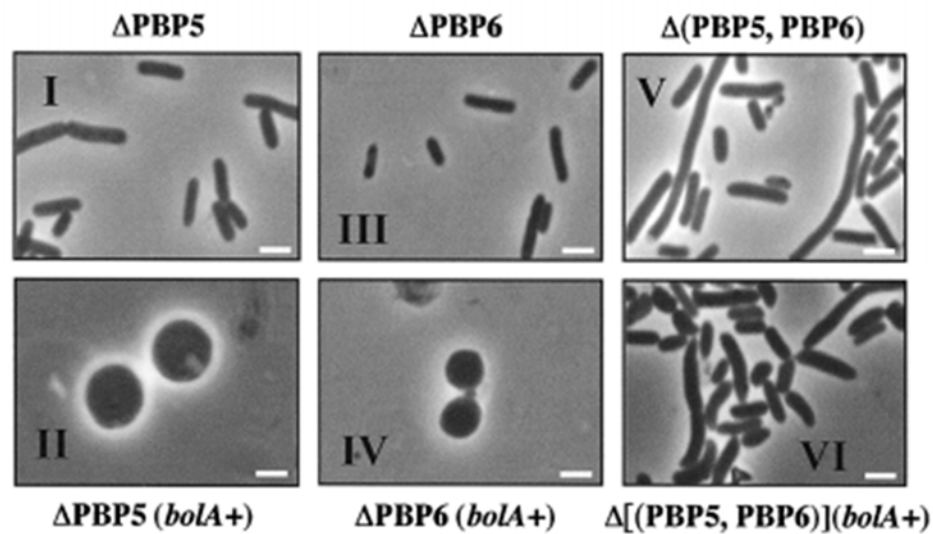


Figure 2.20 Changements de la morphologie chez *E. coli* en lien avec les PBP5 et 6 et *BolA*
 Il existe un lien étroit entre les PBP 5, 6 et *BolA* chez *E. coli* dans le contrôle de la morphologie. La barre d'échelle indique 2 μ m (Santos et al., 2002).

Il est également intéressant de noter que les niveaux d'expression du gène *mreB* sont plus faibles lorsque les gènes *pbp5* ou *pbp6* sont singulièrement supprimés que lorsque les deux gènes sont supprimés ensemble (Figure 2.21) (Freire et al., 2009; Santos et al., 2002). L'expression de *MreB* pourrait donc être influencée par PBP5 et/ou PBP6. Il y aurait donc une régulation concertée entre la machinerie de polymérisation du peptidoglycane et les mécanismes impliqués dans la morphologie cellulaire (Freire et al., 2009; Guinote et al., 2011). La protéine *BolA* jouerait donc chez *E. coli* un rôle central dans un réseau complexe de régulation de la morphologie et de l'élongation cellulaire incluant PBP5, PBP6, *MreB* et peut être d'autres acteurs non encore identifiés. (Freire et al., 2009; Guinote et al., 2011).

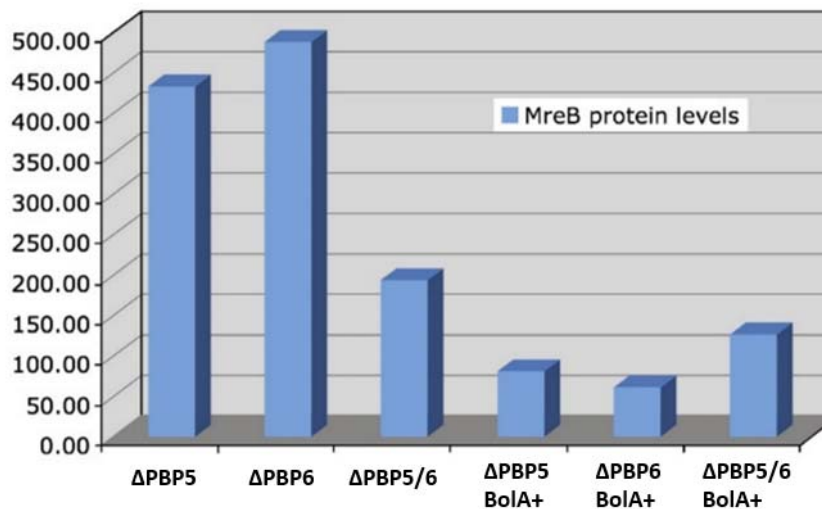


Figure 2.21 L'expression de MreB chez *E. coli* est médiée par BolA et des PBP5 et 6

La suppression des gènes *pbp5*, *pbp6* et des deux en même temps diminuent l'expression de MreB. Ces résultats sont accentués par la surexpression de BolA. Dans chacune des conditions testées ici, l'expression de MreB a été normalisée avec celle du facteur d'élongation EF-Tu. La quantification de MreB en condition normale n'est pas représentée ([Guinote et al., 2011](#)).

Un de ces acteurs pourrait être la protéine FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z) qui est une protéine de type tubuline. Cette protéine forme une structure dynamique en forme d'anneau au milieu de la cellule qui initie l'assemblage du divisome et permet ainsi la constriction cellulaire ([Margolin, 2005](#)). Avant la division cellulaire, la synthèse de peptidoglycane latérale diminue au profit de la synthèse de peptidoglycane polaire afin d'initier la formation du septum de division ([Mirelman et al., 1977](#)). Ce processus est ordonné par un complexe impliquant de nombreuses protéiques comme FtsW, FtsA, ZipA et PBP3 ([Randich & Brun, 2015](#)) ([Krupka et al., 2018](#)). Lorsque la protéine BolA est simplement surexprimée, une augmentation de l'activité de PBP5 et 6 sont observées, produisant une augmentation des pentapeptides au sein de la paroi latérale ([Chowdhury et al., 2010](#); [Santos et al., 2002](#)). Lors de la division cellulaire, PBP3 est responsable de la synthèse de peptidoglycane polaire. Mais PBP3 nécessite des pentapeptides lors de la synthèse du peptidoglycane polaire ([Castanheira et al., 2018](#)). Lorsque FtsZ est perdu, le recrutement des acteurs de la division est empêché, perturbant la formation du divisome. Ainsi, des défauts de la constriction cellulaires sont présents ([Aldea et al., 1988](#); [Castanheira et al., 2017](#)). Et lorsque la protéine BolA est surexprimée en plus de la perte de FtsZ, l'assemblage du divisome est d'une part perturbée, mais PBP3 est incapable de synthétiser la paroi septale, rendant impossible la formation de bactéries de forme ronde (Figure 2.22). La protéine FtsZ pourrait donc être un nouvel acteur

protéique parmi MreB, PBP5 et 6 et BolA dans la morphologie bactérienne ([Aldea et al., 1988](#); [Castanheira et al., 2017](#)).

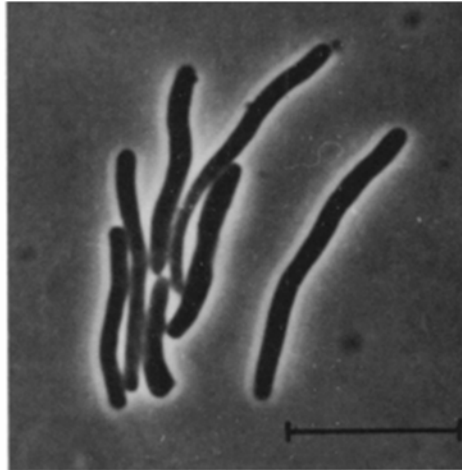


Figure 2.22 La perte du gène *ftsZ* associée à la surexpression de la protéine BolA empêche la formation de bactéries rondes.

La protéine FtsZ semble être un nouvel acteur dans la morphologie bactérienne. La barre d'échelle indique 10 μm ([Aldea et al., 1988](#)).

2.3.3 La protéine IbaG est un homologue de la protéine BolA impliqué dans le stress et la morphologie

Des homologues appartenant aux protéines de type BolA sont retrouvés chez de nombreux êtres vivants. Un d'entre eux a également été retrouvé chez *Escherichia coli*, et qui a montré une nouvelle fois un rôle dans la réponse face au stress et dans l'intégrité de l'enveloppe. Cette protéine initialement nommée *yrbA* a été renommée *ibaG* pour « Influenced By Acid Gene » notamment pour son expression naturelle en condition de stress acide ([Guinote et al., 2012](#); [Takamatsu et al., 1999](#)).

Chez *Escherichia coli*, la protéine IbaG est constituée de 84 acides aminés pour une masse de 9,66 kDa (Figure 2.23). C'est également un régulateur de réponse qui partage la même structure secondaire que son homologue BolA. La séquence correspondant à son motif HCH n'a été identifié que chez *V. cholerae* et comprend les résidus FADMSRV ([Fleurie et al., 2019](#)).

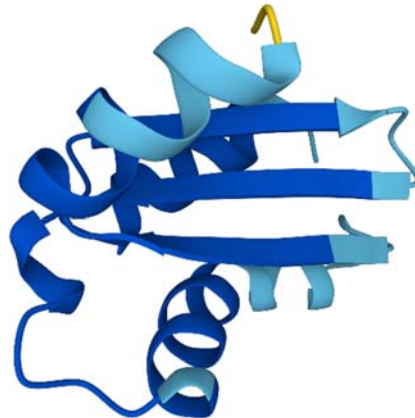


Figure 2.23 Prédiction AlphaFold de la structure de la protéine IbaG d'*E. coli* (Code PDB 1NY8)

Les bases de données de l'European Bioinformatics Institute comprennent de nombreuses structures protéiques qui sont prédites automatiquement, et la protéine IbaG d'*E. coli* en fait partie. Un score de confiance entre 0 et 100 est attribué à chaque résidu. La plupart des résidus montrent un score entre 90 et 100. ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

IbaG est également placée sous le contrôle du facteur σ^{70} mais cette protéine ne régule pas les mêmes gènes ([Guinote et al., 2012](#)). Le gène *ibaG* est situé en amont du gène essentiel *murA*, impliqué dans la synthèse des précurseurs de la muréine à partir d'acide N-acétylglucosamine et de phosphoénolpyruvate (Figure 2.24) ([Brown et al., 1995](#)). *ibaG* est cotranscrit avec *murA*, suggérant qu'*ibaG* possède un rôle dans la synthèse de la muréine ([Guinote et al., 2012](#)). Le gène *ibaG* est situé en aval du locus *mIaBCDEF* (Figure 2.24). Ce locus code pour un système de transport ABC (ATP Binding Cassette transporter) dont la fonction est d'empêcher l'accumulation de phospholipides au niveau de la paroi externe des bactéries Gram négatives ([Fleurie et al., 2019](#); [Guinote et al., 2012](#); [Malinverni Juliana & Silhavy Thomas, 2009](#)).

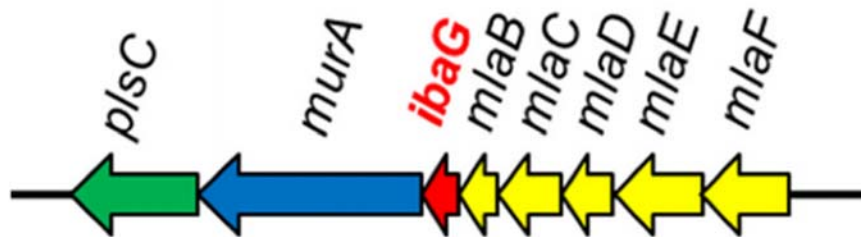


Figure 2.24 Position du gène *ibaG* au sein du génome d'*E. coli*

Le contexte génomique d'*ibaG* est identique entre *E. coli* et *V. cholerae*. Chez le colibacille, le gène *ibaG* est cotranscrit avec *murA* (Fleurie et al., 2019).

Un homologue de la protéine IbaG d'*E. coli* est retrouvé chez *Vibrio cholerae* et porte le même nom. Ces deux protéines partagent également une position relative identique par rapport aux gènes alentour (Figure 2.24). Cependant, les conséquences d'une suppression d'*ibaG* ne sont pas les mêmes entre les deux souches (Fleurie et al., 2019).

Chez *E. coli*, la suppression du gène *ibaG* entraîne une diminution significative de la croissance bactérienne en condition de stress acide (Fleurie et al., 2019; Guinote et al., 2012). Chez *V. cholerae*, *ibaG* répond au stress acide mais confère également une protection contre d'autres molécules stressantes pour la cellule. En effet, la résistance face à des molécules ayant pour cible la paroi, la membrane plasmique ainsi que la synthèse protéique diminue lorsque le gène *ibaG* est supprimé (Fleurie et al., 2019). Uniquement démontré chez *V. cholerae*, la protéine IbaG est capable de contrôler la morphologie cellulaire ainsi que l'intégrité de l'enveloppe. En effet si cette protéine est supprimée, un allongement des cellules peut être observé (Figure 2.25) (Fleurie et al., 2019; Guinote et al., 2012).

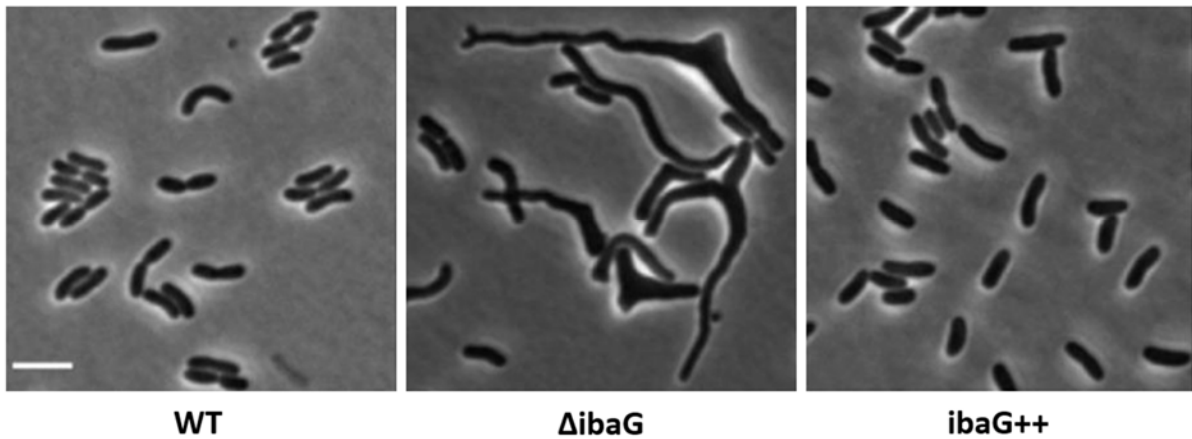


Figure 2.25 IbaG est impliqué dans l'intégrité de l'enveloppe et dans la morphologie chez *V. cholerae*. Lorsque *ibaG* est supprimé chez *V. cholerae*, un allongement des cellules ainsi que des défauts morphologiques sont observés. Le phénotype sauvage est retrouvé en surexprimant le gène. La barre d'échelle indique 2 μ m (Fleurie et al., 2019).

Pour comprendre comment IbaG contrôle l'enveloppe chez *V. cholerae*, les différents gènes que cette protéine régule ont été identifiés (Figure 2.26).

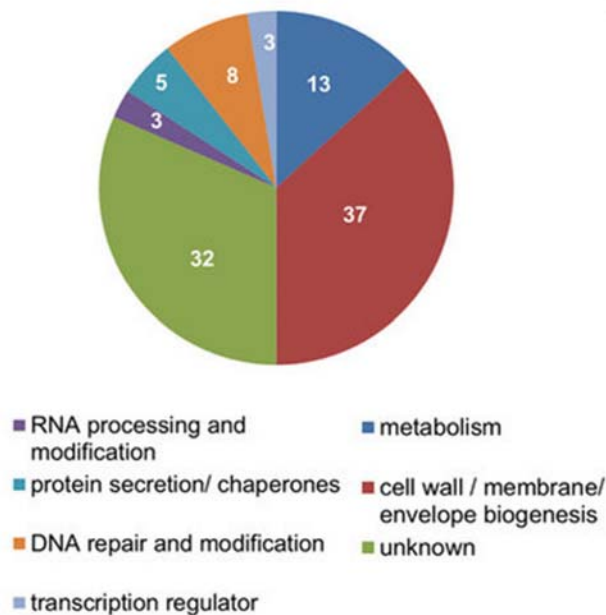


Figure 2.26 Gènes régulés par IbaG chez *V. cholerae*. Un tiers des gènes régulés par IbaG chez *V. cholerae* correspondent à des gènes impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe, de la paroi et de la membrane (Fleurie et al., 2019).

Chez *V. cholerae*, IbaG régit l'enveloppe à travers la régulation de gènes impliqués dans l'intégrité de la paroi, de la membrane et dans la synthèse de peptidoglycane, dont les gènes *mlaBCD*, *pbp1A* et *lpoA* ([Fleurie et al., 2019](#)). Décrit plus tôt, il a été montré qu'une suppression du locus *mlaBCD* chez *Haemophilus influenzae* impacte son processus d'infection, en modifiant l'asymétrie de sa membrane ([Fernández-Calvet et al.](#)). PBP1A est une enzyme de la paroi qui possède une activité glycosyltransférase et transpeptidase formant un complexe avec la protéine LpoA, une lipoprotéine de la membrane externe. Ces deux protéines ont d'ailleurs déjà montré une coopération dans l'homéostasie de la paroi de *V. cholerae* ([Dörr et al., 2014](#); [Yin et al., 2020](#)). La suppression du gène *ibaG* entraîne en aval une perturbation de nombreux acteurs de l'intégrité de l'enveloppe, montrant l'importance de cet homologue dans la paroi et la membrane.

3 HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Les *Neisseria* ont subi de nombreux changements au cours de leur évolution. Ces changements ont été orchestrés dans l'objectif de s'adapter et de trouver de nouvelles niches écologiques propices à leur développement. Dans le cas des *Neisseria* habitant le nasopharynx, ce besoin de s'adapter est dû aux pressions du système immunitaire du nasopharynx et aussi aux nouvelles conditions physico-chimiques retrouvées dans cet écosystème. Chez ces bactéries, nous avons détecté des modifications de l'enveloppe expliquées par un changement de la morphologie et par la perturbation de nombreux mécanismes associés à l'élongation et à la division cellulaire. Ces modifications cellulaires sont dues à des événements génétiques naturellement sélectionnés jusqu'à ce que de nouvelles espèces réussissent à s'adapter à de nouvelles niches écologiques ([Lenski, 2017](#)). Cependant, dans ces processus d'adaptations, de nombreux échanges génétiques sont réalisés et l'acquisition de facteurs de virulence peut conduire à l'apparition de pathogènes, comme *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae*. Ces événements génétiques correspondent à divers événements de suppressions et d'insertions de gènes. Concernant les événements génétiques liés à la divergence des bacilles et des coques, c'est la suppression d'un gène nommé *yacF* qui a été trouvée. Mais la reconstitution de cet événement dans un bacille de forme ancestrale n'a pas permis de reconstituer l'évolution. C'est pour cette raison que le laboratoire du Pr. Veyrier s'est intéressé à l'apparition de changements d'acides aminés dans les protéines.

C'est ainsi que la protéine de type BolA nommé BolA1 a été trouvée. Cette protéine a été jugée intéressante dans la recherche des derniers acteurs de la transition morphologique car cette protéine a subi une mutation que toutes les espèces en forme de coque possèdent mais qu'aucune espèce en forme de bâtonnet ne possède. La mutation acquise par la protéine BolA1 au niveau du motif de fixation à l'ADN aurait pu perturber son activité et ainsi participer à la transition morphologique. L'idée de travailler avec la protéine BolA1 est donc issue de l'objectif de trouver les acteurs non identifiés afin d'expliquer l'adaptation des *Neisseria* au nasopharynx et indirectement dans leur évolution vers la pathogénicité. Et c'est au cours de cette étude qu'un autre homologue, BolA2, a été identifié. Chez les *Neisseria*, nous ne connaissons pas le rôle des protéines BolA1 et BolA2. En vue des nombreux rôles connus chez les protéines de type BolA dans le vivant et de leur divergence phylogénétique avec les autres protéines de type BolA, il n'est pas possible de déterminer à l'avance le rôle des protéines BolA1 et BolA2. En se basant sur le rôle connu de la protéine BolA chez *E. coli* dans la régulation de la machinerie

d'élongation dont les gènes MreB et certaines PBP, le laboratoire a supposé que la mutation acquise par la protéine BolA1 chez les *Neisseria* aurait pu avoir un impact sur l'activité de la machinerie d'élongation avant sa perte naturelle. Bien que BolA2 n'ait pas montré de lien avec la transition morphologique des *Neisseria*, il nous a paru important d'apporter notre savoir et nos expériences afin d'étendre la littérature des protéines de type BolA dans ce genre bactérien.

Nous avons également choisi de travailler sur le modèle bactérien en forme de bâtonnet *N. elongata* qui a déjà servi de modèle dans de précédentes recherches sur la transition morphologique des *Neisseria* ([Veyrier et al., 2015](#)).

Ainsi mon hypothèse est que les homologues de BolA retrouvés chez *N. elongata* appelés BolA1 et BolA2 régulent la transcription de gènes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane ou de l'enveloppe chez *Neisseria elongata*. Pour répondre à cette hypothèse, deux objectifs ont été mis au point. Le premier objectif consiste dans un premier temps à supprimer de manière indépendante les gènes *bolA1* et *bolA2* du bacille *N. elongata* et dans un deuxième temps, à compléter ces gènes grâce à une méthode de modifications génétiques non marquées que nous avons récemment mise au point et publiée dans le « *Canadian Journal of Microbiology* ». La particularité de cette méthode est de réaliser grâce à la recombinaison homologue de nombreuses modifications (insertions, suppression et substitutions) à la suite dans une même souche sans laisser de gène de résistance à la fin de l'expérience. A la suite de ces modifications génétiques, le deuxième objectif consiste à caractériser les deux gènes *bolA1* et *bolA2* chez *N. elongata*. A partir des souches issues du premier objectif, je souhaite découvrir les gènes régulés par *bolA1* et *bolA2* par séquençage des ARN grâce à la technologie Illumina. Ensuite, je souhaite vérifier par MET (Microscopie Electronique à Transmission) si ces résultats transcriptomiques sont liés à de possibles changements de la morphologie.

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 Souches bactériennes, plasmides et amorces

4.1.1 Souches bactériennes

Cette étude a été réalisée sur *N. elongata subsp. glycolytica* ATCC 29315, un bacille appartenant au genre *Neisseria* et à la famille des *Neisseriaceae*. Cette espèce est le modèle de forme ancestrale qui a déjà été utilisé dans l'étude de l'évolution de la morphologie des symbiotes résidant dans le nasopharynx menée par Frédéric Veyrier en 2015. Cette espèce est une bactérie commensale de la cavité buccale de l'être humain. Elle n'est donc pas pathogène. Son génome complet constitué de 2 256 647 pb (paires de bases) est retrouvé dans les bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ce génome annoté *N. elongata subsp. glycolytica* ATCC 29315 a été séquencé en 2015 grâce à la technologie de séquençage PacBio. A partir de cette souche, différents mutants ont été créés à l'aide de différents plasmides transformés et insérés dans le génome par double recombinaison homologue (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 Souches utilisées lors de ce projet

Nom de la souche	Détails	Références
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i> ATCC 29315	Souche sauvage de <i>N. elongata</i> .	(Veyrier et al., 2015)
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> *	Souche de <i>N. elongata</i> résistante à la streptomycine. Elle est nécessaire à notre méthodologie de modifications génétiques non-marquées.	(Nyongesa et al., 2022a)
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i>	Suppression du gène <i>bolA1</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> *.	Cette étude.
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> : RPLK	Insertion de la cassette de sélection RPLK chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> . La résistance à la streptomycine est perdue mais une résistance à la kanamycine est acquise.	Cette étude.
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> : <i>porBp-bolA1_{Nm}</i>	Surexpression du gène <i>bolA1_{Nm}</i> (<i>N. meningitidis</i>) chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> Δ <i>bolA1</i> . L'insert remplace la cassette RPLK et la souche retrouve sa résistance à la streptomycine.	Cette étude.
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> :: RPCC	Suppression du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> . La cassette RPCC remplace le gène <i>bolA2</i> .	(Nyongesa et al., 2022a)
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i>	Suppression non marquée du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> . La cassette RPCC a été perdue.	(Nyongesa et al., 2022a)
<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> :: <i>bolA2</i>	Complémentation du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> .	(Nyongesa et al., 2022a)

4.1.2 Plasmides

Afin de créer les différents mutants chez *N. elongata*, différents plasmides ont été créés ou synthétisés par l'entreprise Biobasics (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 plasmides utilisés lors de ce projet

Nom du plasmide	Détails	Références
<i>pUC57 : 5'3'bolA1Ne : Ery</i>	Suppression du gène <i>bolA1</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL*</i> . Ce dernier est remplacé par un gène de résistance à l'érythromycine.	Cette étude.
<i>pUC57 : 5'3'Ne : RPLK</i>	Insertion de la cassette de sélection RPLK chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA1</i> .	Cette étude.
<i>pUC57 : 5'3'Ne : porBp-bolA1_{Nm}</i>	Surexpression du gène <i>bolA1</i> de <i>N. meningitidis</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA1 : RPLK</i> . Ce gène s'insère à la place de la cassette RPLK.	Cette étude.
<i>pUC57 : 5'3'bolA2Ne : RPCC</i>	Suppression du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> . Ce dernier est remplacé par la cassette de sélection RPCC.	(Nyongesa et al., 2022a)
<i>pUC57 : 5'3'bolA2Ne</i>	Suppression non marquée du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL ΔbolA2 :: RPCC</i> . Permet d'enlever la cassette RPCC.	(Nyongesa et al., 2022a)

4.1.3 Amorces

L'utilisation de plusieurs couples d'amorces a ensuite permis de vérifier les différentes souches nouvellement formées par Polymerisation Chain Reaction (PCR). Certaines amorces ont permis également de créer différents inserts pour les complémentations (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 Amorces utilisées lors de ce projet

Couple d'amorces	Utilisation	Références
BolA1_Ne_F	Ces deux paires d'amorces permettent de vérifier l'absence du gène <i>bolA1</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA1</i>	Cette étude.
BolA1_Ne_R		
5'BolA1_Ne_F		
3'BolA1_Ne_R		
BolA2_Ne_F	Vérification de l'absence du gène <i>bolA2</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA2</i> :: RPCC et <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA2</i> . Permettent également de vérifier la complémentation de <i>bolA2</i> dans la souche <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA2</i> :: <i>bolA2</i>	(Nyongesa et al., 2022a)
BolA2_Ne_R		
5'BolA2_Ne_F		
3'BolA2_Ne_R		
BolA1_Nm_F	Vérification de l'insertion du gène <i>bolA1_{Nm}</i> chez <i>N. elongata</i> : <i>rpsL* ΔbolA1</i> : <i>porBp-bolA1_{Nm}</i>	Cette étude.
BolA1_Nm_R		
PorB_F_BgIII	Amplification du promoteur <i>porBp</i> de <i>N. meningitidis</i> avec une portion du gène <i>bolA1_{Nm}</i> en 3'. L'amorce PorB_F_BgIII permet également de fusionner cet amplicon avec celui décrit ci-dessous	Cette étude.
PorBBolA1_Nm_R		
PorB_BolA1_Nm_F	Amplification du fragment correspondant au gène <i>bolA1</i> de <i>N. meningitidis</i> avec une portion du promoteur <i>porBp</i> en 5'. L'amorce BolA1_Nm_BgIII_R permet également de fusionner ce fragment avec celui de la ligne ci-dessus pour obtenir le gène doté du promoteur <i>porBp</i> .	Cette étude.
BolA1_Nm_BgIII_R		

4.2 Préparation de milieux de cultures

4.2.1 Généralités

Les souches d'*E. coli* DH5 α utilisées lors de ce projet sont cultivées dans du milieu Lysogeny broth (LB). Le milieu LB est un milieu nutritif composé pour un litre d'eau distillée de : 10 g de NaCl, 10 g de tryptone et 10 g d'extrait de levure. Pour du milieu solide, 10 g d'agar sont rajoutés.

Neisseria elongata a été cultivée sur un milieu GCB (GonoCoccal Base) contenant les suppléments de Kellogg ([Kellogg et al., 1963](#)). Ce milieu permet la croissance de toutes les bactéries appartenant à la famille des *Neisseriaceae*, même les plus exigeantes. Ce milieu permet également d'absorber grâce à l'amidon, les métabolites toxiques sécrétés par les *Neisseria* ([Chandler et al., 1974](#)). Pour préparer du milieu GCB, 36 g d'une préparation du fournisseur Oxoid (GC AGAR BASE CM0367) sont dissous dans un litre d'eau distillée. Le mélange contient 15 g de protéose peptone, 5 g de chlorure de sodium (NaCl), 4 g d'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4), 1 g de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) et d'1 g d'amidon de maïs. Pour du milieu solide, 10 g d'agar-agar sont rajoutés. Les suppléments de Kellogg sont composés de deux préparations. Le premier supplément contient pour un litre d'eau distillée : 208 g de glucose, 5,2 g de L-glutamine et 10,4 mg de cocarboxylase. Dans le deuxième supplément, 300 mg de nitrate ferrique non hydraté sont ajoutés dans 60 mL d'eau distillée. Le milieu GCB est stérilisé sans suppléments en l'autoclavant, tandis que les suppléments sont filtrés (0,22 μ m), du fait qu'ils sont sensibles à la chaleur. Le milieu GCB supplémenté final contient 1 % du supplément 1 et 0,1 % du supplément 2.

4.2.2 Agents de sélection

Lors de la sélection des mutants, il est nécessaire d'utiliser des milieux contenant un ou plusieurs marqueurs de sélection. La concentration est différente selon l'espèce étudiée (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 Agents de sélection et différentes concentrations utilisés lors de ce projet

Agent de sélection	Concentration initiale	Concentration finale (<i>N. elongata</i>)	Concentration finale (<i>E. coli</i>)
Chloramphénicol	25 mg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL
Erythromycine	50 mg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL
Kanamycine	100 mg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
Streptomycine	100 mg/mL	100 µg/mL	-
X-Gal	20 mg/mL	20 µg/mL	20 µg/mL

4.3 Manipulation des souches

4.3.1 Conservation des souches

Les différentes souches de *Neisseria elongata* créées lors de ce projet ont été stockées à -80 °C afin de maintenir la viabilité des cellules pour les expériences futures. Les basses températures permettent d'arrêter toutes réactions biologiques et de préserver les cellules. Pour éviter les dommages causés par le froid, un agent cryoprotecteur va être utilisé. Ainsi afin de conserver les différentes souches, du milieu GCB liquide contenant 15 % de glycérol a été utilisé.

4.3.2 Incubation et manipulation des souches

Pour la transformation des cellules d'*E. coli* DH5α compétentes avec des plasmides ([Chan et al., 2013](#)), la méthode par choc thermique a été utilisée. Les cellules sont préalablement rendues compétentes par traitement chimique à l'aide d'une solution de CaCl₂. Une fois les bactéries transformées avec 100 ng d'ADN plasmidique, ces dernières ont été cultivées sur milieu LB avec le marqueur de sélection approprié. Les plasmides ont ensuite été extraits grâce au kit de QIAprep Spin Miniprep Kit du fournisseur QIAGEN. Avant d'être transformés chez les *Neisseria*, les plasmides extraits sont linéarisés par l'enzyme de restriction Scal fournie par l'entreprise New England Biolab (NEB). Cette enzyme coupe une unique fois sur les plasmides pUC57 en dehors des régions recombinantes afin de faciliter les transformations.

Pour la manipulation des souches de *Neisseria*, celles-ci ont été mises en culture sur milieux gélosés avec ou sans agents sélectifs puis été incubées toute une nuit (16 à 18 heures) à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ (Dioxyde de Carbone). Les *Neisseria* pathogènes comme *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* utilisées dans le laboratoire sont classées dans le groupe de risque 2 dans la classification des agents biologiques. Bien que *N.*

elongata ne soit que dans le groupe de risque 1, toutes les manipulations impliquant des espèces de *Neisseria* sont réalisées dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 avec des règles de biosécurité strictes et définies. La transformation des souches de *Neisseria* est facilitée par leur compétence naturelle et l'usage de la recombinaison homologe. Au cours de ce projet, les transformations ont été réalisées en déposant environ 1 µg d'ADN à transformer sur un étalement frais de la bactérie à modifier sur GCB + MgCl₂ (Chlorure de Magnésium), qui facilite la capacité des cellules à récupérer l'ADNe ([Chan et al., 2013](#)). Après 6 heures d'incubation à 37°C et à 5 % de CO₂, les bactéries en contact avec l'ADN ont été récupérées puis étalées sur le milieu de culture sélectif.

4.4 Analyses in silico

4.4.1 Prédictions de structures protéiques AlphaFold

Nous avons eu besoin des structures protéiques des différentes protéines de type BolA étudiées au sein de ce projet. Au sein de la base de données de l'European Bioinformatics Institute, la prédiction de la structure des protéines dont nous avons besoin y figuraient. Ces structures sont prédites grâce à l'intelligence artificielle AlphaFold qui permet de visualiser en trois dimensions n'importe quelle structure protéique à partir de sa séquence d'acides aminés. Un score de confiance situé entre 0 et 100 est attribué pour chaque acide aminé placé en 3D au sein de d'une prédiction. ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

4.4.2 Prédictions de structures secondaires

A partir des séquences protéiques des différentes protéines étudiées au sein de ce projet, nous avons été capables de prédire les différentes structures secondaires (hélices et feuillettes) afin de premièrement, les comparer aux structures secondaires des protéines BolA connues du vivant, et deuxièmement, afin de déterminer la séquence correspondant au motif HCH des protéines BolA1 et BolA2 de *N. elongata*, et de la protéine BolA1 de *N. meningitidis*. Ces prédictions ont été permises grâce à l'outil PSIPRED 4.0. Plus précisément, l'analyse d'intérêt est nommée « Predict Secondary Structure ». En plus d'être capable d'identifier les structures en hélice ou en feuillet, l'outil aurait été capable s'il y en avait, de trouver des peptides signaux ou même d'autres domaines putatifs. ([Jones & Thornton, 2022](#); [Kandathil et al., 2022](#); [Moffat et al., 2022](#)).

4.4.3 Alignement de structures topologiques entre protéines

A l'issue des prédictions AlphaFold des structures protéiques étudiées ici, nous avons voulu savoir si leur structure d'un point de vue topologique était semblables. L'outil US-Align (Universal Structural alignment) permet de fournir, entre deux protéines, un score nommé TM-Score entre 0 et 1, qui indique la similarité topologique entre ces protéines. La valeur de 0 indique une similarité inexistante et une valeur de 1, une similarité parfaite. Ce score dépend de la longueur des différentes séquences. Ainsi, lorsque que nous avons comparé deux protéines au sein de cette étude, la protéine de référence correspondait à la plus lourde (plus longue chaîne peptidique) ([Zhang et al., 2022](#)).

4.4.4 Alignements protéiques

Grâce à l'outil MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation) accessible via le logiciel Mega version 11.0.13 pour Windows 10, nous avons réalisé de la phylogénie moléculaire dans le but de créer un arbre phylogénétique référencant un maximum d'homologues de type BolA. Nous avons souhaité comprendre les liens de parenté entre les protéines étudiées au sein de ce projet avec les autres protéines de type BolA du vivant ([Tamura et al., 2021](#)).

Également, nous avons utilisé encore une fois l'outil MUSCLE afin de simplement comparer la séquence protéique des deux protéines de type BolA provenant de *N. elongata* avec la séquence de la protéine BolA1 de *N. meningitidis*, mais également avec la séquence des deux protéines de type BolA retrouvées chez l'entérocoque. Cet alignement plus simple que le précédent nous a servi à fournir un visuel sur ces séquences, notamment sur les motifs HCH et les potentiels sites de phosphorylation ([Tamura et al., 2021](#)).

Enfin, nous avons mesuré à l'aide d'un BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool Program protein) l'identité entre chacune de ces séquences protéiques afin de comparer les résultats obtenus lors de l'alignement des structures topologiques ([Altschul et al., 1990](#)).

4.4.5 Prédiction des potentiels sites de phosphorylation

A partir des résultats de l'alignement via l'outil MUSCLE sur les différentes protéines de type BolA étudiées, nous avons prédit grâce à l'outil NetPhos 3.1 les potentiels sites de phosphorylation retrouvés au niveau de ces protéines. Nous avons réalisé cette analyse afin de

comprendre si la mutation A93K apparue au niveau de la protéine BolA1 au cours de la transition morphologique des *Neisseria* se situe proche d'un potentiel site de phosphorylation voir d'un motif HCH ([Jones & Thornton, 2022](#); [Kandathil et al., 2022](#); [Moffat et al., 2022](#)).

4.5 Création de mutants

4.5.1 Méthode marquée

Afin de créer la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*, le plasmide pUC57 : 5'3' BolA1Ne : Ery provenant du fournisseur Biobasic a été utilisé. Ce dernier est doté autour du gène de résistance à l'érythromycine de régions identiques aux régions entourant le gène *bolA1* de *N. elongata*. L'usage de la recombinaison homologue a ainsi permis de supprimer le gène *bolA1* pour le remplacer par le marqueur de sélection. Le mutant correspondant à la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* a été sélectionné sur milieu GCB avec de l'érythromycine (Tableau 4.4). Afin de s'assurer de la bonne suppression du gène *bolA1*, une PCR a été réalisée avec deux couples d'amorces. En comparant avec la souche sauvage sur gel d'agarose à 1 %, le couple *bolA1*_Ne_F et R n'amplifie le gène que s'il est présent. Puis le couple 5'BolA1_Ne_F et 3'BolA1_Ne_R qui se fixe autour du gène *bolA1* doit montrer une bande de plus faible taille dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*. Une fois le mutant créé, celui-ci a été stocké dans du GCB liquide à 15 % de glycérol à -80° C.

4.5.2 Méthode non marquée

En 2022, le laboratoire du Professeur Frédéric Veyrier a publié une méthode de clonage dans le Canadian Journal of Microbiology nommé *Sequential markerless genetic manipulations of species from the Neisseria genus* ([Nyongesa et al., 2022a](#)). Cette méthode montre la capacité de réaliser plusieurs événements génétiques tels que des suppressions, des insertions ou des substitutions à la suite dans une même souche. En utilisant la recombinaison homologue et la compétence naturelle des *Neisseria*, cette méthode est simple et efficace afin de réaliser de nombreux clonages à la suite. La particularité de cette technique est de ne laisser aucun gène de résistance à la fin de l'expérience.

Au cours de mon projet, cette méthode a été utilisée dans un premier temps afin de supprimer le gène *bolA2* dans la souche *N. elongata* : *rpsL** et dans un deuxième temps afin de surexprimer le gène *bolA1_{Nm}* chez *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*. Le principe de cette méthode est

basé sur la dominance de la sensibilité à un antibiotique (ici la streptomycine) par rapport à la résistance qui est donc récessive. Tout d'abord, le gène *rpsL* a été muté dans la souche *N. elongata* sauvage grâce à la transformation d'oligonucléotides de 100 nt contenant la mutation K43R. Le gène *rpsL* est unique dans le génome et code pour une protéine ribosomale conservée chez les bactéries. Cette mutation permet de rendre la bactérie résistante à la streptomycine. La streptomycine est un antibiotique qui se fixe au niveau de la protéine ribosomale S12 codée par *rpsL*, empêchant la bonne traduction des protéines ([Nair et al., 1993](#)). La mutation K43R du gène *rpsL* modifie la conformation du site de fixation de la streptomycine. Ainsi la molécule ne peut plus se fixer sur la protéine codée par *rpsL*. La bactérie est rendue résistante et l'allèle du gène *rpsL* est dit muté. Cette résistance est dite récessive, car après cette étape, une copie du gène *rpsL* original (l'allèle sauvage) va être insérée à l'endroit d'intérêt du génome c'est-à-dire dans la région où l'on veut réaliser la modification génétique. Cette copie du gène *rpsL* fait partie d'une cassette de sélection insérée au niveau de la région d'intérêt par recombinaison homologue. Au sein de cette cassette synthétisée par Biobasic, on retrouve le promoteur *porBp* qui est un promoteur fort et constitutif des porines de *N. meningitidis*. Ce promoteur est suivi du gène codant pour le chromophore mCherry, une protéine fluorescente souvent utilisée dans la localisation de protéines intracellulaires ([Ransom et al., 2015](#)). Le gène codant pour la protéine mCherry est suivi ensuite du l'allèle sauvage du gène *rpsL* puis du gène de résistance au chloramphénicol appelé *cat*. Cette cassette est nommée RPCC. Elle a été utilisée lors de la suppression de *BolA2*. Pour la surexpression du gène *bolA1_{Nm}*, j'ai utilisé une autre cassette appelée RPLK. Elle est semblable à RPCC, mais le gène de résistance au chloramphénicol est remplacé par celui à la kanamycine, et le chromophore mCherry est remplacé par le gène *lacZ* codant pour la Bêta-galactosidase. Au lieu d'obtenir des clones fluorescents, ces derniers sont bleus en présence de X-gal, un analogue du galactose.

Pour la suppression du gène *bolA2*, le plasmide *pUC57 : 5'3' bolA2Ne : RPCC* synthétisé par Biobasic a été transformé dans la souche de *N. elongata : rpsL**. La cassette RPCC est entourée de régions identiques à celles retrouvées autour du gène *bolA2*, permettant ainsi le remplacement du gène par la cassette de sélection. A ce stade du clonage, la résistance à la streptomycine a été perdue, car cet antibiotique est capable de se fixer sur la nouvelle copie sauvage du gène *rpsL*. La résistance au chloramphénicol et la fluorescence des mutants permettent de s'assurer de récupérer le bon clone (Tableau 4.4). Une vérification par PCR a également été réalisée avec les couples *BolA2_Ne_F* et R, puis *5'BolA2_Ne_F* et *3'BolA2_Ne_R*. Le premier couple amplifiant le gène *bolA2* dans la souche sauvage ne doit pas

montrer d'amplification dans la souche *N. elongata* : *rpsL** : Δ *bolA2* :: RPCC nouvellement créée. Le deuxième couple d'amorces amplifie les régions autour du gène. Son utilisation doit montrer une bande plus grande dans la nouvelle souche que pour la souche sauvage, car RPCC est un fragment assez grand. Cette cassette de sélection RPCC a été perdue lorsque le plasmide *pUC57* : 5'3'*bolA2Ne* a été transformé dans la souche *N. elongata* : *rpsL** : Δ *bolA2* :: RPCC dans le but de créer la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2*. Le mutant finalement non marqué a été sélectionné sur streptomycine. En effet, le gène de résistance au chloramphénicol ainsi que le marqueur mCherry ont été perdus ainsi que l'allèle sauvage du gène *rpsL*. Ainsi, la seule copie du gène *rpsL* est mutée, permettant la résistance à la streptomycine. La souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* peut pousser à nouveau sur streptomycine mais pas sur chloramphénicol et la bactérie n'est plus fluorescente. La même PCR que l'étape précédente a également été réalisée. Le couple BolA2_Ne_F et R ne doit toujours pas amplifier le gène, mais le couple 5'BolA2_Ne_F et 3'BolA2_Ne_R doit montrer une plus faible bande que la souche sauvage car le gène a été perdu. Une fois la souche vérifiée, elle a été stockée dans du GCB à 15 % de glycérol à -80°C.

La complémentation du gène *bolA2* avec son promoteur d'origine a été réalisée dans la souche *N. elongata* : *rpsL** : Δ *bolA2* :: RPCC. Pour cela, les régions entourant le gène *bolA2* dans la souche sauvage ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces 5'BolA2_Ne_F et 5'BolA2_Ne_R puis transformées dans la souche présentant RPCC. La complémentation répond au même principe que pour la suppression non marquée de *bolA2*. Le produit de PCR a été transformé dans la souche *N. elongata* : *rpsL** : Δ *bolA2* :: RPCC et le mutant complétement a été sélectionné sur streptomycine puis vérifié par PCR avec les couples *bolA2_Ne_F* et *bolA2_Ne_R*, puis 5'BolA2_Ne_F et 3' BolA2_Ne_R. Contrairement à la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2*, le premier couple doit montrer la présence du gène et le deuxième couple doit montrer une plus grande amplification.

Cette méthode de clonage non marqué a également permis d'insérer le gène *bolA1_{Nm}* doté du gène *porB* en 5' dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*. Afin de réaliser cette insertion, il a d'abord fallu créer la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : RPLK. Le principe est exactement le même que pour RPCC. Le plasmide *pUC57* : 5'3'*Ne* : RPLK a tout d'abord permis d'insérer la cassette dans une région extra-génique de *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* afin d'introduire ensuite n'importe quel gène sans nuire à l'expression des autres gènes. Les clones ayant acquis la cassette RPLK sont bleus en présence de X-gal et résistants à la kanamycine. De la même façon, la résistance à la streptomycine a été perdue. Initialement, le gène *bolA1* originaire du

bacille *N. elongata* devait être surexprimé dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* mais aucun mutant n'a été obtenu. Cet échec a laissé supposer que le gène devient toxique s'il est trop exprimé. Cependant, le gène *bolA1* issu d'une bactérie ayant divergé vers la forme coque, *N. meningitidis*, a été cloné avec succès. C'est ce gène qui a acquis une mutation à la position 93 et qui correspond à la substitution d'une alanine à une lysine et qui pourrait être un acteur de la transition morphologique des *Neisseria* mentionnée dans la revue de la littérature.

Pour revenir au clonage, la cassette de sélection RPLK a été ensuite remplacée par le gène *bolA1*_{Nm} doté d'un promoteur fort et constitutif. Pour cela, le gène *bolA1* du méningocoque *N. meningitidis* a été amplifié par PCR avec les amorces PorB_BolA1_Nm_F et R BolA1_Nm_BgIII R. Encore chez le méningocoque, le promoteur *porBp* a été récupéré grâce au couple *porB_F_BgIII* et *PorB_F_BolA1Nm_R*. Les deux fragments ont enfin été assemblés par Overlap PCR grâce au couple *porB_F_BgIII* et *bolA1_Nm_BgIII_R*. Ce nouvel insert a été cloné dans le plasmide *pUC57* : 5'3'Ne, qui a initialement permis d'insérer la cassette RPLK dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*. Par l'usage de la recombinaison homologue, le nouveau plasmide *pUC57* : 5'3'Ne : *porBp-bolA1*_{Nm} a permis de créer la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm} sélectionnée sur streptomycine car la résistance à la kanamycine ainsi que la capacité à former le substrat chromogène bleu en présence de X-gal ont été perdues. La résistance à la streptomycine a été finalement retrouvée. Les amorces *porB_F_BgIII* et *bolA1_Nm_BgIII_R* ont ensuite permis de vérifier la bonne présence de l'insert une fois le clone obtenu. Enfin la nouvelle souche nommée *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm} a été stockée dans du GCB avec 15 % de glycérol à -80°C.

4.6 Séquençage des ARN

Au sein de ce projet, j'ai voulu caractériser le rôle de *bolA1* et de *bolA2* chez *N. elongata* dans les différentes souches décrites dans la partie « Création de mutants ». Ainsi selon la présence ou l'absence des différents gènes *bolA*, j'ai pu déterminer quels gènes étaient le plus impactés par ces régulateurs. D'un côté, les souches *N. elongata* : *rpsL**, *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm} ont été cultivées en triplicata afin de caractériser le rôle de régulateur de *bolA1*. Dans l'objectif de caractériser le rôle de *bolA2*, les souches *N. elongata* : *rpsL**, *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* : *bolA2* ont été cultivées en triplicata. Les différentes souches ont été cultivées en même temps à 37°C avec 5 % de CO₂ pendant 6h sur milieu GCB sans antibiotique. Après 6h de culture, l'ARN des différentes

souches a été extrait à l'aide du kit RNeasy fourni par QIAGEN permettant l'extraction optimale de l'ARN total des cellules, tissus et levures.

Après l'extraction s'en est suivi le séquençage des ARN. C'est un bio-informaticien de notre laboratoire, Francisco Pulido Barajas qui s'en est chargé. Il s'est assuré de la vérification de la qualité des ARN, de la préparation des banques ainsi que de l'amplification de ces dernières. Finalement, il a séquencé ces banques grâce à la méthode de séquençage de deuxième génération Illumina à l'aide d'un iSeq 100 Sequencing System de la marque Illumina dont le laboratoire dispose. Les banques formées sont constituées de lectures correspondant à des fragments d'environ 150 pb. Ces lectures sont séquencées en "paired-end" c'est-à-dire dans les deux sens. Cela permet de générer des données de haute qualité dans le but de faciliter la formation de contigs et ainsi l'alignement face au génome de référence. J'ai finalement pris le relais lors du traitement des données brutes fournies par le séquençage. Ce traitement a été réalisé à l'aide de la plateforme en ligne open source nommée Galaxy. Cette plateforme permet la réalisation de nombreuses analyses génomiques, protéomiques et métaboliques ([Afgan et al., 2018](#)). Ici sont décrits les différents outils que j'ai utilisés.

Bowtie2 : Les lectures sont alignées avec le génome de référence fermé et annoté de *N. elongata* fourni par le NCBI appelé *N. elongata subsp. glycolytica* ATCC 29315 ([Langmead & Salzberg, 2012](#); [Langmead et al., 2009](#)).

Htseq-count : Cet outil est utilisé afin de compter le nombre de lectures qui sont alignées avec chaque gène retrouvé dans le génome de référence. Pour éviter les faux positifs, les lectures chevauchant plusieurs gènes ainsi que les lectures s'alignant plusieurs fois ne sont pas considérées ([Anders et al., 2015](#)).

DESeq2 : Selon le nombre de lectures comptées, DESeq2 permet de fournir pour chaque gène référencé son expression différentielle relative entre plusieurs échantillons. Ce ratio d'expression pour chaque gène est caractérisé par un FC (Fold Change) en valeur logarithmique de base 2 ainsi qu'une p-value permettant de s'assurer de la validité des résultats. Afin de caractériser le gène *bolA1*, la souche *N. elongata : rpsL** a été comparée à la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA1*. Puis la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA1 : porBp-bolA1_{Nm}* a été comparée à la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA1*. Et d'un autre côté dans le but de caractériser le gène *bolA2*, la souche *N. elongata : rpsL** a été comparée à la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA2*, puis la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA2 :: bolA2* a été comparée à la souche *N. elongata : rpsL* ΔbolA2* ([Love et al., 2014](#)).

4.7 Analyses phénotypiques

De la même façon que pour le séquençage des ARN, les souches créées dans la partie « Création de mutants » ont été cultivées en même temps en triplicata. Les conditions sont identiques à précédemment c'est à dire 37°C avec 5 % de CO₂ pendant 6h sur milieu GCB sans antibiotique. Ici, c'est la morphologie des cellules qui a été étudiée et plus précisément la longueur des cellules. Cette analyse a été rendue possible par MET (Microscopie Electronique à Transmission). Contrairement à un microscope optique, les électrons remplacent les photons. Aussi, les différents échantillons ont été fixés et colorés au préalable. La fixation correspond à un traitement au glutaraldéhyde à 2.5% dans du tampon cacodylate à 0,1 M, pH 7,4 fourni par l'entreprise Electron Microscopie Science. Ce traitement permet de stopper la croissance cellulaire et la dégradation protéique. Après une étape de centrifugation à 5 000 rpm (rotations par minute) pendant 3 minutes, les échantillons ont été lavés 3 fois dans du tampon de lavage cacodylate à 0,2 M, pH 7,2 (fourni par EMS). Les échantillons ont également été mis en contact avec un métal lourd, l'acide phosphotungstique à 1 % pendant 2 secondes car ce sont les électrons qui permettent de créer les images. Ces dernières ont été obtenues au sein de la plateforme INRS-CAFSB par l'agent de recherche Arnaldo Nakamura utilisant un MET Hitachi H-7100.

Ainsi les souches *N. elongata* : *rpsL*^{*}, *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1* et *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm} ont été imagées pour l'étude de BolA1. De la même façon, les souches *N. elongata* : *rpsL*^{*}, *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA2* et *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA2* :: *bolA2* ont été analysées pour l'étude de BolA2. Pour chacune des souches, nous avons mesuré la longueur des cellules c'est-à-dire la distance entre les deux pôles cellulaires. Ces mesures ont été réalisées manuellement avec le logiciel open source de traitement et d'analyses d'images ImageJ ([Schneider et al., 2012](#)). Afin de vérifier si les cellules présentent une différence biologiquement significative entre les différentes souches, nous avons eu recours au test de Mann-Whitney (non apparié et bilatéral) grâce au complément d'Excel (16.0.15427) appelé XLSTAT (2022.3.2) pour Windows 10. Ce test non paramétrique nous a permis de vérifier entre deux populations si la distribution de la longueur des cellules dans la première population est identique à la deuxième ([Addinsoft, 2022](#); [Mann & Whitney, 1947](#); [Microsoft, 2022](#)).

Dans le cadre de l'étude de BolA1, ce test a été réalisé entre la souche *N. elongata* : *rpsL*^{*} et *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1*, puis entre *N. elongata* : *rpsL*^{*} et *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm}, et enfin entre *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1* et *N. elongata* : *rpsL*^{*} Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm}. Dans le cadre de l'étude de BolA2, ce test a été réalisé entre la souche *N. elongata* :

rpsL et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2*, puis entre la souche *N. elongata* : *rpsL* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* :: *bolA2*, et enfin entre *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* :: *bolA2*.

5 RESULTATS

5.1 Les protéines de type BolA chez les *Neisseria*

Dans le modèle bactérien de forme ancestrale des *Neisseria* appelé *N. elongata* (le bacille utilisé par le Pr. Veyrier dans son étude sur l'évolution de ce genre ([Veyrier et al., 2015](#))), on retrouve deux protéines de type BolA appelées BolA1 et BolA2.

Le gène *bolA1*, dont le rôle n'est pas connu, contient 81 acides aminés pour un poids moléculaire de 8,72 kDa. Ce gène est localisé en aval d'une HP (Hypothetical Protein) qui est une protéine dont l'expression est prédite à partir d'un cadre de lecture ouverte. Leurs fonctions ainsi que leur séquence de fixation à l'ADN ne sont pas connues. Le gène *bolA1* est situé en amont du gène *murA*, exactement comme le gène *ibaG* chez *E. coli* et *V. cholerae* (Figure 5.1) ([Fleurie et al., 2019](#); [Guinote et al., 2012](#)).

Ces deux gènes sont co-transcrits chez le colibacille mais cette propriété n'a pas été démontrée chez les *Neisseria*. Cette protéine n'étant pas caractérisée dans le vivant, nous avons voulu déterminer la séquence constituant le motif HCH grâce au logiciel PSIPRED. Premièrement, ce dernier nous a permis de remarquer que les différentes structures secondaires sont semblables avec celles de BolA et de IbaG chez *E. coli* (Figure 5.2 et 5.3). De plus, une séquence prédite du motif HCH a pu être déterminée. Cette séquence contient les résidus FEGKARL. Une remarque intéressante est que 3 de ces résidus (soulignés) sont également retrouvés dans le motif HCH de la protéine BolA d'*E. coli* (Figure 2.13 et 5.3).



Figure 5.1 Contexte génomique du gène *bolA1* chez *N. elongata*

Chez *N. elongata*, *bolA1* est situé en aval d'une HP (Hypothetical Protein) et en amont du gène *murA*, comme le gène *ibaG* chez *E. coli* et *V. cholerae* (Figure du laboratoire Veyrier, non publiée).

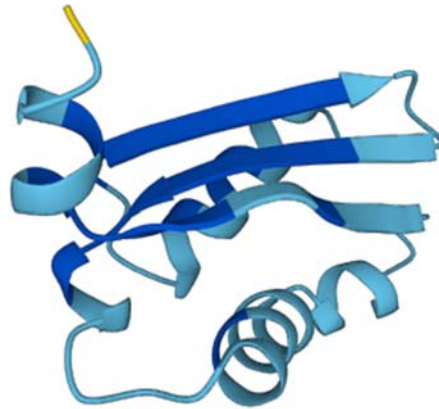


Figure 5.2 Prédiction AlphaFold de la structure de la protéine BoIA1 (n°AF-A0A378U1L1-F1) chez *N. elongata*

Les bases de données de l'European Bioinformatics Institute comprennent de nombreuses structures protéiques qui sont prédites automatiquement, et la protéine BoIA1 de *N. elongata* en fait partie. Un score de confiance entre 0 et 100 est attribué à chaque résidu. Ici, la majorité des résidus montrent un score entre 90 et 100 ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

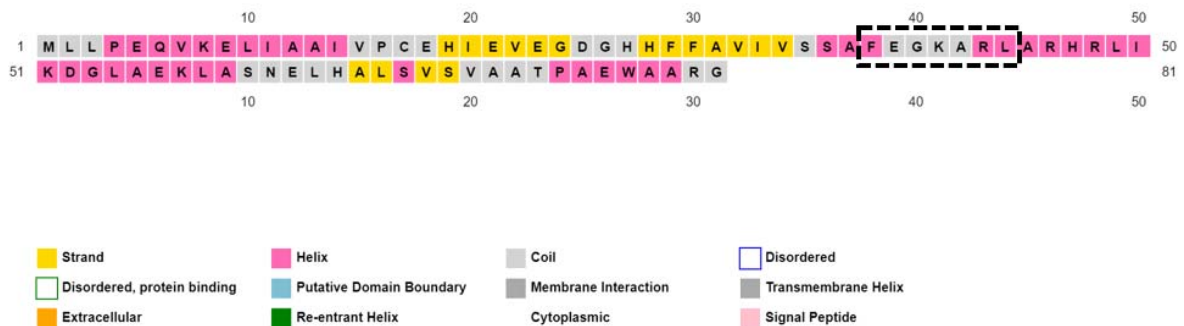


Figure 5.3 Prédiction des structures secondaires de la protéine BoIA1 de *N. elongata*

L'outil PSIPRED nous a permis de montrer la similitude entre les structures secondaires de la protéine BoIA1 avec les protéines de type BoIA connues dans le vivant. Un potentiel motif HCH a également pu être identifié, encadré en rouge sur la figure ([Jones & Thornton, 2022](#); [Kandathil et al., 2022](#); [Moffat et al., 2022](#)).

Chez le bacille *N. elongata*, on retrouve un autre homologue de type BolA, appelé ici BolA2. La protéine BolA2 dont la fonction n'est également pas connue, est constituée de 93 acides aminés pour une masse moléculaire de 10,55 kDa.

Le gène *bolA2* est retrouvé en aval d'un domaine protéique de la famille YCil, un domaine dont le rôle est non caractérisé, mais qui est souvent fusionné avec un domaine protéique retrouvé chez le facteur de transcription σ^{70} . En aval du gène *bolA2*, le gène *ppi* peut être retrouvé, codant pour une Peptidyl prolyl cis/trans isomérase, qui a déjà montré un rôle dans le repliement de protéines nouvellement synthétisées (Figure 5.4) ([Shaw, 2002](#)).

De la même façon que pour BolA1, nous avons utilisé l'outil PSIPRED afin de déterminer les structures secondaires ainsi qu'un potentiel motif HCH. Ainsi, les structures secondaires sont semblables à ce que nous avons déjà observé, et un motif HCH a pu être déterminé (Figure 5.5 et 5.6). La séquence comprenant ce motif est EHDIPRL avec 2 résidus en communs (soulignés) entre ce motif HCH et celui de BolA d'*E. coli* (Figure 2.13 et 5.6).

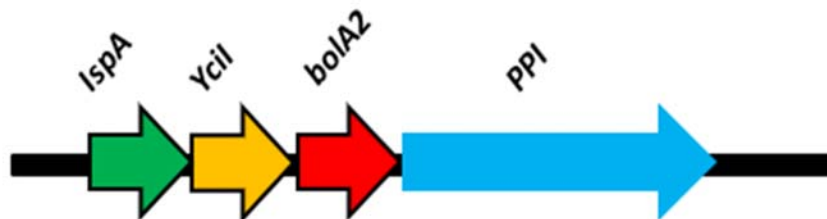


Figure 5.4 Contexte génomique du gène *bolA2* chez *N. elongata*
Chez *N. elongata*, *bolA2* est situé en aval d'un domaine protéique de la famille YCil souvent lié au facteur σ^{70} , et en amont du gène *ppi* impliqué dans le repliement des protéines.



Figure 5.5 Prédiction AlphaFold de la structure de la protéine BoIA2 chez *N. elongata* (n°AF-D4DPH8-F1)

Les bases de données de l'European Bioinformatics Institute comprennent de nombreuses structures protéiques prédites notamment la protéine BoIA2 de *N. elongata*. Un score de confiance entre 0 et 100 est attribué à chaque résidu. Ici, la majorité des résidus montrent un score entre 90 et 100 ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

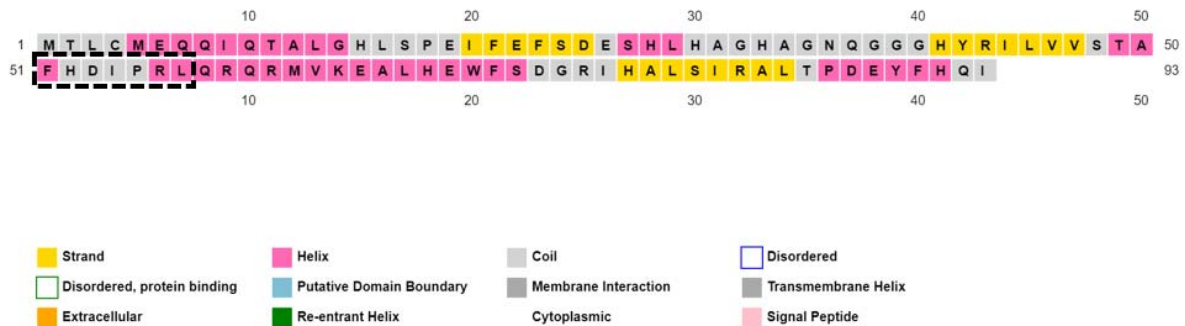


Figure 5.6 Prédiction des structures secondaires de la protéine BoIA2 de *N. elongata*

Les structures secondaires de la protéine BoIA2 et celles des protéines de type BoIA sont semblables. Un potentiel motif HCH a également pu être identifié, encadré en rouge sur la figure ([Jones & Thornton, 2022](#); [Kandathil et al., 2022](#); [Moffat et al., 2022](#)).

Nous avons profité de la disposition en ligne des structures prédites des protéines BolA1 et BolA2 pour comparer leur structure topologique avec celle des protéines BolA et IbaG de l'entérocoque. Pour cela, nous avons utilisé l'outil US-Align (Universal Structural alignment).

Premièrement, en comparant la structure de la protéine BolA1 avec celle de la protéine BolA2, un TM-Score de 0,72 a été obtenu. En comparant BolA1 avec la protéine BolA d'*E. coli*, le score est de 0,66 et il passe à 0,85 en la comparant avec la protéine IbaG d'*E. coli*. BolA1 est suspectée d'agir sur la machinerie d'élongation ([Zhang et al., 2022](#)). Mais l'idée que la structure topologique de BolA1 soit plus proche de celle d'IbaG s'ajoute à l'idée que BolA1 et IbaG partagent *murA* comme gène voisin et possiblement un rôle commun.

En comparant la protéine BolA2 de *N. elongata* avec la protéine BolA d'*E. coli*, un score de 0,74 a été obtenu. Si IbaG devient le gène de référence, le même score a été obtenu ([Zhang et al., 2022](#)). Il est donc difficile à ce point de l'étude d'apporter de nouvelles hypothèses.

Pour aller plus loin dans nos analyses, nous avons voulu comprendre les liens de parentés entre les protéines BolA1 et BolA2 avec les autres protéines de type BolA chez les bactéries. Nous avons aligné ces deux séquences protéiques avec 82 autres protéines de type BolA, dont certaines sont retrouvées dans la famille des *Neisseriaceae* et sont référencées dans la base de donnée InterPro (Voir Annexe).

Grâce à l'outil MUSCLE, nous avons constaté que les protéines BolA1 et BolA2 sont retrouvées dans les différentes espèces de *Neisseriaceae*. De plus, ces deux protéines forment deux groupes distincts assez éloignés d'un point de vue phylogénétique. Les protéines BolA et IbaG d'*E. coli* sont quant à elles très éloignées. Plus précisément, nous avons identifié une divergence qui sépare les deux protéines de type BolA retrouvées chez l'entérocoque. Concernant les protéines BolA1 retrouvées chez les *Neisseriaceae*, celles-ci forment une branche à part en amont de l'arbre. Elles sont donc très éloignées des autres protéines (Voir annexe).

D'un autre côté, nous avons aligné grâce à l'outil MUSCLE la protéine BolA1 de *N. elongata* avec son homologue BolA2, mais aussi avec les deux protéines de type BolA retrouvées chez l'entérocoque (Figure 5.7). De même, nous avons mesuré à l'aide d'un BLAST l'identité entre chacune des séquences protéiques ([Altschul et al., 1990](#)). La protéine BolA1 formant une branche à part de l'arbre (Voir annexe), il n'a pas été surprenant d'observer une faible identité avec les deux protéines de l'entérocoque (Tableau 5.1). Pourtant, la topologie de sa structure a montré un bon TM-Score après l'avoir comparé avec la structure d'IbaG ([Zhang et al., 2022](#)). Il

est possible que les structures secondaires entre les protéines de type BolA soient conservées malgré de faibles similitudes au niveau des séquences protéiques (Tableau 5.1).

Pour BolA2, les données vont dans le même sens que ce qui a été obtenu avec l'alignement des structures topologiques. BolA2 partage autant de similarité avec BolA1 qu'avec IbaG, mais elle montre également un bon score d'alignement des structures topologiques avec ces deux protéines (Tableau 5.1). BolA2 pourrait donc partager plusieurs points communs avec BolA1 et IbaG, que seules les analyses transcriptomiques et morphologiques pourront indiquer.

Enfin, d'autres éléments confortent ce que nous avons remarqué dans l'étude phylogénique réalisée précédemment comme la faible identité entre les protéines BolA et IbaG d'*E. coli*. En effet, ces deux protéines appartiennent à deux branches distinctes et de ce que l'on sait de la littérature, elles ont des rôles similaires mais n'agissent pas de la même façon ([Aldea et al., 1989](#); [Guinote et al., 2012](#)). (Voir Annexe) (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 Pourcentages d'identité entre les protéines de type BolA retrouvées chez *E. coli* et chez *N. elongata*.

	BolA1 <i>N. elongata</i>	BolA2 <i>N. elongata</i>	BolA <i>E. coli</i>	IbaG <i>E. coli</i>
BolA1 <i>N. elongata</i>	-	42,31%	36,78%	32,43 %
BolA2 <i>N. elongata</i>	42,31 %	-	32,14 %	41,18 %
BolA <i>E. coli</i>	36,78 %	32,14 %	-	31,48 %
IbaG <i>E. coli</i>	32,43 %	41,18 %	31,48 %	-

Dans l'optique de comprendre si la substitution d'acide aminé au niveau de la protéine BolA1 durant la transition morphologique a pu impacter sa fonction, nous avons prédit grâce à l'outil NetPhos 3.1 les potentiels sites de phosphorylation retrouvés au niveau de cette protéine ([Blom et al., 1999](#); [Blom et al., 2004](#)). D'ailleurs, certains des sites prédits sont également retrouvés au niveau de la protéine BolA d'*E. coli* (Figure 5.8). Dans cette étude, il a été montré que l'apparition de mutations au niveau de certains sites de phosphorylation autour de motifs HCH pouvait entraîner des dysfonctionnements fonctionnels de la protéine ([Galego et al., 2021](#)).

Ici la mutation A93K est très proche d'un site de phosphorylation mais aussi du motif HCH de la protéine BoIA1 et BoIA1_{Nm} (*Neisseria meningitidis*) (Figure 5.6, 5.7 et 5.8). Même si la mutation n'est pas exactement au niveau de ce site de phosphorylation et de ce motif HCH, celle-ci aurait pu modifier la conformation de la protéine et biaiser soit sa phosphorylation, soit sa fixation à l'ADN voir les deux. Après avoir trouvé la structure AlphaFold prédite de la protéine BoIA1_{Nm} (ayant acquis la mutation A93K), nous l'avons comparé grâce à l'outil US-Align avec la protéine BoIA1 de *N. elongata* (Figure 5.8) ([Zhang et al., 2022](#)). Le TM-Score déterminé est de 0,81. Les structures topologiques sont donc assez semblables alors il est encore difficile de prédire de quelle manière la mutation a modifié le comportement de la protéine. ([Blom et al., 1999](#); [Blom et al., 2004](#); [Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

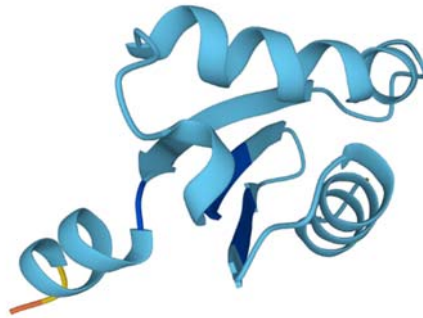


Figure 5.7 Prédiction AlphaFold de la structure de la protéine BoIA1_{Nm} chez *N. meningitidis* (n°AF-C6SBS6-F1)

Les bases de données de l'European Bioinformatics Institute comprennent de nombreuses structures protéiques prédites notamment la protéine BoIA1 de *N. meningitidis*. Un score de confiance entre 0 et 100 est attribué à chaque résidu. Ici, la plupart des résidus montrent un score entre 70 et 90 ([Jumper et al., 2021](#); [Varadi et al., 2022](#)).

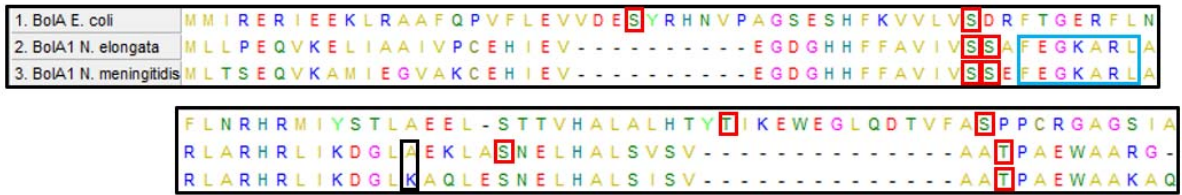


Figure 5.8 Alignement de la protéine BoIA1 (*N. elongata* et *N. meningitidis*) avec l'homologue BoIA (*E. coli*) et prédiction des potentiels sites de phosphorylation

Les sites de phosphorylation sont encadrés en rouge. Ils sont connus au niveau de la protéine BoIA (*E. coli*) et sont prédits grâce à l'outil NetPhos 3.1 pour les deux autres protéines. L'encadrement en bleu correspond aux motifs HCH des protéines BoIA1 de *N. elongata* et de *N. meningitidis*. L'encadrement en noir correspond à la mutation qu'a rencontré la protéine BoIA1 au cours de l'évolution ([Blom et al., 1999](#); [Blom et al., 2004](#); [Galego et al., 2021](#)).

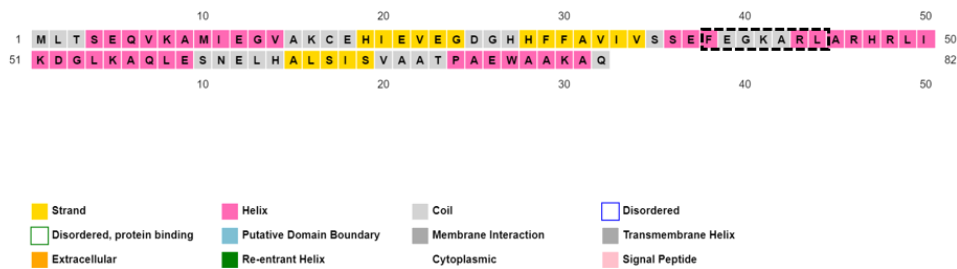


Figure 5.9 Prédiction des structures secondaires de la protéine BoIA1 de *N. meningitidis*

Les structures secondaires de la protéine BoIA1 et celles des protéines de type BoIA sont semblables. Un potentiel motif HCH a également pu être identifié, encadré en rouge sur la figure ([Jones & Thornton, 2022](#); [Kandathil et al., 2022](#); [Moffat et al., 2022](#)).

5.2 Analyses transcriptomiques

5.2.1 Le rôle de la protéine BoIA1 dans la régulation des gènes de *N. elongata*

***N. elongata* : rpsL* vs *N. elongata* : rpsL Δ boIA1.** Au sein de la souche *N. elongata* subsp. *glycolytica* ATCC 29315, on retrouve 2 218 CDS (CoDing Sequences). Entre les deux souches étudiées ici, l'analyse transcriptomique par DESeq2 a été réalisée sur 2 145 CDS. Certains gènes ne présentent donc aucune valeur d'expression. Dans cette comparaison, nous avons considéré un gène comme étant significativement dérégulé lorsque la valeur de son FC (Fold Change) est supérieure à 1,5 (pour une valeur logarithmique de base 2 de 0,585) et lorsque la p-value correspondante est inférieure à 0,05. Ce sont des limites faibles mais qui sont utilisées en cas de très faibles dérégulations. Par exemple ici la variation d'expression de BoIA1 n'est que de 1,536 en valeur logarithmique de base 2. Ainsi seulement 7 gènes significativement sous-exprimés et 1 gène significativement surexprimé ont été identifiés (Figure 5.10). Un tableau récapitulant ces différents gènes ainsi que leur FC et leur p-value associés figure ci-dessous (Tableau 5.2).

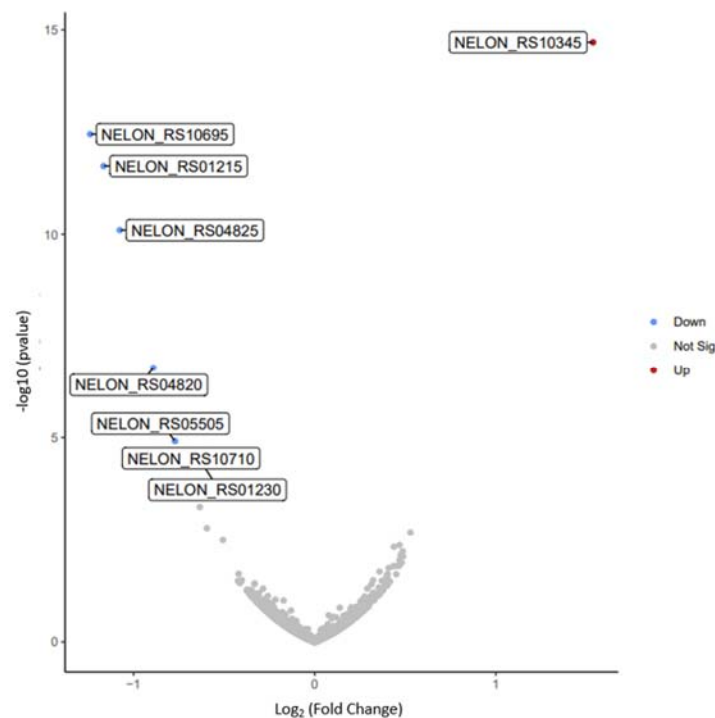


Figure 5.10 Gènes significativement dérégulés par *boIA1* chez *N. elongata*

La suppression du gène *boIA1* a révélé 7 gènes significativement sous exprimés et 1 gène significativement surexprimé (Figure du laboratoire Veyrier, non publiée).

Tableau 5.2 Gènes significativement dérégulés lorsque *bolA1* est supprimé chez *N. elongata* (Source Uniprot)

Locus_tag	Protéine	Nom complet	Log ₂ (Fold Change)	P-value
NELON_RS10345	BolA1	Régulateur transcriptionnel de type BolA	1,536	2,02e-15
NELON_RS10695	RsmG	16S rRNA méthyltransférase	-1,239	3,62e-13
NELON_RS01215	MetE	5-méthyltétrahydroptéoyltriglutamate-homocystéine S-méthyltransférase	-1,165	2,19e-12
NELON_RS04825	Pgm	Phosphoglucomutase	-1,075	7,90e-11
NELON_RS04820	MetF	Méthylènetétrahydrofolate réductase	-0,890	1,92e-07
NELON_RS05505	MFS transporter	Major Facilitator Superfamily	-0,770	1,22e-05
NELON_RS10710	Ptsi	Phosphoénolpyruvate phosphotransférase	-0,714	2,17e-05
NELON_RS01230	Fhs	Formate-tétrahydrofolate ligase	-0,621	4,23e-05

Premièrement, cette comparaison a montré que le régulateur BolA1 est plus faiblement exprimé dans la souche KO que dans la souche WT. Nous avons donc été capables de vérifier l'absence du gène *bolA1* dans la souche *N. elongata* : *rpsL ΔbolA1*. Cependant, cette variation est faible ($\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,536$) et elle correspond à la variation la plus élevée au sein de cette comparaison. Il est donc possible que la protéine s'exprime très peu dans des conditions normales. De plus, le fait d'avoir supprimé *bolA1* n'a pas entraîné beaucoup de changements sur les autres gènes dans les conditions spécifiques testées ici. Il est souvent référencé que les protéines de type BolA sont régulées en présence de stress or ici, les souches ont été cultivées en conditions optimales. Malgré les faibles dérégulations médiées par BolA1, nous avons tout de même choisi de discuter des résultats issus de la suppression de BolA1.

Certains des gènes dérégulés par la surexpression de *bolA1* peuvent être mis en relations. En effet, les gènes *fhs* ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,621$) et *metF* ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,890$) réprimés par le gène *bolA1* sont retrouvés dans la voie du OCP (One Carbon Pool) (Tableau 5.2). Cette voie médiée par le folate est impliquée dans la biosynthèse de purines et d'acides aminés ([Ducker & Rabinowitz, 2017](#)). Les deux gènes mentionnés sont retrouvés dans la synthèse d'un cofacteur, le 5-Méthyltétrahydrofolate (Figure 5.11).

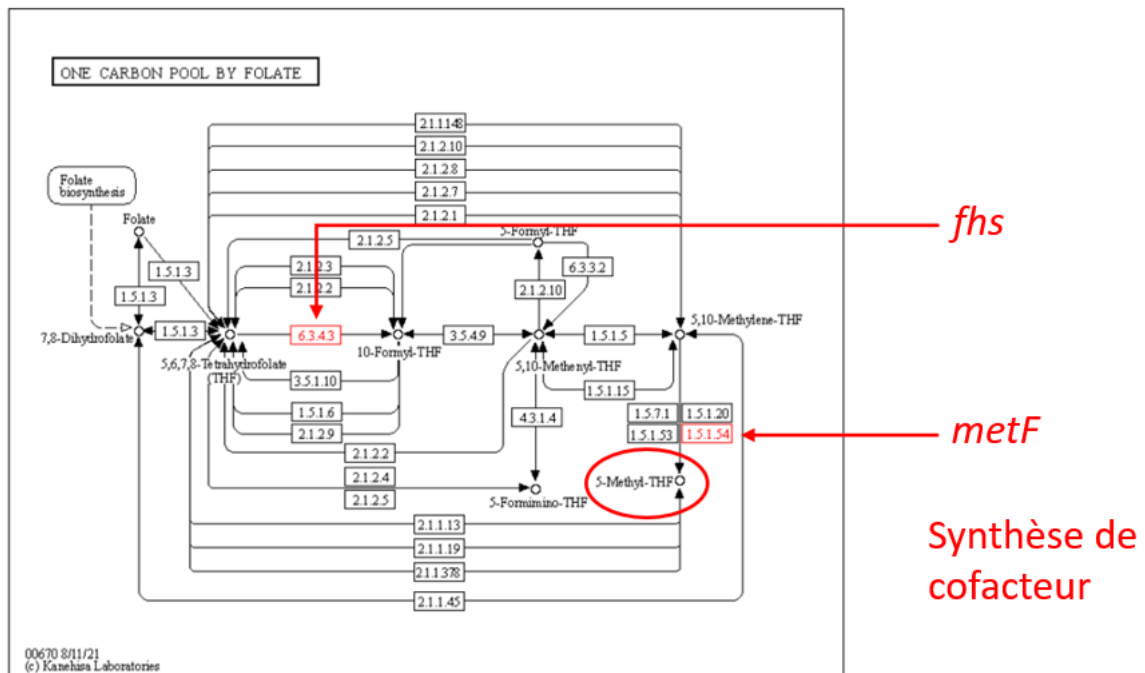


Figure 5.11 Les gènes *fhs* et *metF* sont réprimés par BolA1
 Ces deux gènes sont impliqués dans la synthèse du cofacteur 5-Methyl-THFO par la voie du One Carbon Pool ([Moriya et al., 2007](#)).

Ce cofacteur réprimé indirectement par BolA1, est lié à la répression d'un autre gène par BolA1, appelé *metE* ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -1,165$) (Figure 5.12) (Tableau 5.2). Ces trois gènes mentionnés sont réprimés par BolA1 et sont tous liés à la synthèse de la méthionine. Le gène *metE* est impliqué dans la synthèse de cet acide aminé protéinogène indépendant de cofacteurs, tandis que le cofacteur (dérivé de la vitamine B12) fabriqué par les gènes *fhs* et *metF* est impliqué dans la synthèse de méthionine dépendante de cette molécule (Figure 5.12).

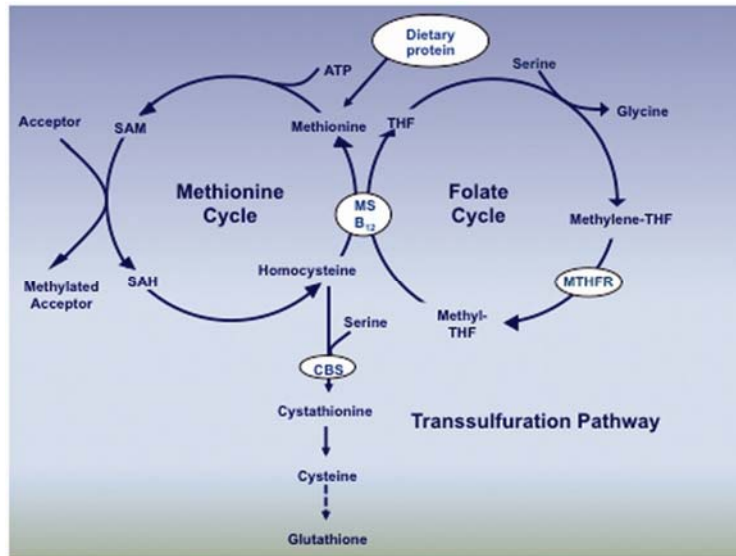


Figure 5.12 Lien entre le cofacteur synthétisé par la voie du OCP et le gène *metE* dans la synthèse de méthionine

Deux voies permettent la synthèse de méthionine dont l'une est dépendante d'un cofacteur ([McCaddon & Miller, 2015](#)).

Concernant les autres gènes dérégulés par BoliA1, on a constaté que le régulateur réprime un transporteur de la superfamille MFS ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,770$) impliqué dans le transport de nombreuses molécules telles que les sucres, les acides aminés et les toxines (Tableau 5.2). Ces transporteurs fonctionnent à l'aide de gradients de concentration chimiosmotiques ([Quistgaard et al., 2016](#)). Également, BoliA1 s'est avéré capable de réprimer la synthèse de pyruvate. Les gènes *ptsi* ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,714$) et *pgm* ($\text{Log}_2(\text{FC}) = -1,075$), codant respectivement pour une phosphoénolpyruvate phosphotransférase et une phosphoglucomutase, se sont retrouvés réprimés par BoliA1 (Tableau 5.2). La première protéine PtsP permet de transférer le groupement phosphate du phosphoénolpyruvate à un sucre importé (l'enzyme n'est pas spécifique d'un sucre en particulier), permettant la synthèse de pyruvate. La deuxième enzyme appelée Pgm permet de déplacer le groupement phosphate entre le carbone 1 et le carbone 6 d'une même molécule de glucose. C'est une enzyme que l'on retrouve dans de nombreuses voies métaboliques telles que la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et dans le métabolisme des acides aminés/purines ([Moriya et al., 2007](#)).

***N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1_{Nm}* vs *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*.** Ici nous comparons la souche dans laquelle le gène *bolA1* de *N. meningitidis* a été surexprimé à l'aide d'un promoteur fort et constitutif *porBp* par rapport à la souche Δ *bolA1*. La protéine codée par *bolA1_{Nm}* présente donc la substitution A93K. Comme expliqué dans la revue de la littérature, l'apparition de cette mutation aurait pu modifier le comportement de la protéine BolA1. Cette deuxième comparaison transcriptomique est le point de départ dans la compréhension de l'impact de cette mutation. Lors de cette comparaison, ce sont 2 148 CDS dont l'expression a été comparée par DESeq2. Ayant utilisé un promoteur fort, nous avons choisi de considérer les gènes comme significativement dérégulés lorsque leur log₂ (FC) est supérieur à 1 (pour un FC d'une valeur normale de 2) car c'est le standard universel afin de définir une différence d'expression biologiquement significative. Ainsi, 83 gènes ont montré une variation d'expression significative. Pour 51 d'entre eux, cette variation est négative et pour 32 d'entre eux, elle est positive. Les gènes présentés dans ces résultats sont récapitulés dans ce tableau ci-dessous (Tableau 5.3).

Ayant surexprimé le gène *bolA1* issu d'une autre espèce, il était impossible d'aligner les lectures issues du séquençage avec le génome de référence de *N. elongata*. Le gène *bolA1_{Nm}* a donc été ajouté manuellement au sein du génome de référence dans une région intergénique. L'ayant considéré comme un CDS (Coding Dna Sequence), le nombre de lectures obtenues par séquençage qui se sont alignées avec le gène *bolA1_{Nm}* a pu être déterminé ici grâce au logiciel Rockhopper 2.0.3 pour Windows 10 ([McClure et al., 2013](#); [Tjaden, 2015](#); [Tjaden, 2020](#)). Le logiciel a donc fourni pour chaque gène dans chacune des conditions, une valeur appelée RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million reads mapped) représentant le nombre de lectures alignées sur chaque gène tout en prenant en compte la profondeur du séquençage ainsi que la longueur des gènes ([Malé et al., 2014](#); [Wagner et al., 2012](#); [Zhao et al., 2020](#)). Ainsi, la valeur du RPKM pour le gène *bolA1_{Nm}* est de 960 dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1_{Nm}* et de 0 pour la souche sauvage. En comparaison, le gène *bolA1* a montré un RPKM de 1 dans la souche sauvage et de 0 dans les souches *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* et *N. elongata* : *rpsL**. Comme gène de référence, nous avons choisi le gène *gyrA* souvent utilisé comme contrôle interne dans les qPCR ([Liu et al., 2022](#); [Nuwong & Kittiwongwattana, 2022](#)). Ce dernier a montré un RPKM de 1 dans les trois souches utilisées dans cette étude. Nous avons donc été capables de confirmer la bonne surexpression de BolA1_{Nm}.

Tableau 5.3 Gènes significativement dérégulés par la surexpression du gène *bolA1_{Nm}* (source Uniprot)

Locus_tag	Protéine	Nom complet	Log ₂ (Fold Change)	P-value
NELON_RS01230	Fhs	Formate-tétrahydrofolate ligase	-1,44	2.64e-21
NELON_RS04820	MetF	Méthylènetétrahydrofolate réductase	-1,45	2.41e-11
NELON_RS01215	MetE	5-méthyltétrahydropteroyltriglutamate-homocystéine S-méthyltransférase	-2,29	7.42e-28
NELON_RS07950	CBS	Cystathionine bêta synthase	-1,72	1.07e-10
NELON_RS04825	Pgm	phosphoglucomutase	-3,08	1.02e-48
NELON_RS02145	RpiA	D-Ribose 5-phosphate isomerase	-1,36	1.29e-10
NELON_RS01120	ACTase	Aspartate carbamoyltransférase	-1,59	7.48e-12
NELON_RS01755	PilA	Régulateur transcriptionnel de la piline PilA	-1,39	3.30e-24
NELON_RS09675	NYN	RNAses Nedd4-BP1 YacP-like Nucléase	-2,29	1.29e-27
NELON_RS02270	GlmU	UDP-N-acétylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate	-1,57	7.25e-12
NELON_RS08155	MuA	Transposase Mu	-1,53	6.35e-06
NELON_RS09370	ACSs	Acyl-coenzyme A déshydrogénase	1,44	3.19e-11
NELON_RS04365	ColA	Domaine protéique d'immunité à la colicine	3,56	9.74e-28
NELON_RS04045	CysW	Perméase appartenant au complexe CysAWTP (transporteur ABC de sulfate)	1,16	1.23e-04
NELON_RS04025	TrmD	RNA ^t (guanosine(37)-N1)-méthyltransférase	1,00	2.24e-08
NELON_RS04665	TypA	GTPase TypA	1,01	2.84e-09
NELON_RS05165	PrfC	Facteur de libération de la chaîne peptidique 3	1,09	8.79e-08
NELON_RS03585	xseA	Exonucléase VII	1,23	3,77e-04

Premièrement, nous avons retrouvé des gènes dont l'expression est augmentée en présence de *BolA1_{Nm}*. Or lors de l'étude de la délétion de *bolA1*, nous n'en avons pas observé. Il est donc possible que ce régulateur possède une double fonction comme activateur et répresseur. Également, il est possible que le fait d'avoir surexprimé la protéine ait entraîné des effets secondaires. Nous avons tout d'abord été capables d'identifier une protéine contenant un domaine associé aux protéines d'immunité à la colicine. Il s'agit d'ailleurs de la protéine la plus impactée par la surexpression de *BolA1_{Nm}* (3,56). La colicine est une bactériocine produite et

secrétée par certaines souches d'*E. coli*. Afin de se protéger, la protéine Cai est exprimée afin d'empêcher l'entrée de la toxine en se fixant sur son récepteur au niveau de la membrane interne ([Anantharaman & Aravind, 2006](#); [Laudenbach & Grossman](#); [Nardi et al., 2001](#)). La surexpression de *BoIA1_{Nm}* a aussi montré une augmentation de l'expression d'une perméase d'ions sulfates/thiosulfates. Codée par le gène *cysW* (1,16), elle fait partie d'un complexe protéique CysAWTP de type ABC permettant le passage de ces ions soufrés à travers la membrane bactérienne ([Laudenbach & Grossman](#)). Côté métabolisme, nous avons également remarqué que la première réaction de la β -oxydation des acides gras est perturbée par la surexpression du régulateur. En effet l'enzyme codant pour l'Acyl-Coenzyme A déshydrogénase (1,44) qui est retrouvée dans le métabolisme des acides gras et ainsi dans la formation d'énergie s'est révélée surexprimée par la protéine *BoIA1_{Nm}* ([Thorpe & Kim, 1995](#)). Également, nous avons identifié un gène activé par la surexpression de *BoIA1_{Nm}* qui est le gène *xseA* (1,23). Ce gène code pour la grande sous-unité de l'exonucléase VII. Cette enzyme coupe l'ADNsb (Acide DésoxyriboNucléique simple brin) dans le but de le dégrader en fragments solubles. Cette enzyme est retrouvée dans le processus de la réparation de mésappariements (Figure 5.13) ([Moriya et al., 2007](#)).

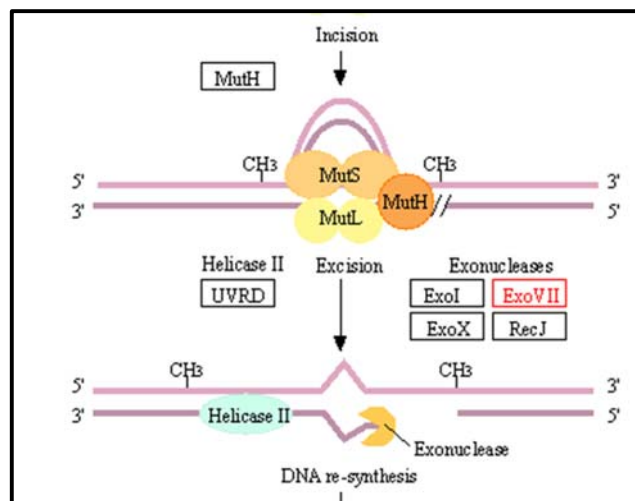


Figure 5.13 Implication de l'exonucléase VII dans la réparation de mismatches

La grande sous unité de cette enzyme s'est révélée activée par la surexpression de *BoIA1_{Nm}*. C'est d'ailleurs la seule enzyme qui peut être associée ici aux mécanismes de réparation d'ADN ([Moriya et al., 2007](#)).

Beaucoup de protéines réprimées par $BolA1_{Nm}$ correspondent à des protéines ribosomales (Figure 5.14). Les protéines ribosomales forment avec de l'ARNr (Acide RiboNucléique ribosomal) des complexes ribonucléoprotéiques appelés ribosomes. Ces ribosomes décodent l'information contenue dans l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) afin de synthétiser les protéines. Les ribosomes sont des protéines conservées dans le vivant et sont constitués de deux sous-unités, une plus petite qui « lit » l'ARN messenger et une plus grosse qui se charge de la polymérisation des acides aminés pour former la protéine correspondante (Fox, 2010). Ces ribosomes peuvent d'ailleurs constituer la cible de certains antibiotiques (Nyongesa et al., 2022a). De manière générale, les gènes codant pour les protéines ribosomales figurent parmi les gènes les plus fortement exprimés. De nombreuses ressources cellulaires sont consacrées à leur production et ce processus est hautement régulé de manière à équilibrer leur production et leur élimination. Cet équilibre est ordonné en réponse aux changements des conditions de croissance et du statut cellulaire (Madru et al., 2017).

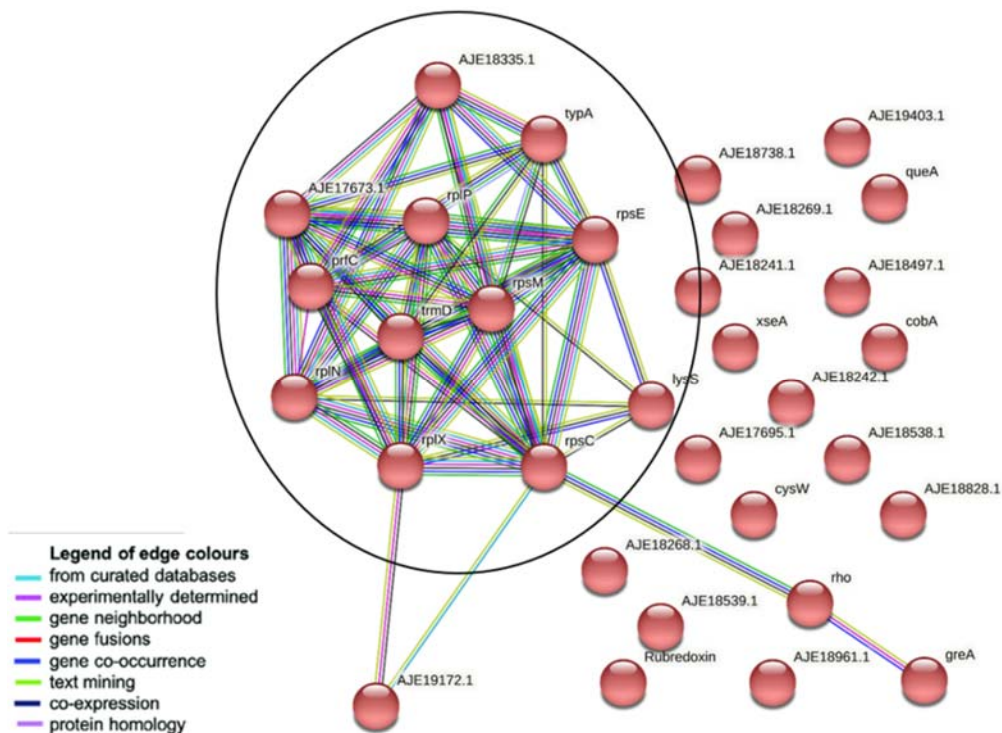


Figure 5.14 De nombreux gènes codant pour des protéines ribosomales sont impactés par la surexpression de $BolA1_{Nm}$

Cette figure représente les gènes significativement activés par $BolA1_{Nm}$. La partie entourée en noir correspond aux gènes codant pour des protéines ribosomales (STRING Consortium 2022, www.string-db.org).

Ainsi parmi les gènes codant pour des protéines ribosomales réprimées par *BolA1_{Nm}*, nous avons retrouvé deux gènes associés à la survie cellulaire. Le premier code pour la protéine membranaire *trmD* (1,00). Il a été montré chez *E. coli* que la suppression de ce gène entraîne des défauts de croissance en cas de stress à la chaleur. Également, sa suppression entraîne un affaiblissement de l'enveloppe pouvant mener à une plus grande sensibilité aux antibiotiques ([Hou et al., 2017](#)). Le deuxième est le gène *typA* qui est également activé par le régulateur (1,01). Ce gène a déjà montré son importance dans la survie face aux faibles températures et au stress acide chez *S. meliloti*, une bactérie symbiotique de certaines plantes. La présence de ce gène a été jugée importante dans le maintien de ses relations symbiotiques, car sa suppression entraîne une diminution de l'efficacité de ces dernières ([Kiss et al., 2004](#)). Enfin, une protéine liée à la traduction appelée Peptide chain Release factor (1,09) s'est révélée activée par *BolA1_{Nm}*. Cette protéine participe à la terminaison de la synthèse protéique dépendant des codons stop ([Craigen Wj Fau - Caskey & Caskey, 1986](#)).

De manière identique à l'étude du gène *bolA1*, *bolA1_{Nm}* a montré un même rôle dans la répression de la synthèse de la méthionine. En effet une diminution de l'expression des gènes *fhs* (-1,44) et *metF* (-1,45) et *metE* (-2,29) liés à la synthèse de la méthionine a été observée (Figure 5.11) (Figure 5.12). (Les valeurs entre parenthèses correspondent à la variation d'expression en valeur logarithmique de base 2 entre les deux souches). Mais la surexpression de la protéine nous a permis d'aller encore plus loin dans la répression du métabolisme de la méthionine. Il a été intéressant de noter que l'expression d'un autre gène est réprimée par *BolA1_{Nm}*. Il s'agit d'une aminotransférase de classe V retrouvée dans la synthèse de cystathionine étroitement liée à la méthionine (-1,72) (Figure 5.15). Également en comparant les deux souches, nous avons observé que *BolA1_{Nm}* réprime un gène retrouvé dans la voie des riboses phosphates. Il s'agit encore une fois du gène *pgm* codant pour une phosphoglucomutase (-3,08). Ce gène a déjà été retrouvé dans la première comparaison mais nous n'avions pas été capables de le mettre en lien avec un métabolisme précis. Ici nous pouvons l'associer avec la diminution, médiée par le régulateur, de l'expression d'un autre gène appelé *rpiA* pour D-Ribose 5-phosphate isomérase (-1,36). Ces deux enzymes sont retrouvées dans la voie des pentoses phosphates et peuvent donc être liées à la synthèse de purines, de pyrimidines et d'histidine. De plus, une autre enzyme liée à la synthèse de pyrimidines s'est révélée réprimée par *BolA1_{Nm}*. Il s'agit de l'aspartate carbamoyltransférase (-1,59) qui intervient dans la première étape de la synthèse des pyrimidines.

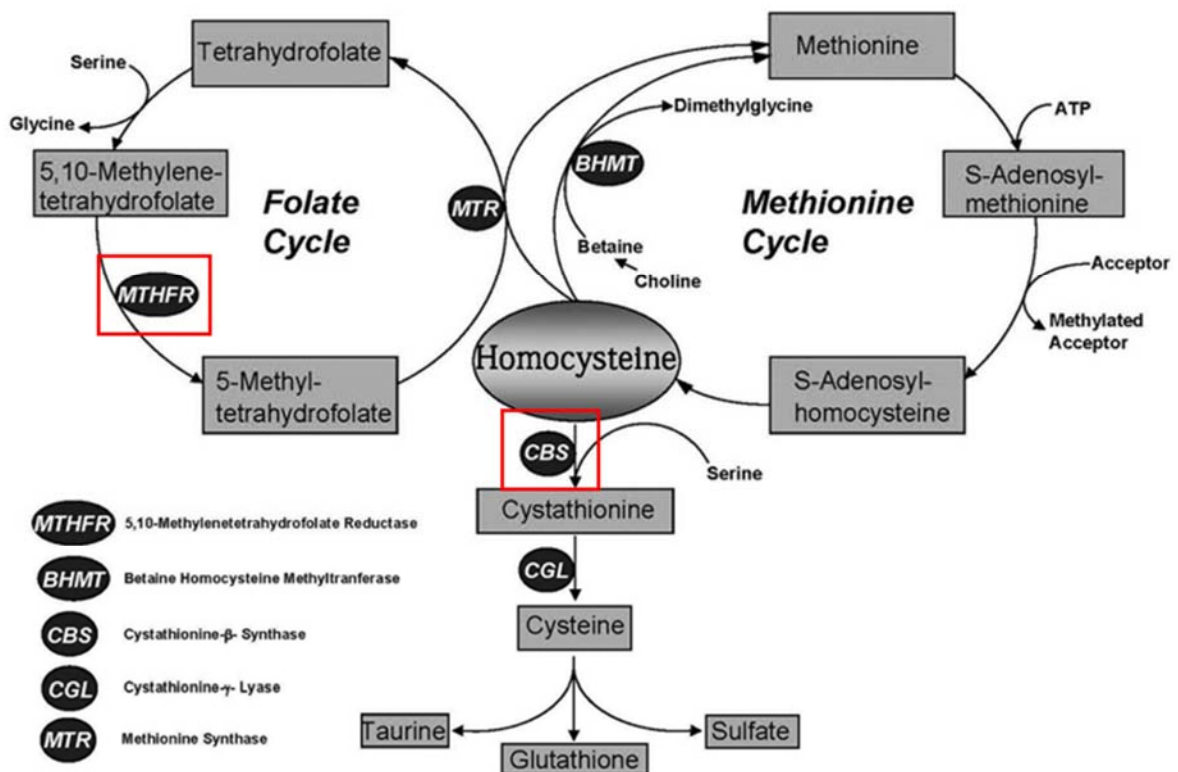


Figure 5.15 Cycle de la méthionine et du folate, liés à la synthèse de cystéine

La surexpression de *bolA1_{Nm}* a montré ici une répression de la synthèse de méthionine mais également de cystathionine. Les enzymes perturbées par *BolA1_{Nm}* sont encadrées en rouge (Maclean et al., 2012).

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence deux gènes liés à l'enveloppe qui sont réprimés par *BolA1_{Nm}*. Le premier est lié à la synthèse de peptidoglycane et il s'agit du gène *glmU* (-1,57). Ce gène code pour l'enzyme N-acétylglucosamine-1-phosphate uridylyltransférase qui catalyse les deux dernières réactions de la synthèse de N-Acétyle-D-glucosamine. Ce sucre une fois associé avec un résidu d'acide N-acétyl-Muramique permettra de former le peptidoglycane (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1993). Le deuxième code pour la protéine *PilA* (-1,39) qui participe à la formation du pilus de type IV qui est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, le mouvement et l'échange d'ADN extracellulaire (Figure 5.16) (Craig et al., 2019).

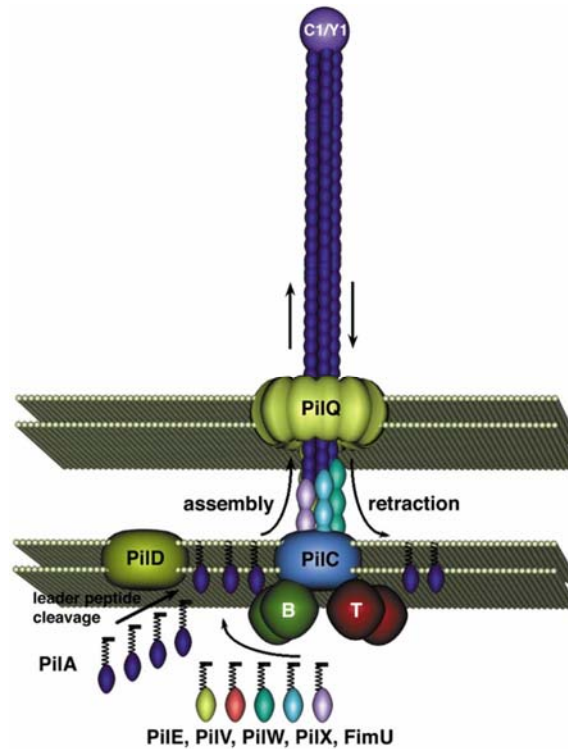


Figure 5.16 PilA fait partie d'un ensemble de nombreuses protéines essentielles à la formation du pilus de type IV
 Sur toutes les protéines liées à la synthèse de piline, seulement PilA s'est montré réprimée par *BolA1_{Nm}* ([Mattick, 2002](#))

Par ailleurs, un grand nombre de protéines réprimées par *BolA1_{Nm}* correspondent à des protéines contenant divers domaines associés à des protéines virales telles que des transposases ou de l'ADN méthylase (par exemple, le domaine C-terminal de la transposase Mu montre un $\text{Log}_2(\text{FC}) = -1,53$). Enfin, nous avons identifié une protéine réprimée par *BolA1_{Nm}* contenant un domaine de RNAses (RiboNucléAses) appelé NYN (Nedd4-BP1 YacP-like Nuclease) (-2,29). Ce domaine est retrouvé chez les eucaryotes ainsi que chez les procaryotes et est impliqué dans la dégradation d'ARNt (Acide RiboNucléique de transfert) et d'ARNr (Acide RiboNucléique ribosomal) ([Anantharaman & Aravind, 2006](#)).

5.2.2 Le rôle de la protéine *BolA2* dans le transcriptome de *N. elongata*

Pour cette étude, j'ai comparé la souche *N. elongata* : *rpsL** avec *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA2*, puis *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA2* : *bolA2* avec *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA2*. Ici un gène a été considéré comme significativement dérégulé lorsqu'il présentait une variation d'expression

d'une valeur logarithmique de base 2 supérieure à 1 (valeur normale > 2). C'est donc le standard universel qui a été utilisé ici. Pour la comparaison de la souche *N. elongata* : *rpsL** avec *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2*, l'outil DESeq2 a permis de comparer l'expression de 2 121 CDS. Finalement, 15 gènes ont été significativement augmentés et 24 gènes ont été diminués de manière significative. Pour la deuxième comparaison, sur un total de 2 131 CDS étudiées, 11 gènes se sont montrés significativement augmentés et 11 gènes significativement diminués. Etant donné que le gène *bolA2* de *N. elongata* a été réintroduit dans la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* afin de former la souche complémentée, il a été possible pour nous de réunir les deux comparaisons. Ainsi, les deux comparaisons ont montré 17 gènes en commun qui sont significativement dérégulés. 9 d'entre eux sont activés et 8 sont réprimés par la protéine BolA2 (Figure 5.17) (Tableau 5.4).

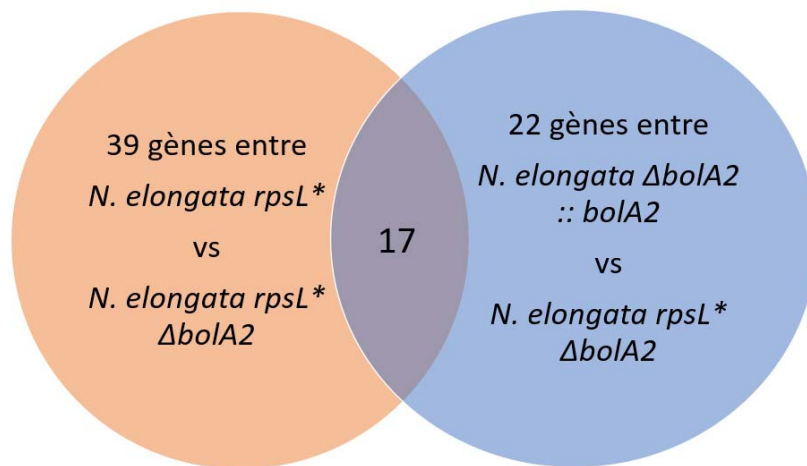


Figure 5.17 Gènes significativement dérégulés par BolA2 chez *N. elongata*

Sur 39 gènes significativement dérégulés dans la première comparaison et 22 dans la deuxième, 17 gènes sont en commun entre les deux comparaisons. De plus, ces gènes sont régulés de la même façon par BolA2 (Figure personnelle).

Tableau 5.4 Gènes significativement dérégulés par BolA2 chez *N. elongata* (Source Uniprot)

Protéine	Nom complet	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i>		<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> : <i>bolA2</i> vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i>	
		Log ₂ (Fold Change)	P-value	Log ₂ (Fold Change)	P-value
BolA2	Régulateur transcriptionnel de type BolA	1,65	0.00025	1,51	1,00e-04
PilA	Régulateur transcriptionnel de la piline	-1,00	0.022	-1,03	1,9e-04
MuA	Transposase Mu	1,89	1.88e-06	1,70	3,93e-06
AAA ATPase	ATPases Associées à diverses Activités cellulaires	-3,21	8.19e-43	-1,10	2,19e-05
TROVE	Domaine Télomerase, Ro and Vault	-3,96	4.64e-76	-1,10	2,88e-05
TBDR	Transporteur de la paroi externe dépendant de TonB	-1,12	1.54e-05	-1,20	2,81e-06
PutA	Proline déshydrogénase / delta 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase	-2,32	6.27e-28	-2,38	4,28e-27
PutP	Proline/Na ⁺ symporter	-3,75	2.91e-41	-3,18	6,09e-37
NorB	Oxyde nitrique réductase B	1,14	0.00133	1,18	3,1e-4

Tout d'abord, nous avons été capables de nous assurer de la bonne suppression du gène *bolA2*. A partir de la première comparaison, la variation d'expression de *bolA2* est de 1,65. Avec la deuxième comparaison, sa variation d'expression est de 1,51 (Tableau 5.4). Cependant il est important de noter que cette dérégulation est faible, suggérant que de la même façon que BolA1, la protéine BolA2 s'exprime faiblement de base.

Certaines protéines régulées par BolA1_{Nm} ont été retrouvées dans l'étude de BolA2. En effet, la protéine PilA associée à la formation du pilus de type IV est de la même façon réprimée par BolA2. Également, certaines protéines virales se sont montrées activées par le régulateur BolA1_{Nm}, et c'est le cas également ici par BolA2. L'une de ces protéines correspond à la transposase Mu et cette dernière est significativement surexprimée par BolA2. De plus, deux autres protéines virales surexprimées par BolA2 ont été identifiées. La première correspond aux fibres caudales de bactériophages et la deuxième protéine code pour un domaine de circularisation de l'ADN viral.

Parmi les gènes réprimés par BolA2, plusieurs encodent des protéines avec domaines protéiques associés à la dégradation d'ARN et de protéines. En effet, les domaines AAA ATPases et TROVE (retrouvés dans les Ribonucléoprotéines) sont des domaines conservés dans le vivant et participent indirectement à la régulation de l'expression de gènes ainsi qu'à la dégradation de protéines ([Bateman & Kickhoefer, 2003](#); [Hanson & Whiteheart, 2005](#)). Côté transport de molécules, la protéine BolA2 a montré un rôle dans la répression du transport de sidérophores. En effet, BolA2 diminue l'expression d'un type de récepteur TonB-dépendant retrouvé au niveau de la paroi membranaire des bactéries Gram négatives. Associés avec TonB, ces transporteurs sont responsables de l'importation de sidérophores (chélateurs de fer de faible poids moléculaire), de nickel et de vitamines ([Carter et al., 2006](#)). Également, deux gènes liés au métabolisme de la proline se sont montrés réprimés par BolA2. Le premier est PutP qui est un transporteur (symport) de la proline extracellulaire et du sodium. Ce récepteur capte la proline avec une grande affinité. Le second gène correspond à PutA. C'est une enzyme bifonctionnelle retrouvée dans l'oxydation de la proline en glutamate afin de l'utiliser comme source d'énergie (carbone ou azote) (Figure 5.18). PutA est un répresseur de l'opéron *put* et donc de *putP*. C'est aussi une protéine essentielle à la colonisation des bactéries dans des milieux acides comme *Helicobacter pylori* ([Ling et al., 1994](#)) ([Rivera-Ordaz et al., 2013](#)). Il a également été montré que la proline joue de nombreux rôles dans l'adaptation face aux stress osmotique et dans la protection contre les ROS (Espèces Oxygénées Radicalaires) ([Hare & Cress, 1997](#)) ([Moses et al., 2012](#)).

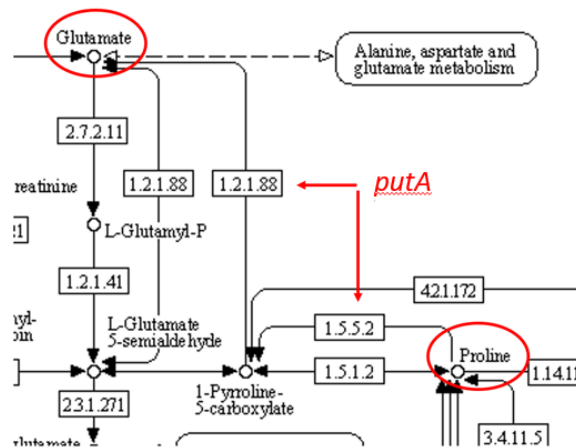


Figure 5.18 Rôle de la protéine PutA dans l'oxydation de la proline en glutamate

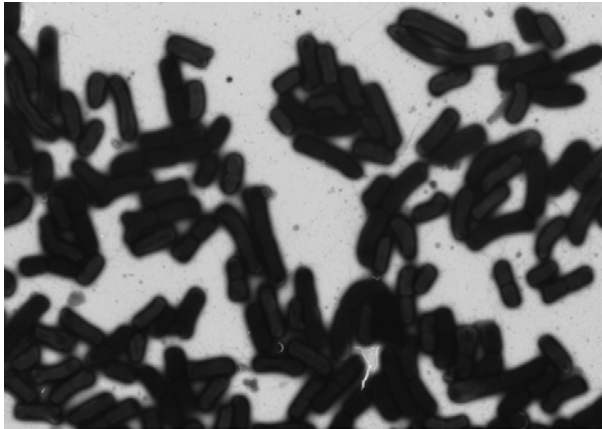
PutA est une enzyme bifonctionnelle agissant au niveau de deux réactions consécutives dans la dégradation de la proline en glutamate ([Moriya et al., 2007](#)).

Enfin, BolA2 a montré chez *N. elongata* une activation du gène *norB* qui est retrouvé dans le processus de dénitrification. NorB correspond à la sous-unité de l'oxyde nitrique réductase qui est un accepteur d'électron dans la respiration anaérobie. Cependant, le genre *Neisseria* est aérobie strict mais cette réaction a déjà été identifiée chez le méningocoque dans la neutralisation du monoxyde d'azote toxique pour la bactérie ([Heurlier et al., 2008](#)).

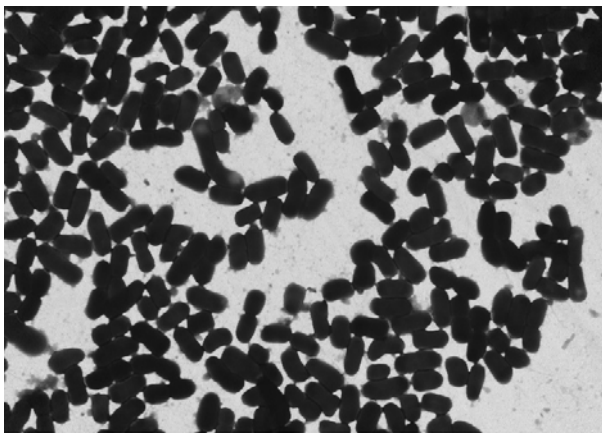
5.3 Analyses phénotypiques

5.3.1 Le rôle de la protéine BolA1 dans la morphologie de *N. elongata*

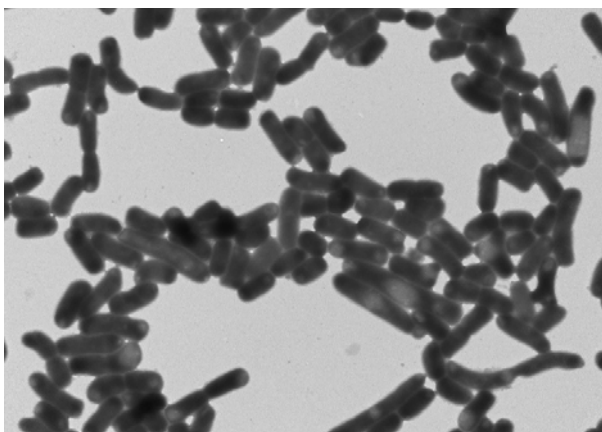
Dans l'étude du rôle de la protéine BolA1 dans la morphologie chez le bacille *N. elongata*, nous avons utilisé la MET afin de visualiser les souches *N. elongata* : *rpsL**, *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA1* et *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA1* : *porBp-bolA1_{Nm}*. Finalement, nous avons pu observer des différences dans la longueur des cellules entre les trois souches (Figure 5.19). En se basant sur les données de la figure 5.17, la souche mère semble présenter des cellules plus longues que la souche *ΔbolA1*. De plus, cette dernière semble montrer des cellules plus courtes que la souche dans laquelle le gène *bolA1_{Nm}* est surexprimé (Figure 5.17).



N. elongata : *rpsL**



N. elongata : *rpsL**
 Δ *bolA1*



N. elongata : *rpsL**
 Δ *bolA1* : *bolA1*_{Nm}

Figure 5.19 Etude de la protéine BolA1 chez *N. elongata*

La suppression du gène *bolA1* semble entraîner une diminution de la longueur des cellules, tandis que les cellules de la souche surexprimant *bolA1*_{Nm} paraissent plus longues. La barre d'échelle indique 2 μ m pour les trois images (3 000 \times).

Concernant les différences que nous avons aperçues entre les trois souches, nous avons voulu aller plus loin dans cette observation. Premièrement, nous avons mesuré la distance entre les deux pôles cellulaires pour les trois souches et ce, afin de déterminer si BolA1 est réellement impliquée dans la morphologie. Pour chacune des trois souches étudiées en triplicata, trois photos ont été prises et une cinquantaine de mesures a été réalisée par photo. Ainsi, 474 mesures ont été prises pour la souche *N. elongata : rpsL**. 432 pour *N. elongata : rpsL* ΔbolA1* et 492 pour *N. elongata : rpsL* ΔbolA1 : porBp-bolA1_{Nm}*. Ces différentes mesures ont été référencées au sein de la représentation graphique ci-dessous (Figure 5.20).

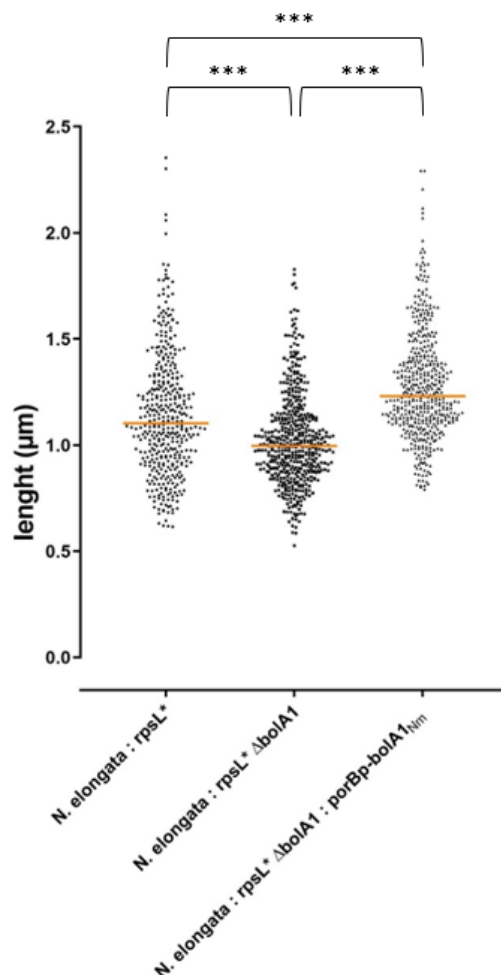


Figure 5.20 Répartition de la longueur des cellules dans les différentes souches de *N. elongata*
 La longueur moyenne du premier groupe est de 1,149 µm, 1,025 pour le deuxième et 1,280 pour le troisième. Des tests de Mann-Whitney bilatéraux et non appariés ont permis de comparer la distribution de la longueur des cellules entre les différents échantillons. Ici, chacune des comparaisons a montré une distribution significativement différente (p-value < 0,0001) et a été notée (***)

La distribution de la longueur des cellules entre plusieurs échantillons ne suit pas une loi normale, elle est donc dyssimétrique. Il a alors été possible pour nous d'utiliser le test U de Mann-Whitney (bilatéral) afin de vérifier si la distribution de la longueur des cellules est identique entre deux échantillons. Plus U s'éloigne de l'espérance, et plus le risque que les deux échantillons soient différents augmente. Dans le cadre de l'étude de *BolA1*, ce test a été réalisé entre la souche *N. elongata* : *rpsL** et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1*, puis entre *N. elongata* : *rpsL** et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm}, et enfin entre *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA1* : *porBp-bolA1*_{Nm}.

En se basant sur nos observations (Figure 5.16), pour chacune des comparaisons, nous supposons que la distribution de la longueur des cellules est différente. C'est donc l'hypothèse alternative H_a . Les résultats des tests de Mann-Whitney sont retrouvés dans le tableau 5.5.

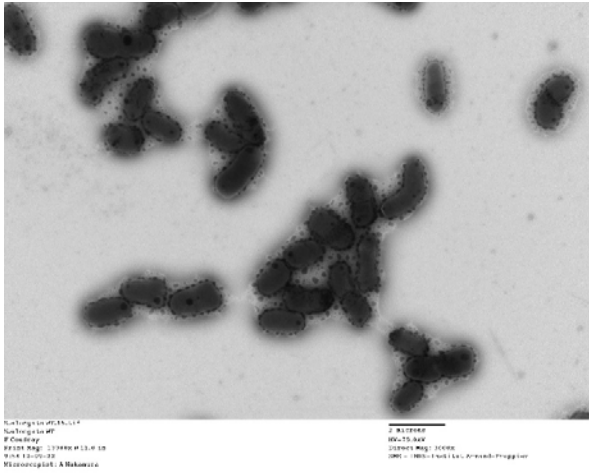
Tableau 5.5 Comparaisons de la longueur des cellules dans le cadre de l'étude de *BolA1* (test de Mann-Whitney)

	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i>	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> : <i>porBp-bolA1</i> _{Nm}	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA1</i> : <i>porBp-bolA1</i> _{Nm}
U	76035,500	127391	48071,500
Espérance	101637	97911	116121,500
Variance (U)	15347096,559	14490753,995	18676113,602
p-value (bilatérale)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
α	0,05		

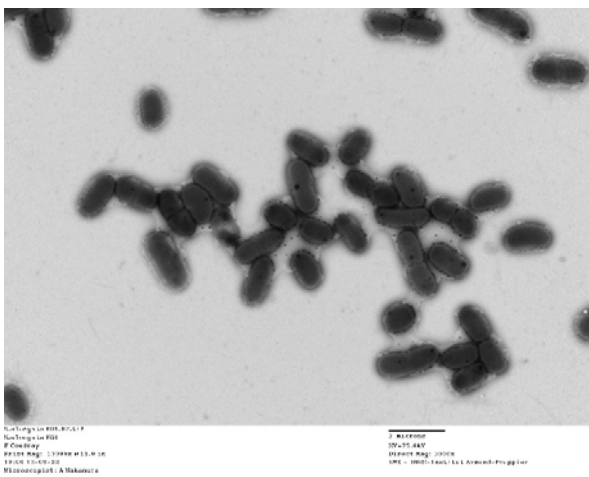
Dans chacune des comparaisons, la p-value est inférieure au risque alpha de 5 %. L'hypothèse nulle doit être rejetée, et l'hypothèse alternative H_a doit être retenue. La distribution de la longueur des cellules entre les différents échantillons est considérée comme différentes. Dans les conditions spécifiques testées ici, et d'après les observations précédentes (Figure 5.19 et 5.20), la suppression du gène *bolA1* a entraîné une diminution significative de la longueur des cellules par rapport à la souche sauvage. De plus, la surexpression du gène *bolA1_{Nm}* a montré une augmentation significative de la longueur des cellules, par rapport à la souche ayant perdu le gène *bolA1* mais également par rapport à la souche sauvage (Tableau 5.5).

5.3.2 Le rôle de la protéine BolA2 dans la morphologie de *N. elongata*

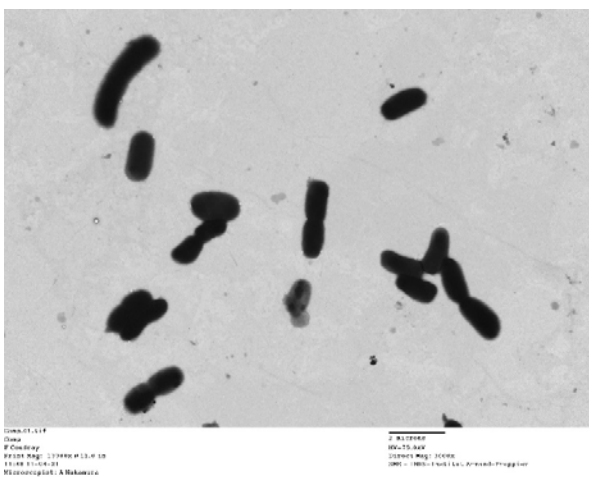
Dans l'étude du rôle de la protéine BolA2 dans la morphologie de *N. elongata*, la morphologie des souches *N. elongata* : *rpsL**, *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA2* et de *N. elongata* : *rpsL* ΔbolA2 :: bolA2* a été observée au MET (Figure 5.21). Contrairement à ce que nous avons observé pour BolA1, ici nous n'avons pas aperçu de différences morphologique entre les différentes souches (Figure 5.18).



*N. elongata rpsL**



*N. elongata rpsL**
ΔbolA2



*N. elongata rpsL**
ΔbolA2 :: bolA2

Figure 5.21 Étude de la protéine BolA2 chez *N. elongata*

La suppression du gène *bolA2* ne semble pas entraîner de modification de la morphologie. La barre d'échelle indique 2 µm pour les trois images (3 000×).

Afin de valider ou non nos observations, nous avons procédé de la manière que pour l'étude de BolA1. Ainsi, à partir des différentes souches cultivées en triplicate, 398 mesures ont été réalisées pour la souche *N. elongata rpsL**. Puis 341 mesures pour la souche *N. elongata rpsL* ΔbolA2* et 319 pour la souche *N. elongata rpsL* ΔbolA2 :: bolA2*. Ces différentes mesures ont été référencées au sein de la représentation graphique ci-dessous (Figure 5.22).

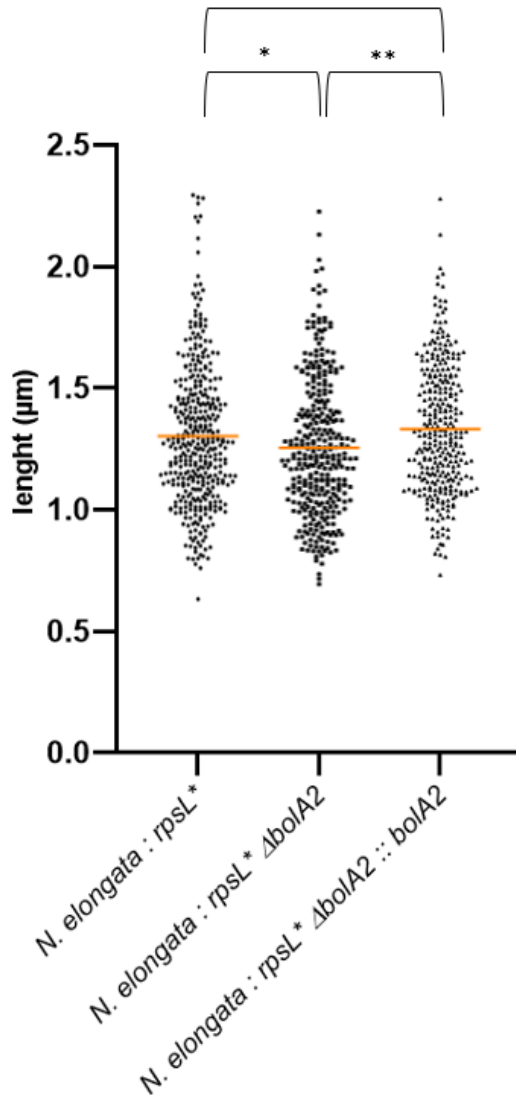


Figure 5.22 Répartition de la longueur des cellules dans les différentes souches de *N. elongata*

La longueur moyenne du premier groupe est de 1,302 μM, 1,255 μM pour le deuxième et 1,280 μM pour le troisième. La comparaison de la distribution de la longueur des cellules entre les différents échantillons a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney bilatéral et non apparié. Les comparaisons indiquant une différence significative dans la distribution ont été annotées telles que : (*) entre *N. elongata : rpsL** et *N. elongata : rpsL* ΔbolA2* (p-value = 0,027) ; (**) entre *N. elongata : rpsL* ΔbolA2* et *N. elongata : rpsL* ΔbolA2 :: bolA2* (p. value < 0001).

Dans le cadre de l'étude de *BolA2*, les différents tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la souche *N. elongata* : *rpsL* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2*, puis entre la souche *N. elongata* : *rpsL* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* :: *bolA2*, et enfin entre la souche *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* et *N. elongata* : *rpsL** Δ *bolA2* :: *bolA2*. Contrairement à précédemment, nous supposons ici que la distribution de la longueur des cellules entre les différentes souches sera identique. C'est donc l'hypothèse nulle H_0 . Les résultats des tests de Mann-Whitney sont retrouvés dans le tableau 5.6.

Tableau 5.6 Comparaisons de la longueur des cellules dans le cadre de l'étude de *BolA2* (test de Mann-Whitney)

	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i>	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> :: <i>bolA2</i>	<i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> vs <i>N. elongata</i> : <i>rpsL</i> * Δ <i>bolA2</i> :: 2
U	61444	68467,500	45126
Espérance	67859	63481	54389,500
Variance (U)	8369228,763	7596509,586	5991867,399
p-value (bilatérale)	0,027	0,070	<0,001
α	0,05		

Si l'on s'intéresse à la première comparaison, la p-value est inférieure au risque alpha de 5 %. Cela signifie que l'on doit rejeter l'hypothèse nulle et retenir l'hypothèse alternative. Donc contrairement à ce que les observations ont laissés supposer, la distribution de la longueur des cellules entre la souche mère et la souche ayant perdu le gène *bolA2* est différente. A présent, si l'on compare cette dernière souche avec la souche complémentée, la situation est différente. La p-value est supérieure au risque alpha de 5 %. L'hypothèse nulle est donc acceptée, et la

distribution de la longueur des cellules entre ces deux souches est considérée comme identique. La dernière comparaison ressemble à la première. La p-value est inférieure au risque alpha, ainsi l'hypothèse nulle doit être rejetée. L'hypothèse alternative est retenue, indiquant que la distribution des longueurs entre les deux souches est différente (Tableau 5.6).

Contrairement à ce que les observations laissaient penser, *BolA2* semble finalement jouer un rôle dans la morphologie (Figure 5.21). La suppression du gène *bolA2* a entraîné une modification significative de la morphologie par rapport à la souche sauvage. Le même résultat a été obtenu en comparant la souche ayant perdu le gène *bolA2* avec la souche complémentée. D'après la représentation graphique de la figure 5.22, la suppression du gène *bolA2* semble diminuer la longueur des cellules, un phénotype moins prononcé que la suppression de *bolA1*, mais qui est toutefois présent ici. En comparant la souche sauvage et la souche complémentée, les statistiques indiquent qu'aucune différence dans la morphologie ne s'est révélée significative. Ce résultat permet de supposer que la complémentation a été réalisée avec succès. Finalement, *BolA2* joue un rôle dans la morphologie chez *N. elongata* et sa suppression entraîne une diminution significative de la longueur des cellules.

6 DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1 Le rôle transcriptomique des protéines de type BolA chez les *Neisseria*

Au cours de ce projet, nous avons caractérisé le rôle des protéines BolA1, BolA1_{Nm} et BolA2 dans le transcriptome de *N. elongata*. Ces protéines ont montré différentes implications dans la régulation du métabolisme cellulaire, du transport de nutriments et de certains mécanismes de survie cellulaire. La protéine BolA1 a montré sa capacité à réprimer des gènes retrouvés dans la synthèse de méthionine et de pyruvate ainsi que dans la gestion de la perméabilité membranaire. Cependant ce ne sont que quelques gènes parmi des systèmes complexes qui sont touchés par le régulateur (Tableau 5.2).

Globalement, l'étude transcriptomique de BolA1 a montré que l'expression basale de ce régulateur est faible. De plus, l'impact de sa suppression sur le transcriptome de *N. elongata* n'est pas assez fort pour compléter les voies métaboliques dans lesquelles cette protéine est impliquée (Tableau 5.2). Il est nécessaire de réfléchir à une stratégie permettant de surexprimer le régulateur de *Neisseria elongata* afin de déterminer les autres gènes régulés par BolA1. Malgré nos nombreuses tentatives de surexprimer la protéine BolA1, nous pensons que la surexpression du régulateur entraîne une certaine toxicité pour la cellule, tel qu'il a été supposé pour la protéine BolA chez *E. coli* ([Dressaire et al., 2015](#)). L'utilisation d'un promoteur *lac* avec de l'IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactoyranoside) semble être la stratégie la plus simple afin de trouver la dose d'IPTG permettant de surexprimer la protéine sans tuer la bactérie. Également, nous pourrions cultiver la souche avec et sans IPTG afin de simplement vérifier si la surexpression de BolA est toxique pour la bactérie.

De façon surprenante, nous avons été capables de surexprimer la protéine BolA1_{Nm}. Celle-ci a montré une capacité importante à réprimer la synthèse de méthionine, de cystéine et notamment de purines et de pyrimidines (Tableau 5.3). Ces résultats peuvent peut-être constituer un indice sur le potentiel rôle de BolA issu de *N. elongata*. Cependant, nous pouvons mettre en opposition le rôle de BolA1_{Nm} avec ce que l'on sait de la littérature. Chez *E. coli*, la surexpression de la protéine BolA a montré une augmentation de la synthèse d'ADN liée à la formation de biofilms ([Vieira et al., 2004](#)). Si de la même manière que BolA1_{Nm}, BolA1 réprime également la synthèse d'ADN, alors nous pourrions nous assurer que les protéines de type BolA n'ont pas forcément les mêmes rôles.

Cette supposition serait appuyée par la distance d'un point de vue phylogénétique, séparant la protéine BolA d'*E. coli* avec les protéines BolA1 retrouvées chez les *Neisseria* (Voir Annexe). Un autre point favorisant cette idée serait que BolA1 présente une identité inférieure à 40 % avec les protéines de type BolA de l'entérocoque d'où la divergence des fonctions protéiques (Tableau 5.1).

Malgré la substitution d'acide aminé A93K proche d'un potentiel site de phosphorylation et du motif Hélice-Coude-Hélice (Figure 5.8), le régulateur BolA1_{Nm} est toujours fonctionnel et est capable d'activer et de réprimer certains gènes. De plus, la comparaison de la structure topologique entre la protéine BolA1 de *N. elongata* et la protéine BolA1 de *N. meningitidis* a indiqué un TM-Score de 0,81, ce qui est plus élevé que ce qu'on a obtenu avec les autres comparaisons ([Zhang et al., 2022](#)). Ce score considéré ici comme « élevé » associée aux riches résultats transcriptomiques à l'issue de l'étude de BolA1_{N.m} laissent à penser pour le moment que la mutation A93K se situant proche d'un site de phosphorylation ainsi que du motif HCH n'a pas impacté la structure ainsi que la fonction de BolA1_{Nm}.

Il est important de noter que nos études sont en parties basées sur des prédictions (structures, comparaisons de topologies). Bien qu'elles soient considérées comme fidèles, nous ne pouvons pas faire de conclusions hâtives. En plus d'avoir comme optique de vérifier si la surexpression de BolA1 de *N. elongata* entraînerait les mêmes résultats transcriptomiques que BolA1_{Nm}, il serait préférable d'obtenir une réelle structure en trois dimensions des protéines BolA1 et BolA1_{N.m} afin de les comparer à nouveau *in silico*.

Pour cela, nous pourrions extraire (tout en respectant les règles de sécurité du laboratoire de niveau 2) les protéines BolA1 et BolA1_{Nm} surexprimées afin de les purifier. Nous pourrions ensuite cristalliser nos protéines et par la suite générer une carte de densité électronique de ces cristaux grâce à des données de diffraction obtenues lorsqu'un cristal de protéine est placé dans un faisceau de rayons-X. Pour la cristallisation, il est nécessaire de trouver les conditions propices à la cristallisation (température, pH..). Brièvement, la protéine en solution, dénaturée et en condition de sursaturation sera mis en contact avec un agent cristallisant. Dans des conditions favorables, les composés volatiles vont s'évaporer, conduisant à la concentration de l'agent cristallisant et de la protéine. La solubilité de cette dernière va diminuer, l'amenant à la cristalliser ([Van Driessche et al., 2021](#)). Les cristaux sont trempés dans une solution de cryo-protection et placé à -170°C e temps d'analyser les cristaux à l'aide d'un rayonnement synchrotron (exemple Canadian Light Souche à Saskatoon, SK au Canada). Les images issues de la diffraction permettront ensuite de générer une carte de densité électronique afin de

construire un modèle de la protéine à l'échelle atomique ([Abraham et al., 2022](#); [Babu et al., 2018](#); [Silva et al., 2011](#)).

Dans l'étude de BolA2, nous avons identifié une capacité de ce régulateur à réprimer des gènes impliqués dans la dégradation d'ARN et de protéines, dans le transport de sidérophores et dans le métabolisme de la proline. BolA2 s'est également montré capable d'activer un gène retrouvé dans la neutralisation du monoxyde d'azote, pouvant être toxique pour la cellule (Tableau 5.4). Ce régulateur a donc montré un rôle commun avec la protéine BolA d'*E. coli* qui est la réponse face au stress oxydatif et osmotique ([Santos et al., 1999](#)). Ces résultats sont intéressants, d'autant plus que la comparaison des structures entre la protéine BolA2 et la protéine BolA d'*E. coli* a indiqué un TM-Score de 0,74. Les structures sont relativement proches et leurs fonctions semblent se converger. Il serait intéressant de cultiver la souche sauvage ainsi que la souche ayant perdu le gène *bolA2* en condition de stress osmotique ou oxydatif (H₂O₂) afin de comparer le taux de mortalité entre les deux souches.

BolA2 semble être impliqué dans le métabolisme du fer, mais ce n'est qu'un gène qui a été identifié. Contrairement à ce que la littérature nous a indiqué, aucune interaction entre BolA2 et les glutarédoxines n'a été identifiée pour l'instant. Finalement, nous pensons que de la même façon que pour BolA1, BolA2 s'exprime faiblement de base. Nous pourrions donc utiliser la même stratégie proposée précédemment afin de surexprimer la protéine BolA2 et donc de connaître son réel impact dans le transcriptome de *N. elongata* afin de peut-être observer un lien solide avec le métabolisme du fer.

6.2 Le rôle des protéines de type BolA dans la morphologie de *Neisseria*

Lorsque nous avons supprimé le gène *bolA1*, nous avons observé une diminution significative de la longueur des cellules. Nous avons voulu corrélérer cette observation avec les résultats transcriptomiques mais nous n'avons aperçu aucune dérégulation liée à la biosynthèse de l'enveloppe. Il a été montré que le gène *ibaG* d'*E. coli* est co-transcrit avec le gène *murA*, impliqué dans la synthèse des précurseurs du peptidoglycane ([Fleurie et al., 2019](#); [Guinote et al., 2012](#)). Ici nous n'avons pas observé de dérégulation de ce gène, malgré le fait que *bolA1* et *murA* soient l'un à côté de l'autre au niveau du génome.

Il est toutefois important de retenir que la protéine BolA1 présente une topologie assez proche de celle d'*ibaG* (TM-Score de 0,85). Il est donc encore possible de supposer que *bolA1* et *murA* soient réellement co-transcrits ensembles chez *N. elongata* mais que nous n'avons pas été en mesure de l'observer. Si c'est réellement le cas, une diminution de l'expression de *MurA* serait

corrélé avec la diminution significative de la longueur des cellules après avoir supprimé le gène *bolA1*. Seule une analyse transcriptomique et morphologique de *BolA1* en condition de surexpression nous permettrait de valider ou non cette supposition.

Et lorsque nous avons surexprimé le gène *bolA1_{Nm}*, nous avons remarqué que les cellules étaient plus grandes, et les statistiques nous ont montré que cette différence était significative. C'est un résultat logique car on obtient une diminution de la longueur cellulaire en supprimant *bolA1*, et on obtient une augmentation de celle-ci lorsqu'on le surexprime. Si l'on associe cette différence aux résultats transcriptomiques, seulement un gène associé à la synthèse de l'enveloppe a été identifié. Il s'agit du gène *glmU*, qui de la même façon que *murA*, est responsable de la synthèse des précurseurs du peptidoglycane ([Mengin-Lecreux & van Heijenoort, 1993](#)). La difficulté dans la compréhension de cette augmentation significative de la longueur des cellules après avoir surexprimé la protéine *BolA1_{Nm}* est que le gène *glmU* est sous-exprimé par *BolA1_{Nm}* (Tableau 5.3). Il a été montré dans plusieurs études que, lorsque l'enzyme *GlmU* est inactivé chez un bacille, une forme ovoïde est obtenue ([Pompeo et al., 2001](#); [Zhang et al., 2009](#)). En partant de ce principe, nous aurions dû obtenir des cellules plus courtes en surexprimant *BolA1_{Nm}* et pas des cellules plus longues.

La forte ressemblance topologique entre la protéine *BolA1* et *BolA1_{Nm}* laisse à penser que la mutation A93K n'a pas impacté la structure *BolA1_{Nm}*. Afin d'en être sûr, il serait important de vérifier si une même augmentation significative de la longueur des cellules est obtenue en surexprimant la protéine *BolA1* chez *N. elongata*. Sachant qu'il est encore nécessaire d'obtenir plus de données transcriptomiques concernant *BolA1* de *N. elongata* (surexpression), il est encore difficile à l'heure actuelle d'expliquer cette différence morphologique observée chez *BolA1_{Nm}*. Il semblerait qu'un autre acteur de la morphologie ait permis ce changement de la longueur cellulaire.

Contrairement à nos observations concernant *BolA2*, les statistiques nous ont finalement montré que la suppression du gène *bolA2* entraîne une diminution significative de la longueur des cellules. Le même résultat a été observée entre la souche complétementée et la souche ayant perdu le gène *bolA2*. Malheureusement, les résultats transcriptomiques actuels ne permettent pas d'identifier quelles protéines sont responsables de cette différence morphologique. Comme proposé précédemment, il est nécessaire de construire une souche surexprimant la protéine *BolA2* chez *N. elongata*, afin d'identifier quels sont les acteurs régulés par *BolA2* qui jouent sur la morphologie.

6.3 La protéine BolA1 n'est pas la seule à avoir subi des changements d'acide aminé lors de la transition morphologique.

L'outil CAPRIB nous a permis de découvrir le lien entre l'apparition de la mutation A93K au niveau de la protéine BolA1 et de la transition morphologique ([Guerra Maldonado et al., 2020](#)). Actuellement, nous ne pensons pas que la mutation A93K ait pu modifier le comportement et la structure de BolA1_{Nm}. Du moins, d'autres travaux sont encore nécessaires afin de comprendre le rôle complet de BolA1 afin de comprendre si la mutation a eu un impact sur la fonction de BolA1_{Nm}.

Nous avons supposé que la machinerie d'élongation a été dérégulée au cours de l'évolution avant sa perte naturelle mais nous n'avons pas observé une telle dérégulation. Cependant, l'outil CAPRIB a également montré que d'autres substitutions d'acide aminé sont apparues en même temps que la transition morphologique et les modifications de la paroi rencontrées par le genre *Neisseria*. Il s'agit des protéines FtsZ et FtsA, des protéines liées à la machinerie de division (Figure 2.18). Nous avons discuté dans la partie Revue de la littérature d'une possible interaction entre la protéine FtsZ et BolA1. Cependant elles sont encore mal comprises.

En attendant de comprendre en totalité ce que BolA1 régule, il serait intéressant de se tourner vers l'étude de la machinerie de division. Les mécanismes associés à la division cellulaire ont peut-être pris le dessus par rapport à la machinerie d'élongation, conduisant à sa dérégulation et ainsi sa perte chez certaines espèces de coques. Peut-être qu'il existe actuellement une interaction entre BolA1 et FtsZ et que nous n'avons pas encore observé. Et la mutation A93K aurait pu modifier cette interaction ce qui expliquerait l'évolution du genre *Neisseria*. D'autres travaux sont encore nécessaires afin de comprendre si BolA1 et BolA1_{Nm} possèdent des structures et fonctions différentes, dans le but de répondre aux nouvelles problématiques que ce projet a engendré.

Mais avant cela, il est essentiel de continuer l'évolution *in vitro* conduite par Frédéric Veyrier en 2015 lorsqu'il a essayé de reproduire l'évolution naturelle des *Neisseria* ([Veyrier et al., 2015](#)). A partir du bacille *N. elongata* dans lequel le gène *yacF* a été supprimé (Figure 2.7), remplacer le gène *bolA1* par *bolA1_{Nm}* sera un nouveau pas dans la reproduction et la compréhension de l'évolution des *Neisseria*. Ce projet ne constitue qu'une étape dans la compréhension des différentes substitutions protéiques apparues lors de la transition morphologique. Au cours de l'évolution, l'apparition des bactéries de forme ronde coïncide avec celle des trois substitutions protéiques. Leur apparition n'est pas le fruit du hasard, c'est l'ensemble des mutations qui a

permis cette transformation de la morphologie et de la paroi. C'est l'ensemble des mutations qui a permis cette évolution.

Comme l'a dit Charles Darwin, « les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements ». C'est le parfait exemple afin d'illustrer l'évolution des *Neisseria*. Ce genre bactérien a répondu aux contraintes environnementales en s'adaptant notamment grâce à leur compétence naturelle ([Aas et al., 2002](#)). Les espèces ayant su s'adapter le mieux ont réussi à développer de nouvelles caractéristiques afin de maintenir une relation étroite avec l'être humain. Cependant, leur facilité à échanger de l'ADN avec les autres espèces a permis à certaines souches d'acquérir des facteurs de virulences néfastes pour l'hôte, conduisant à une guerre qui évolue sans arrêt entre ce dernier et les pathogènes ([Sansonetti, 2009](#)).

7 BIBLIOGRAPHIE

- Aas FE, Wolfgang M Fau - Frye S, Frye S Fau - Dunham S, Dunham S Fau - Løvold C, Løvold C Fau - Koomey M & Koomey M (2002) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. (0950-382X (Print)).
- Abraham AM, Thiel K, Shakouri M, Xiao Q, Paterson A, Schwenzel J, Ponnurangam S & Thangadurai V (2022) Ultrahigh Sulfur Loading Tolerant Cathode Architecture with Extended Cycle Life for High Energy Density Lithium–Sulfur Batteries. *Advanced Energy Materials* 12(34):2201494.
- Addinsoft (2022) XLSTAT statistical and data analysis solution. Paris, France).
- Adnan M, Morton G & Hadi S (2011) Analysis of *rpoS* and *bolA* gene expression under various stress-induced environments in planktonic and biofilm phase using 2(- $\Delta\Delta$ CT) method. *Mol Cell Biochem* 357(1-2):275-282.
- Adnan M, Morton G, Singh J & Hadi S (2010) Contribution of *rpoS* and *bolA* genes in biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Mol Cell Biochem* 342(1-2):207-213.
- Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A & Blankenberg D (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W537-W544.
- Aldea M, Garrido T, Hernández-Chico C, Vicente M & Kushner SR (1989) Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *EMBO J* 8(12):3923-3931.
- Aldea M, Hernández-Chico C, de la Campa AG, Kushner SR & Vicente M (1988) Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170(11):5169-5176.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403-410.
- Anantharaman V & Aravind L (2006) The NYN domains: novel predicted RNAses with a PIN domain-like fold. *RNA Biol* 3(1):18-27.
- Anders S, Pyl PT & Huber W (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166-169.
- Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG, Moreira RN, Pobre V, Reis FP, Saramago M, Silva IJ & Viegas SC (2010) The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiology Reviews* 34(5):883-923.
- Awuni E (2019) Status of Targeting MreB for the Development of Antibiotics. *Front Chem* 7:884.
- Babu M, Bundalovic-Torma C, Calmettes C, Phanse S, Zhang Q, Jiang Y, Minic Z, Kim S, Mehla J, Gagarinova A, Rodionova I, Kumar A, Guo H, Kagan O, Pogoutse O, Aoki H, Deineko V, Caufield JH, Holtzapple E, Zhang Z, Vastermark A, Pandya Y, Lai CC-I, El Bakkouri M, Hooda Y, Shah M, Burnside D, Hooshyar M, Vlasblom J, Rajagopala SV, Golshani A, Wuchty S, F Greenblatt J, Saier M, Uetz P, F Moraes T, Parkinson J & Emili

- A (2018) Global landscape of cell envelope protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 36(1):103-112.
- Bateman A & Kickhoefer V (2003) The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins. *BMC Bioinformatics* 4:49-49.
- Blom N, Gammeltoft S & Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294(5):1351-1362.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S & Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6):1633-1649.
- Blum M, Chang H-Y, Chuguransky S, Grego T, Kandasamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A & Finn RD (2021) The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res* 49(D1):D344-D354.
- Brown ED, Vivas EI, Walsh CT & Kolter R (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177(14):4194-4197.
- Carter DM, Miousse IR, Gagnon JN, Martinez E, Clements A, Lee J, Hancock MA, Gagnon H, Pawelek PD & Coulton JW (2006) Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J Biol Chem* 281(46):35413-35424.
- Castanheira S, Cestero JJ, García-del Portillo F & Pucciarelli MG (2018) Two distinct penicillin binding proteins promote cell division in different *Salmonella* lifestyles. *Microb Cell* 5(3):165-168.
- Castanheira S, Cestero JJ, Rico-Pérez G, García P, Cava F, Ayala JA, Pucciarelli MG & García-Del Portillo F (2017) A Specialized Peptidoglycan Synthase Promotes *Salmonella* Cell Division inside Host Cells. *mBio* 8(6).
- Chan WT, Verma Cs Fau - Lane DP, Lane Dp Fau - Gan SK-E & Gan SK (2013) A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. LID - 10.1042/BSR20130098 [doi] LID - e00086. (1573-4935 (Electronic)).
- Chandler RW, Rendtorff RC, Curran JW & Kellogg DS, Jr. (1974) Evaluation of media used for cultures of *Neisseria gonorrhoeae* and comparison of commercial and laboratory prepared supplements. *J. Am. Vener. Dis. Assoc.* 1(1):14-19.
- Chowdhury C, Nayak TR, Young KD & Ghosh AS (2010) A weak DD-carboxypeptidase activity explains the inability of PBP 6 to substitute for PBP 5 in maintaining normal cell shape in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 303(1):76-83.
- Cobiella D, Gram D & Santoro D (2019) Isolation of *Neisseria dumasiana* from a deep bite wound infection in a dog. *Vet Dermatol* 30(6):556-e168.
- Coureur M, Jamet A, Bille E, Lécuyer H, Bourdoulous S & Nassif X (2019) Molecular interactions between *Neisseria meningitidis* and its human host. *Cell Microbiol* 21(11):e13063-e13063.
- Craig L, Forest KT & Maier B (2019) Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology* 17(7):429-440.

- Craig WJ, Fau - Caskey CT & Caskey CT (1986) Expression of peptide chain release factor 2 requires high-efficiency frameshift. (0028-0836 (Print)).
- Daitch AK & Goley ED (Uncovering Unappreciated Activities and Niche Functions of Bacterial Cell Wall Enzymes. (1879-0445 (Electronic))).
- Deghmane AE, Hong E & Taha MK (2017) Emergence of meningococci with reduced susceptibility to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 72(1):95-98.
- Dlouhy AC, Li H, Albetel AN, Zhang B, Mapolelo DT, Randeniya S, Holland AA, Johnson MK & Outten CE (2016) The Escherichia coli BolA Protein IbaG Forms a Histidine-Ligated [2Fe-2S]-Bridged Complex with Grx4. *Biochemistry* 55(49):6869-6879.
- Dörr T, Lam H, Alvarez L, Cava F, Davis BM & Waldor MK (2014) A novel peptidoglycan binding protein crucial for PBP1A-mediated cell wall biogenesis in Vibrio cholerae. *PLoS genetics* 10(6):e1004433-e1004433.
- Dressaire C, Moreira RN, Barahona S, Alves de Matos AP & Arraiano CM (2015) BolA Is a Transcriptional Switch That Turns Off Motility and Turns On Biofilm Development. *mBio* 6(1):e02352-02314.
- Ducker GS & Rabinowitz JD (2017) One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* 25(1):27-42.
- Edwards JL & Apicella MA (2004) The molecular mechanisms used by Neisseria gonorrhoeae to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol Rev* 17(4):965-981.
- Erickson Harold P, Anderson David E & Osawa M (2010) FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(4):504-528.
- Errington J & Wu LJ (2017) Cell Cycle Machinery in Bacillus subtilis. *Subcell Biochem* 84:67-101.
- Evans CM, Pratt CB, Matheson M, Vaughan TE, Findlow J, Borrow R, Gorringe AR & Read RC (2011) Nasopharyngeal colonization by Neisseria lactamica and induction of protective immunity against Neisseria meningitidis. *Clin Infect Dis* 52(1):70-77.
- Fernández-Calvet A, Rodríguez-Arce I, Almagro G, Molerés J, Euba B, Caballero L, Martí S, Ramos-Vivas J, Bartholomew TL, Morales X, Ortiz-de-Solórzano C, Yuste JE, Bengoechea JA-O, Conde-Álvarez R & Garmendia J (Modulation of Haemophilus influenzae interaction with hydrophobic molecules by the VacJ/MlaA lipoprotein impacts strongly on its interplay with the airways. (2045-2322 (Electronic))).
- Fleurie A, Zoued A, Alvarez L, Hines KM, Cava F, Xu L, Davis BM & Waldor MK (2019) A Vibrio cholerae BolA-Like Protein Is Required for Proper Cell Shape and Cell Envelope Integrity. *mBio* 10(4):e00790-00719.
- Fox GE (2010) Origin and evolution of the ribosome. (1943-0264 (Electronic)).
- Freire P, Moreira RN & Arraiano CM (2009) BolA inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels. *J Mol Biol* 385(5):1345-1351.
- Freire P, Vieira HL, Furtado AR, de Pedro MA & Arraiano CM (2006) Effect of the morphogene bolA on the permeability of the Escherichia coli outer membrane. *FEMS Microbiol Lett* 260(1):106-111.
- Galego L, Barahona S, Romão CV & Arraiano CM (2021) Phosphorylation status of BolA affects its role in transcription and biofilm development. *The FEBS Journal* 288(3):961-979.

- Guerra Maldonado JF, Vincent AT, Chenal M & Veyrier FJ (2020) CAPRIB: a user-friendly tool to study amino acid changes and selection for the exploration of intra-genus evolution. *BMC Genomics* 21(1):832.
- Guinote I, Moreira R, Freire P & Arraiano C (2012) Characterization of the BolA Homolog IbaG: A New Gene Involved in Acid Resistance. *Journal of microbiology and biotechnology* 22:484-493.
- Guinote IB, Matos RG, Freire P & Arraiano CM (2011) BolA affects cell growth, and binds to the promoters of penicillin-binding proteins 5 and 6 and regulates their expression. *J Microbiol Biotechnol* 21(3):243-251.
- Guinote IB, Moreira RN, Barahona S, Freire P, Vicente M & Arraiano CM (2014) Breaking through the stress barrier: the role of BolA in Gram-negative survival. *World J Microbiol Biotechnol* 30(10):2559-2566.
- Hall-Stoodley L & Stoodley P (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 13(3):228-233.
- Hanson PI & Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(7):519-529.
- Hare PD & Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21(2):79-102.
- Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H & Höltje JV (2002) Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(22):6093-6099.
- Heurlier K, Thomson Mj Fau - Aziz N, Aziz N Fau - Moir JWB & Moir JW (2008) The nitric oxide (NO)-sensing repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. (1098-5530 (Electronic)).
- Hort EC (1917) THE MENINGOCOCCUS OF WEICHELBAUM. *Br Med J* 2(2960):377-381.
- Hou YM, Matsubara R, Takase R, Masuda I & Sulkowska JI (2017) TrmD: A Methyl Transferase for tRNA Methylation With m(1)G37. (0423-2607 (Print)).
- Jones DT & Thornton JM (2022) The impact of AlphaFold2 one year on. *Nature Methods* 19(1):15-20.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P & Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583-589.
- Kandathil SM, Greener JG, Lau AM & Jones DT (2022) Ultrafast end-to-end protein structure prediction enables high-throughput exploration of uncharacterized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(4):e2113348119.
- Kasai T, Inoue M, Koshiba S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Matsuda N, Tomo Y, Shirouzu M, Terada T, Obayashi N, Hamana H, Shinya N, Tatsuguchi A, Yasuda S, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Suzuki H, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T & Yokoyama S (2004) Solution structure of a BolA-like protein from *Mus musculus*. *Protein Sci* 13(2):545-548.

- Kellogg DS, Jr., Peacock WL, Jr., Deacon WE, Brown L & Pirkle DI (1963) NEISSERIA GONORRHOEAE. I. VIRULENCE GENETICALLY LINKED TO CLONAL VARIATION. *J Bacteriol* 85(6):1274-1279.
- Kiss E, Huguet T Fau - Poinot V, Poinot V Fau - Batut J & Batut J (2004) The *typA* gene is required for stress adaptation as well as for symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* 1021 with certain *Medicago truncatula* lines. (0894-0282 (Print)).
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48(6):1511-1524.
- Knapp BD, Ward MD, Bowman GR, Shi H & Huang KC (2022) Multiple conserved states characterize the twist landscape of the bacterial actin homolog MreB. *Comput Struct Biotechnol J* 20:5838-5846.
- Koch B & Nybroe O (2006) Initial characterization of a *bolA* homologue from *Pseudomonas fluorescens* indicates different roles for *BolA*-like proteins in *P. fluorescens* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 262(1):48-56.
- Koedooder R, Mackens S, Budding A, Fares D, Blockeel C, Laven J & Schoenmakers S (2019) Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update* 25(3):298-325.
- Krupka M, Sobrinos-Sanguino M, Jiménez M, Rivas G & Margolin W (2018) *Escherichia coli* ZipA Organizes FtsZ Polymers into Dynamic Ring-Like Protofilament Structures. *mBio* 9(3).
- Lange R & Hengge-Aronis R (1991) Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* 173(14):4474-4481.
- Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4):357-359.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M & Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10(3):R25.
- Laudenbach DE & Grossman AR (Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. (0021-9193 (Print)).
- Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O & Beloin C (2013) From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2(2):288-356.
- Lenski RE (2017) What is adaptation by natural selection? Perspectives of an experimental microbiologist. *PLoS genetics* 13(4):e1006668-e1006668.
- Li H, Mapolelo DT, Randeniya S, Johnson MK & Outten CE (2012) Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human *BolA2*. *Biochemistry* 51(8):1687-1696.
- Ling M, Allen Sw Fau - Wood JM & Wood JM (1994) Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. (0022-2836 (Print)).
- Liu G, Tang CM & Exley RM (2015) Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology* 161(7):1297-1312.

- Liu L, Ji Z, Zhao K, Zhao Y, Zhang Y & Huang S (2022) Validation of housekeeping genes as internal controls for gene expression studies on biofilm formation in *Bacillus velezensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 106(5-6):2079-2089.
- Loret T (2017) *Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂.*
- Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12):550.
- Maclean KN, Greiner LS, Evans JR, Sood SK, Lhotak S, Markham NE, Stabler SP, Allen RH, Austin RC, Balasubramanian V & Jiang H (2012) Cystathionine Protects against Endoplasmic Reticulum Stress-induced Lipid Accumulation, Tissue Injury, and Apoptotic Cell Death *. *Journal of Biological Chemistry* 287(38):31994-32005.
- Madru C, Leulliot N & Lebaron S (2017) [Ribosomes synthesis at the heart of cell proliferation]. *Med Sci (Paris)* 33(6-7):613-619.
- Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M & Tegos GP (2018) Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev* 31(3).
- Malé P-J, Bardon L, Besnard G, Coissac É, Delsuc F, Engel J, Lhuillier E, Scotti-Saintagne C, Tinaut A & Chave J (2014) Genome skimming by shotgun sequencing helps resolve the phylogeny of a pantropical tree family. *Molecular Ecology Resources* 14:966-975.
- Malinverni Juliana C & Silhavy Thomas J (2009) An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(19):8009-8014.
- Man WH, de Steenhuijsen P, WAA & Bogaert D (2017) The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 15(5):259-270.
- Mändar R (2013) Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner. *Pharmacological Research* 69(1):32-41.
- Mann HB & Whitney DR (1947) On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18(1):50-60.
- Margolin W (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. (1471-0072 (Print)).
- Marrazzo JM, Koutsky LA, Eschenbach DA, Agnew K, Stine K & Hillier SL (2002) Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. *J Infect Dis* 185(9):1307-1313.
- Mattick J (2002) Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual review of microbiology* 56:289-314.
- McCaddon A & Miller J (2015) Assessing the association between homocysteine and cognition: Reflections on Bradford Hill, meta-analyses, and causality. *Nutrition reviews* 73.
- McClure R, Balasubramanian D, Sun Y, Bobrovskyy M, Sumby P, Genco CA, Vanderpool CK & Tjaden B (2013) Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Res* 41(14):e140.
- Mengin-Lecreulx D & van Heijenoort J (1993) Identification of the glmU gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175(19):6150-6157.
- Microsoft (2022) Microsoft Excel.).

- Mil-Homens D, Barahona S, Moreira RN, Silva IJ, Pinto SN, Fialho AM & Arraiano CM (2018) Stress Response Protein BolA Influences Fitness and Promotes Salmonella enterica Serovar Typhimurium Virulence. *Appl Environ Microbiol* 84(8).
- Mirelman D, Yashouv-Gan Y & Schwarz U (1977) Regulation of murein biosynthesis and septum formation in filamentous cells of Escherichia coli PAT 84. *J Bacteriol* 129(3):1593-1600.
- Moffat L, Kandathil SM & Jones DT (2022) Design in the DARK: Learning Deep Generative Models for De Novo Protein Design. *bioRxiv* 10.1101/2022.01.27.478087:2022.2001.2027.478087.
- Moreira RN, Dressaire C, Domingues S & Arraiano CM (2011) A new target for an old regulator: H-NS represses transcription of bolA morphogene by direct binding to both promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 411(1):50-55.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC & Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W182-185.
- Moses S, Sinner T Fau - Zapras A, Zapras A Fau - Stöveken N, Stöveken N Fau - Hoffmann T, Hoffmann T Fau - Belitsky BR, Belitsky Br Fau - Sonenshein AL, Sonenshein Al Fau - Bremer E & Bremer E (2012) Proline utilization by Bacillus subtilis: uptake and catabolism. (1098-5530 (Electronic)).
- Nair J, Rouse Da Fau - Bai GH, Bai Gh Fau - Morris SL & Morris SL (1993) The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. (0950-382X (Print)).
- Nardi A, Corda Y, Baty D & Duché D (2001) Colicin A immunity protein interacts with the hydrophobic helical hairpin of the colicin A channel domain in the Escherichia coli inner membrane. *J Bacteriol* 183(22):6721-6725.
- Neisser A (1879) *Ueber eine der Gonorrhoe eigentümliche Micrococcusform, vorläufige Mitteilung*. Berlin
- Nelson DE, Ghosh AS, Paulson AL & Young KD (2002) Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of Escherichia coli. *J Bacteriol* 184(13):3630-3639.
- Nelson DE & Young KD (2001) Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in Escherichia coli. *J Bacteriol* 183(10):3055-3064.
- Nikaido H (1993) Transport across the bacterial outer membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 25(6):581-589.
- Nuwong W & Kittiwongwattana C (2022) Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression in Bacillus siamensis 1021 grown in different culture media. *Iran J Microbiol* 14(2):194-202.
- Nyongesa S, Chenal M, Bernet È, Coudray F & Veyrier FJ (2022a) Sequential markerless genetic manipulations of species from the Neisseria genus. LID - 10.1139/cjm-2022-0024 [doi]. (1480-3275 (Electronic)).
- Nyongesa S, Weber P, Bernet E, Pullido F, Nieckarz M, Delaby M, Nieves C, Viehboeck T, Krause N, Rivera-Millot A, Nakamura A, Vischer N, VanNieuwenhze M, Brun Y, Cava F,

- Bulgheresi S & Veyrier F (2022b) Evolution of multicellular longitudinally dividing oral cavity symbionts (Neisseriaceae). (Research Square).
- O'Toole G, Kaplan HB & Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
- Otto K & Hermansson M (2004) Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol* 186(1):226-234.
- Pompeo F, Bourne Y, van Heijenoort J, Fassy F & Mengin-Lecreux D (2001) Dissection of the Bifunctional *Escherichia coli* N-Acetylglucosamine-1-phosphate Uridyltransferase Enzyme into Autonomously Functional Domains and Evidence That Trimerization Is Absolutely Required for Glucosamine-1-phosphate Acetyltransferase Activity and Cell Growth*. *Journal of Biological Chemistry* 276(6):3833-3839.
- Powell DA, Ma M, So M & Frelinger JA (2018) The Commensal *Neisseria musculi* Modulates Host Innate Immunity To Promote Oral Colonization. *Immunohorizons* 2(9):305-313.
- Pratt LA & Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30(2):285-293.
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P & Dorel C (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2(4):450-464.
- Quillin SJ & Seifert HS (2018) *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16(4):226-240.
- Quistgaard EM, Löw C, Guettou F & Nordlund P (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(2):123-132.
- R. Dewaele JA, O. Fillod, S. Valera-Kummer (2019) Planche anatomique du système génital développée par le Bioscope, les HUG, le DIP et Odile Fillod Édité Moyens D'enseignement Romands En Sciences De La Nature (Conférence intercantonale de l'instruction publique, Genève).
- Randich AM & Brun YV (2015) Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Front Microbiol* 6:580.
- Ransom EM, Ellermeier CD & Weiss DS (2015) Use of mCherry Red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 81(5):1652-1660.
- Richardson DHS (1999) War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycological Research* 103(6):641-650.
- Rivera-Ordaz A, Bracher S, Sarrach S, Li Z, Shi L, Quick M, Hilger D, Haas R & Jung H (2013) The Sodium/Proline Transporter PutP of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 8(12):e83576.
- Roret T (2014) *Structural characterization of oligomeric states of proteins involved in iron homeostasis: BolA proteins and glutaredoxins*
- Caractérisation structurale d'états oligomériques de protéines impliquées dans l'homéostasie du fer : les protéines BolA et les glutarédoxines.* (Université de Lorraine). <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751272> (Consulté le 2014-11-28)
- Rotman E & Seifert HS (2014) The Genetics of *Neisseria* Species. *Annual Review of Genetics* 48(1):405-431.

- Sáez Nieto JA, Marcos C & Vindel A (1998) Multicolonization of human nasopharynx due to *Neisseria* spp. *Int Microbiol* 1(1):59-63.
- Sansonetti (2009) *Des microbes et des hommes. Guerre et Paix aux surfaces muqueuses : Leçon inaugurale prononcée le jeudi 20 novembre 2008*. Paris : Collège de France
- Santos J, Lobo M, Matos A, de Pedro M & Arraiano C (2002) The gene *bolA* regulates *DacA* (PBP5), *DacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 45:1729-1740.
- Santos JM, Freire P, Mesquita FS, Mika F, Hengge R & Arraiano CM (2006) Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via *sigmaS* proteolysis. *Mol Microbiol* 60(1):177-188.
- Santos JM, Freire P, Vicente M & Arraiano CM (1999) The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol* 32(4):789-798.
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7):671-675.
- Seifert HS (2019) Location, Location, Location-Commensalism, Damage and Evolution of the Pathogenic *Neisseria*. *J Mol Biol* 431(16):3010-3014.
- Shaw PE (2002) Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep* 3(6):521-526.
- Silva LP, Yu R, Calmettes C, Yang X, Moraes TF, Schryvers AB & Schriemer DC (2011) Conserved interaction between transferrin and transferrin-binding proteins from porcine pathogens. *J Biol Chem* 286(24):21353-21360.
- Stephens DS (2007) Conquering the Meningococcus. *FEMS Microbiology Reviews* 31(1):3-14.
- Takamatsu H, Kodama T, Nakayama T & Watabe K (1999) Characterization of the *yrbA* gene of *Bacillus subtilis*, involved in resistance and germination of spores. *J Bacteriol* 181(16):4986-4994.
- Talib EA & Outten CE (2021) Iron-sulfur cluster biogenesis, trafficking, and signaling: Roles for CGFS glutaredoxins and *BolA* proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868(1):118847.
- Tamura K, Stecher G & Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022-3027.
- Thorpe C & Kim JJ (1995) Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *Faseb j* 9(9):718-725.
- Tjaden B (2015) De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data. *Genome Biology* 16(1):1.
- Tjaden B (2020) A computational system for identifying operons based on RNA-seq data. *Methods* 176:62-70.
- Van Driessche AES, Van Gerven N, Joosten RRM, Ling WL, Bacia M, Sommerdijk N & Sleutel M (2021) Nucleation of protein mesocrystals via oriented attachment. *Nature Communications* 12(1):3902.
- Van Houdt R & Michiels CW (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 156(5-6):626-633.

- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D & Velankar S (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50(D1):D439-D444.
- Veyrier FJ, Biais N, Morales P, Belkacem N, Guilhen C, Ranjeva S, Sismeiro O, Péhau-Arnaudet G, Rocha EP, Werts C, Taha M-K & Boneca IG (2015) Common Cell Shape Evolution of Two Nasopharyngeal Pathogens. *PLOS Genetics* 11(7):e1005338.
- Vieira HL, Freire P & Arraiano CM (2004) Effect of *Escherichia coli* morphogene *bolA* on biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5682-5684.
- Vijaya Chandra SH, Srinivas R, Dawson TL, Jr. & Common JE (2020) Cutaneous *Malassezia*: Commensal, Pathogen, or Protector? *Front Cell Infect Microbiol* 10:614446.
- Vishniakov IE & Borkhsenius SN (2007) [FtsZ and the division of bacterial cell]. *Tsitologija* 49(5):421-429.
- Vos T (2017) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* 390(10100):1211-1259.
- Wagner GP, Kin K & Lynch VJ (2012) Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci* 131(4):281-285.
- Weyand NJ, Wertheimer AM, Hobbs TR, Sisko JL, Taku NA, Gregston LD, Clary S, Higashi DL, Biais N, Brown LM, Planer SL, Legasse AW, Axthelm MK, Wong SW & So M (2013) *Neisseria* infection of rhesus macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(8):3059-3064.
- WHO (2016) WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*.
- Williams AH, Wheeler R, Deghmane A-E, Santecchia I, Impens F, Bastos PAD, Hicham S, Nilges MM, Malosse C, Chamot-Rooke J, Haouz A, Robins WP, Taha M-K & Boneca IG (2019) Crippling the bacterial cell wall molecular machinery. *bioRxiv* 10.1101/607697:607697.
- Yamamoto K, Nagura R, Tanabe H, Fujita N, Ishihama A & Utsumi R (2000) Negative regulation of the *bolA1p* of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor *OmpR* for osmolarity response genes. *FEMS Microbiol Lett* 186(2):257-262.
- Yampolsky LY & Stoltzfus A (2005) The exchangeability of amino acids in proteins. *Genetics* 170(4):1459-1472.
- Yang DC, Blair KM & Salama NR (2016) Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(1):187-203.
- Yin J, Zhang T, Cai J, Lou J, Cheng D, Zhou W, Xu C, Liu Y, Gao H & Yu Z (2020) PBP1a glycosyltransferase and transpeptidase activities are both required for maintaining cell morphology and envelope integrity in *Shewanella oneidensis*. *FEMS Microbiology Letters* 367(3):fnaa026.
- Zhang C, Shine M, Pyle AM & Zhang Y (2022) US-align: universal structure alignments of proteins, nucleic acids, and macromolecular complexes. *Nature Methods* 19(9):1109-1115.

- Zhang Z, Bulloch EMM, Bunker RD, Baker EN & Squire CJ (2009) Structure and function of GlmU from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65(Pt 3):275-283.
- Zhao S, Ye Z & Stanton R (2020) Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols. *RNA* 26(8):903-909.
- Zhong Y, Kinio A Fau - Saleh M & Saleh M (2013) Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. (1664-3224 (Print)).
- Zumla A (2010) Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 10(5):303-304.

8 ANNEXE

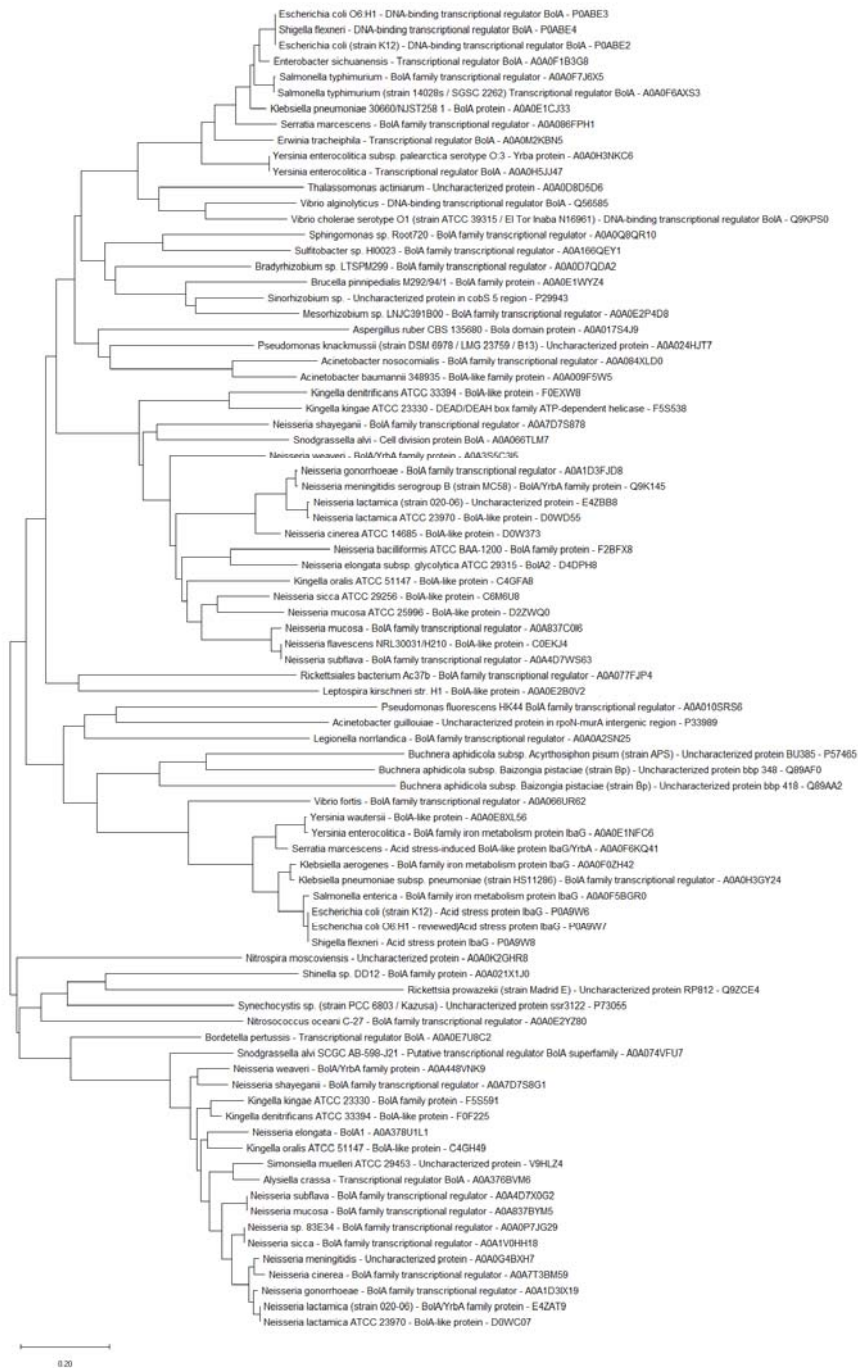


Figure 8.1 Arbre phylogénétique basé sur 84 protéines de type BoIA

Parmi ces 84 protéines alignées avec MUSCLE de l'outil MEGA, on retrouve la protéine BoIA1 et BoIA2 de *N. elongata* (Tamura et al., 2021).