



HAL
open science

Etude des premières étapes de la transformation naturelle chez *Helicobacter pylori*

Christopher Corbinais

► **To cite this version:**

Christopher Corbinais. Etude des premières étapes de la transformation naturelle chez *Helicobacter pylori*. Microbiologie et Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066620 . tel-01655503

HAL Id: tel-01655503

<https://theses.hal.science/tel-01655503>

Submitted on 5 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE PIERRE ET MARIE CURIE
ECOLE DOCTORALE : COMPLEXITE DE VIVANT**

**Etude des premières étapes de la transformation
naturelle chez *Helicobacter pylori***

Christopher CORBINAIS

Pour l'obtention du grade de **Docteur de L'université Pierre et Marie Curie**
Discipline : Microbiologie/Biologie Moléculaire/Biochimie

Date de soutenance : 03/12/2015

Directrice de thèse : Stéphanie Marsin

Composition du jury :

Pr Guennadi SEZONOV	Président du jury
Dr Xavier CHARPENTIER	Rapporteur
Dr Hilde DE REUSE	Rapporteur
Dr Marie-Agnès PETIT	Examineur
Dr Nicolas MIROUZE	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de recherche sur l'instabilité génétique (LRIG) de l'institut de recherche en radiobiologie cellulaire et moléculaire (IRCM) situé au sein du CEA de Fontenay-aux-Roses.

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mes travaux de recherche : Mr Guennadi Sezonov pour avoir accepté de présider cette thèse, Mme Hilde De Reuse et Mr Xavier Charpentier pour avoir bien voulu être rapporteur de mon travail malgré leurs emplois du temps chargés, Mme Marie-Agnès Petit et Mr Nicolas Mirouze d'avoir eu la gentillesse de participer à ce jury.

Je remercie sincèrement le docteur Juan-Pablo Radicella de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie pour le temps qu'il a toujours su me consacrer en dépit de ses multiples obligations. Que ce soit pour parler science, répondre à mes questions ou pour seulement me donner quelques conseils, il a toujours été disponible. Je le remercie également pour les nombreux congrès auxquels il a accepté de me faire participer.

Je remercie le docteur Stéphanie Marsin pour m'avoir encadré pendant toute la durée de ma thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour tout ce qu'elle m'a appris, pour la confiance qu'elle a su m'accorder ainsi que pour sa patience. J'ai conscience que si j'ai pu réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions c'est en grande partie grâce à son remarquable encadrement. Un grand merci à toi Stef ! Je garderai un très bon souvenir de ces trois années passées en ta compagnie.

Merci à toutes les personnes qui ont physiquement participé à ce travail, en particulier Aurélie Mathieu et Nicolas Montaldo.

Je remercie l'ensemble des membres du LRIG ainsi que toutes les personnes du bâtiment 05 qui m'ont accompagné durant cette aventure.

Je tiens également à remercier Ivan Matic, Gael Millot et de nouveau Marie Agnès Petit pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Leurs conseils éclairés ont toujours été d'une grande aide.

Je ne peux bien sûr pas finir ces remerciements sans faire une spéciale dédicace au LRP pour tous les pots auxquels je me suis incrusté. C'était un vrai plaisir de trinquer en votre compagnie les gars! Je remercie également ma famille pour m'avoir soutenu dans cette belle entreprise qu'est la thèse ainsi que mes amis qui m'ont accompagné pendant ces trois années parfois un peu galères.

Je tiens enfin à remercier les deux personnes sans qui l'UMR 967 ne serait rien. Elles sont notre phare dans la tempête, notre lumière au bout du tunnel, c'est le cœur battant du bâtiment 05. Je veux bien sûr parler d'Aurélie Gouret et Arielle Leliard. Je vous remercie tout d'abord pour le merveilleux travail que vous réalisez pour nous tous mais également pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre soutien continu. Ne plus vous voir tous les jours va indubitablement me manquer.

J'ai pu réaliser ces travaux grâce aux financements de la région île de France (DIM malinf) et de l'agence Nationale pour la Recherche

Table des matières

Résumé	1
Liste des abréviations	3
Introduction	5
Première partie : Helicobacter pylori	7
I- Caractéristiques générales d'Helicobacter pylori	9
A- Présentation phylogénétique	9
B- Découverte d'Helicobacter pylori	9
C- Caractéristiques physico-biologiques	10
1- Morphologie et culture	10
2- Une bactérie pour trois formes	10
3- Les biofilms	11
D- Génome d'Helicobacter. pylori	11
II- Infection et pathogenèse	12
A- Prévalence et mode d'infection	12
B- L'infection par Helicobacter pylori	12
C- Les pathologies causées par H. pylori	12
1- Ulcère	13
2- Cancer de l'estomac	13
3) Autres pathologies	13
D- Diagnostic	14
E- Traitement	15
III- Variabilité génétique de H. pylori	15
A- Polymorphisme nucléotidique	16
B- Réarrangements chromosomiques	17
1- Réorganisation du génome	17
2- Transferts horizontaux d'ADN	17
- La conjugaison	18
- La transduction	19
- La transformation naturelle	19
Deuxième partie : La transformation bactérienne	21
I- La transformation bactérienne	23
A- Découverte de la transformation bactérienne	23
B- Pourquoi les bactéries transforment-elles ?	24
C- Principe de la transformation bactérienne	26
D- La Transformation de plasmide	28
E- La recombinaison homologue	29
F- Limitation de la transformation par les mécanismes biologiques	31
II- La transformation chez les bactéries à Gram positif	32
A- Le processus d'internalisation	32
B- La machinerie d'internalisation	32
C- La régulation de l'entrée en compétence	33
D- L'entrée en compétence chez S. pneumoniae : un quorum sensing?	34
E- La régulation de la sortie de la compétence	35
F- Le fratricide microbien chez S. pneumoniae	37
III- La transformation chez les bactéries à Gram négatif	38
A- La capture de l'ADN chez les bactéries à Gram négatif	39

- Le système de restriction/modification chez <i>N. gonorrhoeae</i>	39
B- La machinerie d'internalisation des bactéries à Gram négatif	40
- Le transformasome de <i>H. influenzae</i>	40
C- La régulation de la compétence	41
1) La régulation de la compétence chez <i>N. gonorrhoeae</i>	41
2) La régulation de la compétence chez <i>H. influenzae</i>	42
3) La régulation de la compétence chez <i>V. cholerae</i> (figure 13)	42
a) Un mécanisme Sxy like (figure 13 A).....	43
b) Un mécanisme de quorum sensing (figure 13B)	44
c) Un mécanisme de fratricide.....	44
4) La régulation de la compétence chez le genre <i>Pseudomonas</i>	45
Troisième partie : La transformation chez <i>H. pylori</i>	47
I- Découverte de la transformation chez <i>H. pylori</i>	49
II- La machinerie d'internalisation de <i>H. pylori</i>	49
A) Les systèmes de sécrétion de type IV	49
B) Le système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i>	50
C) Le mécanisme d'internalisation et d'intégration (figure 16).....	52
D) Intégration de l'ADN transformant.....	53
E) Les nucléases impliquées dans la transformation chez <i>H. pylori</i> : impact de la protéine NucT.....	53
III- La régulation de la transformation chez <i>H. pylori</i>	54
A) Sélection des séquences d'ADN transformant	54
B) Régulation de la compétence.....	55
IV) Projet de thèse	59
Résultats	61
I) Visualisation directe de la capture de l'ADN chez <i>H. pylori</i>	63
A- Présentation des travaux de recherche.....	63
B- Article 1	65
C- Travaux complémentaires sur la visualisation de la transformation	93
II- Défauts de réparation et compétence	95
A- Problématique de recherche	95
B- Visualisation des foci d'ADN sur des cellules fixées.....	97
C- La suppression de la voie de réparation par recombinaison homologue induit une augmentation du nombre de foci.....	99
D- L'augmentation du nombre de foci est corrélée à une augmentation du nombre de T4SS.....	100
E- Analyse du niveau d'expression de ComB8 et ComB10 dans différents fonds génétiques.....	101
F- Niveau d'expression du T4SS et niveau de transformation	103
G- Données complémentaires	104
1) Etude de DprB	104
2) Etude du gène HP1473	105
III- Etude du rôle de la nucléase NucT	109
A- Problématique de recherche	109
B- Caractérisation biochimique	111
1) Production de la protéine NucT pure	111
2) Détermination du milieu réactionnel	111
3) NucT est plus active sur l'ADN simple-brin que sur l'ADN double-brin.....	112
4) NucT possède une activité endonucléase et 3'exonucléase	113
5) L'histidine 124 est indispensable à l'activité nucléase	116
6) NucT est également capable de dégrader les ARN	116

7) NucT possède une importante affinité pour l'ADN simple brin	117
C- Localisation de la protéine NucT	118
D- Phénotype des souches mutées pour nucT	119
E- Données complémentaires	119
1) Fluorescence et nucléase : création d'artefacts	119
2) Recherche de protéines interagissant avec NucT	120
Discussion et perspectives	123
I- Visualisation de la transformation	125
A- Croissance de <i>H. pylori</i> sous microscope	125
B- ADN-fluorescent et transformation	126
C- Génération de bactérie GFP	126
D- La transformation et division cellulaire	127
E- ComEC est impliquée dans le passage de l'ADN dans le cytoplasme	127
II- Défauts de réparation et compétence	128
A- Nombre de foci et quantité d'ADN capturé	128
B- L'induction de la compétence chez <i>H. pylori</i>	129
C- Existe-t-il un lien entre niveau d'expression du T4SS et fréquence de transformation ?	130
D- Détermination des facteurs limitant la transformation	130
III- Analyse du rôle de NucT	131
A- NucT est une nucléase très active impliquée dans la transformation	131
B- L'activité nucléase de NucT ne semble pas impliquée dans la transformation	132
C- La protéine NucT est localisée de manière homogène le long des membranes cellulaires	132
D- L'activité nucléase de NucT est-elle impliquée dans le recyclage des nucléotides ?	132
Matériels et méthodes	135
Bibliographie	151

Résumé

H. pylori est une bactérie à Gram négatif qui infecte l'estomac de près de 50% de la population mondiale. L'infection, en général asymptomatique, peut évoluer vers l'ulcère gastrique (15% des cas) ou le cancer de l'estomac (1% des cas). L'infection à *H. pylori* est traitée par antibiothérapie mais ces dernières années ont vu une augmentation du nombre de souches résistantes. Cette augmentation et la forte prévalence d'*H. pylori* sont probablement dues à son importante variabilité génétique qui a pour origine un fort taux de mutagenèse spontanée, associée à une recombinaison efficace et un important transfert horizontal de gènes. *H. pylori* est en effet naturellement compétente pour la transformation qui est le processus biologique permettant la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène dans le génome de la bactérie. Ce processus favorise la diversité génétique au sein d'une population et peut permettre son adaptation rapide aux changements environnementaux.

Durant ma thèse, j'ai participé au développement d'une méthode permettant de visualiser la transformation d'ADN fluorescent dans des cellules de *H. pylori* vivantes. Cette méthode nous a permis, pour la première fois, de visualiser directement l'entrée d'un ADN transformant dans le cytoplasme d'une bactérie compétente. Elle nous a également permis de confirmer le rôle de la protéine ComEC dans l'internalisation de l'ADN dans le cytoplasme.

Le travail que j'ai réalisé a également permis de mettre en évidence que le niveau de transformation de *H. pylori* est déterminé par le niveau d'expression du complexe membranaire d'internalisation. La quantité d'ADN capturée serait alors un facteur limitant pour la transformation chez cette bactérie.

Enfin, j'ai initié la caractérisation biochimique et génétique de la protéine NucT, une nucléase associée à la membrane et impliquée dans la transformation.

Abstract

H. pylori is a Gram negative flagellar bacterium that colonizes nearly 50% of the world population. Infection is generally asymptomatic but can evolve to ulcerous gastritis (15% of the cases) or stomach cancer (1% of the cases). *H. pylori* infection is usually treated with antibiotic but a dramatic increase in the number of resistant strains was observed during the last years. This increase, and the high prevalence of *H. pylori*, are probably caused by its huge genetic variability likely due to a strong mutagenesis rate associated with efficient recombination and horizontal gene transfer. *H. pylori* is indeed naturally competent for transformation which is the biological process allowing capture, internalization and integration of exogenous DNA in the genome of a bacterium. This process promotes genetic diversity in a population and could permit rapid adaptation to environmental changes.

During my thesis, I participated to the development of a method to visualize transformation in *H. pylori* living cells. Using fluorescently labelled DNA, this method allowed us for the first time to follow directly the entry of a transforming DNA into the cytoplasm of competent bacteria. It also allowed us to confirm the role of the ComEC protein in the internalization of the DNA in the cytoplasm.

The work I performed also allowed to show that the level of expression of the uptake complex determines the transformation efficiency of *H. pylori*. The amount of captured DNA would then be a limiting factor for the transformation in this bacterium.

Finally, I initiated the biochemical and genetic characterization of the NucT protein, a nuclease associated to the membrane and implicated in the transformation.

Liste des abréviations

AB	Antibiotique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNsb	ADN simple-brin
ADNdb	ADN double-brin
AI-2	Auto-Inducer 2
AMP	Adénosine monophosphate
Apra	Apramycine
ATP	Adenosine triphosphate
BER	Réparation par excision de base
BHI	Brain heart infusion medium
CAI-1	Cholera Auto-Inducer 1
Cm	Cloramphénicol
CRP	Protéine réceptrice d'AMP cyclique
CSP	Competence Stimulating Peptide
DNase	Desoxyribonucléase
DUS	DNA uptake sequence
HRP	Horseradish peroxidase
IPP	Inhibiteur de pompe à protons
ISR	Interspersed Sequences of the Recipient
Kb	Kilo base
Km	Kanamycine
MMR	Réparation de mismatch
Nt	nucléotide
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pH	Potentiel hydrogène
PLD	Phospholipase D
piRNA	ARN interagissant avec les protéines Piwi
QS	Quorum sensing
R/M	Restriction-modification
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

Système R/M	Système de restriction modification
SSB	Single strand DNA binding protein
SVF	Serum foetal de veau
T4SS	Système de sécrétion de type IV
T6SS	Système de sécrétion de type VI
UV	Ultraviolet
WT	Souche sauvage ou wild type

Introduction

Première partie : *Helicobacter pylori*

I- Caractéristiques générales d'*Helicobacter pylori*

A- Présentation phylogénétique

Helicobacter pylori est un micro-organisme appartenant au règne bacteria. Il est classé dans le phylum proteobacteria, classe Epsilon Proteobacteria, ordre des Campylobacterales, famille des Helicobacteraceae, genre Helicobacter. Le genre Helicobacter regroupe actuellement 35 espèces différentes (fichier Helicobacter in List of Prokaryotic Names with standing in Nomenclature). Les bactéries du genre Helicobacter affichent une spécificité d'hôte et de tissu très importante. Ainsi, si *H. pylori* infecte spécifiquement l'homme, *Helicobacter felix* infecte, elle, spécifiquement le chat. Bien que les infections inter-espèces soient rares, ces dernières sont toutefois possibles. L'infection par le genre Helicobacter est majoritairement localisée au niveau des muqueuses gastriques et gastro intestinales mais également au niveau du foie et du tractus biliaire.

B- Découverte d'*Helicobacter pylori*

C'est en 1984 que Warren et Marshall décrivent une association entre la présence d'un organisme spiralé dans la muqueuse gastrique et des gastrites chez l'adulte (Marshall and Warren, 1984). La bactérie en question est cultivée en laboratoire et nommée *Campylobacter pyloridis* à cause de sa ressemblance avec *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter pyloridis* est alors proposée comme étant la principale cause des gastrites chroniques et des ulcères chez l'adulte. Bien que Marshall et Warren ne soient pas les seuls à observer cette corrélation, la majorité de la communauté scientifique demeure réfractaire vis-à-vis de l'existence d'une bactérie pouvant survivre dans le milieu acide de l'estomac. Les mentalités finissent par évoluer en 1985 lorsque Marshall s'infecte volontairement avec la bactérie et développe une gastrite qui disparaît après traitement antibiotique (Marshall et al., 1985). En 1989 des analyses chimio-biologiques de la bactérie (alors nommée *Campylobacter pylori*) ont mis en évidence des différences trop importantes avec le genre Campylobacter (Goodwin et al., 1989). La communauté décide donc en 1990 de renommer *Campylobacter pylori* en *Helicobacter pylori*, faisant de cette dernière l'espèce type du nouveau genre Helicobacter. En 1994, la bactérie est admise comme étant la principale cause des ulcères gastriques chez l'adulte.

C- Caractéristiques physico-biologiques

1- Morphologie et culture

H. pylori est une bactérie à Gram négatif de forme incurvée exhibant 4 à 6 flagelles unipolaires lui permettant de se mouvoir (Figure 1). La bactérie mesure de 0,5 à 1,0 µm de largeur pour 2.5 à 4 µm de longueur (Goodwin and Armstrong, 1990). *H. pylori* étant déficiente pour certaines voies de biosynthèse d'acides aminés, elle ne peut être cultivée que sur milieu riche. Les milieux classiquement utilisés sont constitués d'agarose Brucella ou Columbia complémentés avec du sang ou du sérum. Les milieux pour cultures liquides sont composés de milieu Brucella, de Mueller–Hinton ou de Brain Heart Infusion (BHI) broth complémentés avec du sérum. *H. pylori* nécessite des conditions atmosphériques particulières et notamment une quantité d'oxygène réduite (5%), un surplus de CO₂ (5 à 10%) ainsi qu'un important niveau d'humidité. Si *H. pylori* est capable de survivre à des pH inférieurs à 4, une croissance bactérienne n'est observée qu'entre pH 5.5 et pH 8.0 avec un temps de génération optimal de 2h30 à pH neutre et à 37°C. *H. pylori* ne pousse par contre pas en conditions aérobie ou anaérobie.

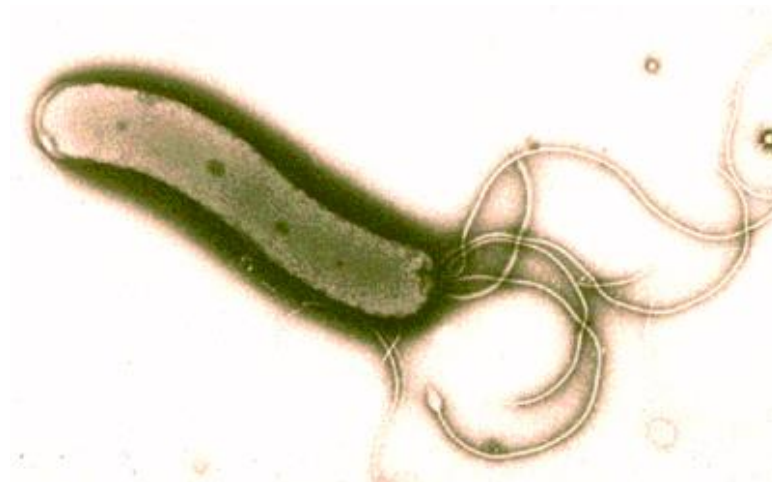


Figure 1 : *Helicobacter pylori*

2- Une bactérie pour trois formes

H. pylori peut se présenter sous une forme bacillaire cultivable et virulente, une forme coccoïde viable mais non cultivable et une forme coccoïde morte dite dégénérative (Saito et al., 2003) (Figure 2). Longtemps associée à de la mort cellulaire, on suppose aujourd'hui que la forme coccoïde viable serait un mécanisme de survie en cas d'environnements inhospitaliers (manque de nutriments, conditions atmosphériques, pH, pression, réponse

immunitaire,...). Cette forme pourrait notamment assurer la survie de l'organisme à l'extérieur de l'hôte pour ainsi permettre sa transmission dans la population (Cellini, 2014).

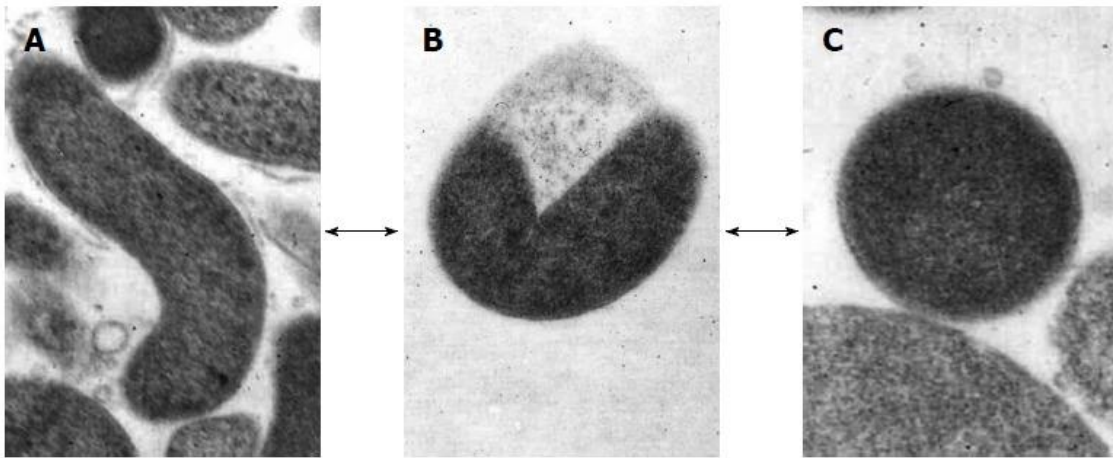


Figure 2: Evolution morphologique d'*Helicobacter pylori*. A : forme Hélicoïdal ; B : forme en U ; C : forme coccoïde. Les flèches indiquent les changements entre les différentes formes. (Cellini, 2014)

3- Les biofilms

Il a été démontré *in vitro* et *ex vivo* que *H. pylori* était capable de générer des biofilms principalement constitués de sucres et d'ADN bactérien (Cotichia et al., 2006 ; Grande et al, 2010). Les différentes études réalisées sur le sujet ont permis de mettre en évidence le potentiel rôle protecteur de ces biofilms lors d'une infection, que cela soit vis à vis de la réponse immunitaire, ou d'un traitement antibiotique (Bessa and al., 2012). Il a également été proposé que les biofilms puissent jouer un rôle non négligeable dans les échanges d'informations génétiques via la conjugaison ou la transformation bactérienne (Grande et al, 2010).

D- Génome d'*Helicobacter. pylori*

Depuis sa découverte en 1984 de nombreuses souches de *H. pylori* ont été séquencées. Le chromosome bactérien, d'une taille approximative de 1.7 Mpb, affiche un pourcentage de G+C de 35 à 40%. Approximativement 90% du génome de la bactérie code pour des gènes. Les 10% restants correspondent à des séquences intergéniques, des ARN stables ou des séquences répétées non codantes. Le génome de la souche 26695 comporte 1627 gènes dont deux copies des gènes ARN 16S, 23S et 5S ainsi que plusieurs éléments mobiles (Alm et al., 1999). Environ 50% des souches de *H. pylori* isolées de patients possèdent un ou plusieurs plasmides cryptiques qui ne semblent coder ni pour des gènes de résistance ni pour des facteurs de virulence.

II- Infection et pathogenèse

A- Prévalence et mode d'infection

La prévalence de l'infection à *H. pylori* est inversement corrélée à la situation socio-économique de la population (Malaty et Graham, 1994). Ainsi 80% de la population de certains pays en développement est infectée par *Helicobacter pylori* contre moins de 40% dans les pays développés. Le mécanisme exact d'infection par lequel *H. pylori* est acquis demeure inconnu. Les hôtes naturels de *H. pylori* sont l'humain et certains primates non humains. Bien qu'il n'existe aucune preuve concluante de l'existence d'une transmission zoonotique, *H. pylori* a pu, dans de rares cas, être isolé chez des animaux de compagnie (Dore et al., 2001 ; Handt et al., 1994). Les nouvelles infections sont considérées comme étant le résultat d'une transmission interhumaine par voie orale ou fécale-orale. Il est généralement admis que l'acquisition survient pendant la petite enfance probablement via les membres proches de la famille.

B- L'infection par *Helicobacter pylori*

Après avoir pénétré dans un nouvel hôte, *H. pylori* va s'établir au niveau de la muqueuse gastrique. Installée dans la couche de mucus protectrice, la bactérie va sécréter de l'uréase afin de contrer l'acidité de l'estomac et ainsi créer un microenvironnement propice à son développement (Weeks et al., 2000). La colonisation par *H. pylori* entraîne toujours une réponse du système immunitaire. Cette réponse se traduit notamment par une inflammation au niveau de la muqueuse gastrique cliniquement nommée gastrite aigue. Bien que *H. pylori* induise une gastrite chez tous les individus infectés, seule une minorité d'entre eux affiche les signes cliniques de cette colonisation. La réaction immunitaire n'est malheureusement pas suffisante pour éliminer toute trace de la bactérie. Ainsi toute personne infectée par *H. pylori* demeurera infectée à vie en absence de traitement. L'infection est alors persistante et la gastrite devient chronique (Graham et al, 2004).

C- Les pathologies causées par *H. pylori*

Une fois que la colonisation est devenue persistante, la pathologie peut évoluer avec le temps vers un ulcère (15% des cas) ou un cancer de l'estomac (1% des cas) (figure 3). L'évolution vers l'une de ces deux pathologies semble être déterminée par le niveau d'acide sécrété par l'individu infecté (Kusters et al., 2006).

1- Ulcère

Chez les sujets où la sécrétion d'acide est d'un niveau élevé à normal, *H. pylori* va être cantonné au niveau de l'antra gastrique où peu de cellules sécrétrices d'acide sont présentes. Dans ce cas, la pathologie aura tendance à évoluer vers un ulcère gastrique ou un ulcère du duodénum selon la zone où l'inflammation est la plus sévère. *H. pylori* est ainsi responsable de 85% des ulcères gastriques et 95% des ulcères duodénaux (Kusters et al., 2006).

2- Cancer de l'estomac

Chez les sujets où la sécrétion d'acide est diminuée, *H. pylori* va pouvoir envahir le corps gastrique et ainsi être en contact rapproché avec la muqueuse. L'inflammation chronique va causer une atrophie et une métaplasie de la muqueuse gastrique augmentant le risque d'adénocarcinome gastrique. Il est estimé que la colonisation par *H. pylori* augmente le risque de cancer de l'estomac d'un facteur 10. L'infection à *H. pylori* est également la première cause de développement du lymphome du MALT de l'estomac. Si le mécanisme à l'origine de la survenue du lymphome par la bactérie demeure inconnu, il est cependant démontré que l'éradication de *H. pylori* permet d'augmenter fortement le taux de rémission (Zullo et al., 2010). La bactérie est aujourd'hui classée comme un carcinogène de groupe 1 par l'organisation mondiale de la santé.

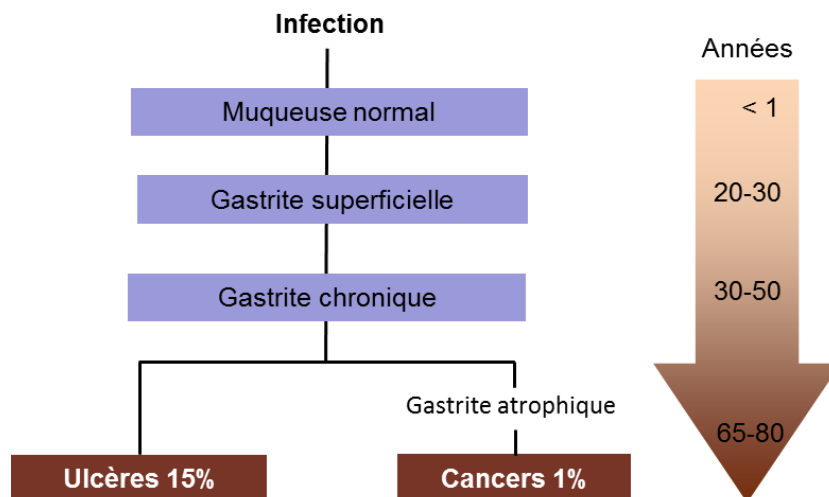


Figure 3 : Evolution de la pathologie causée par l'infection à *H. pylori*. La pathologie évolue au cours du temps.

3) Autres pathologies

L'infection par *H. pylori* est également associée à d'autres pathologies extra gastriques telles que l'anémie ferriprive (Huang et al., 2010) ou le purpura thrombopénique idiopathique

(Asashi et al., 2008). A l'heure actuelle, le mode d'action par lequel la bactérie influencerait sur l'évolution de ces pathologies demeure indéterminé. Cependant, il a été clairement démontré que l'éradication d'*Helicobacter pylori* chez les patients souffrant de ces pathologies menait à une amélioration significative de leur état. L'existence d'un lien de cause à effet entre la présence de *H. pylori* et la survenue d'autres pathologies (lymphomes autres que le lymphome du MALT, cancer colorectal, diabète, maladie de peau,...) a été proposée à de nombreuses reprises par différentes études sans qu'aucune preuve solide ne puisse pour le moment être apportée.

D- Diagnostic

De nombreuses techniques sont aujourd'hui disponibles pour détecter une infection par *H. pylori*. Dans la majorité des cas on préférera utiliser des tests non-invasifs comme le test respiratoire UreA qui détecte l'activité uréase de *H. pylori* ou un test antigène fécal qui recherche la présence d'antigènes de *H. pylori* à partir d'échantillons de fèces. Une sérologie pour détecter les Ig-G spécifiques de la bactérie peut également être réalisée mais cette dernière méthode ne permet pas de déterminer si l'infection est active. Les approches invasives telles que l'endoscopie sont employées pour obtenir du matériel biopsique tout en évaluant le degré de la pathologie. L'identification de *H. pylori* pourra être réalisée directement par coloration de l'échantillon de biopsie. La bactérie pourra par la suite être cultivée en laboratoire si des tests de résistance à certains antibiotiques doivent être réalisés. Les techniques de FISH et de PCR peuvent également être utilisées comme méthodes diagnostiques. Le FISH permet de détecter *H. pylori* par hybridation, directement sur l'échantillon de biopsie, d'une sonde d'ADN fluorescente spécifique d'une séquence d'ADN de la bactérie. La technique de PCR est réalisée sur des extraits d'ADN totaux issus d'échantillons de salive, fèces ou de biopsie. Bien que extrêmement sensible et spécifique, le diagnostic par PCR peut donner de faux positifs si des contaminations surviennent (pour revue, voir Testerman et Morris, 2014).

E- Traitement

Bien que *H. pylori* soit sensible à de nombreux antibiotiques *in vitro*, l'utilisation d'une monothérapie *in vivo* ne permet pas une éradication de la bactérie. La clarythromycine, qui est l'antibiotique le plus efficace sur *H. pylori*, n'offre ainsi qu'un taux d'éradication de 40% en monothérapie. Le manque d'efficacité de ces monothérapies est principalement dû à l'environnement composant la niche de la bactérie (faible pH, mucus). Les recommandations actuelles consistent donc en une trithérapie constituée de deux antibiotiques (AB) et d'un inhibiteur de pompe à protons (IPP). Selon les pays, cette trithérapie peut être modifiée en quadrithérapie par ajout du métal lourd bismuth. Le mode d'action exact de cette molécule n'étant pas encore clairement établi, elle demeure interdite d'utilisation dans certains pays. Après avoir été interdit à la fin des années 70, l'utilisation du bismuth est de nouveau autorisée en France depuis 2013. Le dernier type de traitement utilisé est une thérapie séquentielle composée d'une bithérapie (AB + IPP) pendant 5 jours suivi d'une trithérapie (IPP + 2AB) pendant 5 à 10 jours. Les molécules majoritairement utilisées dans toutes ces thérapies sont les tétracyclines, amoxicillines, imidazoles (métronidazoles) et certains macrolides (clarythromycine). L'application de ces différentes thérapies permet un taux d'éradication de 70 à 80%. Toutefois, le nombre de souches résistantes aux antibiotiques et notamment vis-à-vis de la clarythromycine et du métronidazole n'a cessé d'augmenter au cours de ces dernières années. Cette augmentation est probablement due à l'utilisation de ces antibiotiques dans le traitement d'autres pathologies, et à la haute variabilité génétique de la bactérie (Papastergiou, Georgopoulos and Karatapanis, 2014).

III- Variabilité génétique de *H. pylori*

Helicobacter pylori est une espèce bactérienne dont le génome est l'un des plus variables (Suerbaum et Josenhans, 2007 ; Go et al., 1996) (Tableau 1). Cette importante variabilité serait un moyen pour la bactérie de s'adapter spécifiquement à l'individu infecté ainsi qu'aux changements de son microenvironnement.

Bactérie	Nombre moyen d'allèles par locus	Diversité moyenne
<i>Helicobacter pylori</i>	11,2	0,735
<i>Borrelia</i> (espèce)	5,9	0,673
<i>Mycobacterium</i> (espèce)	NA	0,580
<i>Haemophilus influenzae</i>	2,4	0,467
<i>Listeria monocytogènes</i>	3,6	0,424
<i>Streptococcus pneumonia</i>	3,9	0,413
<i>Legionella pneumophila</i>	3,2	0,312

Tableau 1 : Diversité génétique de différentes espèces bactériennes (D'après Go et al., 1996). La détection du nombre moyen d'allèles par locus a été réalisée par « multilocus enzyme electrophoresis »

A- Polymorphisme nucléotidique

Tout d'abord *H. pylori* affiche une forte microdiversité avec une fréquence d'apparition des mutations spontanées de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} (Bjorkholm et al., 2001). Ce niveau de mutation est semblable au niveau observé pour des souches d'*Escherichia coli* dénuées de mismatch repair (MMR). Ce phénotype s'explique par le fait que *H. pylori* ne possède pas les gènes essentiels dans la réparation des mésappariements générés lors de la réplication (MMR) ainsi que certaines enzymes impliquées dans la voie de réparation par excision de base (BER) (Pinto et al., 2005 ; Mathieu et al., 2006). Il a également été démontré que l'ADN polymérase I, qui est impliquée dans la réplication et la réparation, contribue probablement à la plasticité du génome bactérien de par son absence d'activité proof-reading (Garcia-Ortiz et al., 2011).

La survenue de ces mutations ponctuelles peut non seulement altérer l'activité d'une séquence promotrice ou même la fonctionnalité de la protéine codée mais également abolir complètement l'expression de certains gènes. En effet, *H. pylori* possède des gènes à phase variable, c'est-à-dire des gènes dont l'expression est régulée par des séquences répétées hyper-mutables. L'addition ou délétion de nucléotides par « frameshift » dans ces séquences permet ainsi d'éteindre ou d'allumer l'expression de ces gènes.

B- Réarrangements chromosomiques

H. pylori possède également une importante macrodiversité reposant principalement sur la recombinaison homologe. Il a en effet été démontré, par utilisation du test d'homoplasie, que *H. pylori* affiche une fréquence de recombinaison très supérieure aux autres espèces bactériennes (Suerbaum et al., 1998) (Tableau 2). Cette libre recombinaison permet non seulement des réarrangements chromosomiques importants mais également l'acquisition de séquences exogènes et la propagation de polymorphismes nucléotidiques par transferts horizontaux.

Bactérie	Nombre de gènes étudiés	Rapport d'homoplasie
<i>Helicobacter pylori</i>	6	0,68
<i>Neisseria meningitidis</i>	11	0,34
<i>Escherichia coli</i>	4	0,26

Tableau 2 : Test d'homoplasie chez différentes espèces bactériennes. Pour une population clonale le rapport d'homoplasie est égal à zéro alors que si la recombinaison est libre ce rapport est égal à 1. (Suerbaum et al., 1998)

1- Réorganisation du génome

En 1998, Alm et ses collègues réalisent une étude comparative des séquences d'ADN des souches J99 et 26695 (Alm et al., 1998). Il est ainsi apparu qu'il fallait transposer ou inverser 10 segments d'ADN de 1 à 83 kb afin d'aligner les séquences homologues des deux génomes. Une observation similaire a été faite pour la souche HPGA1 (Linz et Schuster., 2007). Ces résultats reflètent le très haut niveau de réarrangements chromosomiques dont est capable *H. pylori*.

2- Transferts horizontaux d'ADN

H. pylori possède un nombre de gènes extrêmement variable en fonction des souches analysées. On estime ainsi que 5 à 18% des gènes de la bactérie sont des gènes spécifiques de souches. Cette très importante variation du nombre de gènes est indicative d'un transfert horizontal de matériel génétique entre les différentes souches de *H. pylori* lors de l'infection (Falush et al., 2001). Chez les bactéries, un tel transfert d'ADN peut être réalisé via trois mécanismes que sont : la conjugaison, la transduction et la transformation (Figure 4).

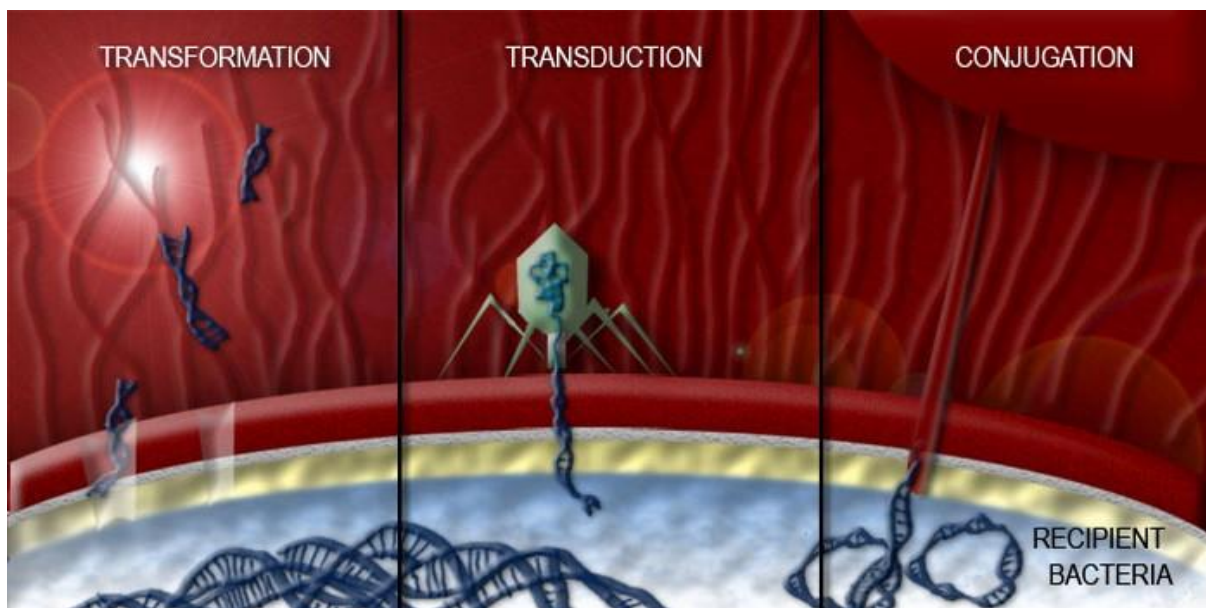


Figure 4: Transformation, transduction et conjugaison. La transformation implique l'internalisation de fragments d'ADN nu par des bactéries naturellement compétentes. La transduction implique le transfert d'ADN d'une bactérie à une autre via des bactériophages. La conjugaison implique le transfert de matériel génétique via des pili sexuels et requiert le contact entre les cellules. (Antimicrobial resistance learning site)

- La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de transfert d'ADN entre deux cellules bactériennes. Lors de ce phénomène, une bactérie donneuse va transférer un plasmide à une bactérie receveuse via un complexe protéique appelé pilus de conjugaison. En 1998, Kuipers et al démontrent l'existence chez *H. pylori* d'un mécanisme permettant le transfert horizontal d'ADN chromosomique selon un phénomène résistant aux désoxyribonucleases (DNases) et nécessitant un contact physique entre les cellules. Plus récemment, une étude a démontré que *H. pylori* pouvait transférer son ADN à une souche de *Campylobacter jejuni* toujours selon un mécanisme résistant au traitement DNase, nécessitant un contact entre cellules, et que ce processus n'impliquait pas le complexe de transformation du receveur (Oyarzabal et al., 2007). Enfin, un travail réalisé sur les plasmides cryptiques pHel4 et pHel12 a démontré que ces derniers pouvaient être transférés par transformation mais également par conjugaison (Rohrer et al., 2012). Bien que la caractérisation du mécanisme impliqué dans ces transferts n'ait pas encore été réalisée, l'existence d'un mécanisme de type conjugaison semble fort probable. Ce dernier pourrait alors jouer un rôle important dans la génération de la variabilité génétique de la bactérie.

- La transduction

La transduction est le transfert de matériel génétique entre deux bactéries par l'intermédiaire d'un vecteur viral. Les données concernant les mécanismes de transduction chez *H. pylori* sont pour l'heure extrêmement limitées. En effet, les rares travaux existants traitent principalement de l'observation des bactériophages et/ou de leur caractérisation. Le premier et seul exemple de transduction chez *H. pylori* a été décrit en 2012. Lors de cette étude, Luo et ses collègues sont parvenus à isoler un bactériophage tempéré qu'ils ont nommé 1961P (Luo et al., 2012). Outre la caractérisation génétique et structurale du virus, ils ont testé la capacité du phage à transférer des séquences d'ADN entre souches de *H. pylori*. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que 1961P était capable de récupérer une séquence d'ADN codant pour un gène de résistance au chloramphénicol au sein du génome de *H. pylori* et de le transférer dans une autre souche de la bactérie. Bien que notre connaissance des bactériophages infectant *H. pylori* soit à l'heure actuelle limitée, on peut tout de même imaginer que d'autres phages sont capables de réaliser une transduction similaire et que cette dernière pourrait jouer un rôle dans les échanges de matériel génétique entre bactéries.

- La transformation naturelle

La transformation est un mécanisme biologique permettant la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène dans le génome de la bactérie. *H. pylori* étant naturellement et constitutivement compétente pour la transformation, cette dernière joue un rôle clé dans la diversité génétique de la bactérie. Ce sujet sera traité plus en détail dans les chapitres 2 et 3.

Deuxième partie : La transformation bactérienne

I- La transformation bactérienne

A- Découverte de la transformation bactérienne

En 1928, Fred Griffith publie une étude démontrant que, après inoculation dans des souris, des cellules de *Streptococcus pneumoniae* encapsulées mais préalablement tuées par choc thermique (S) pouvaient transférer leur capacité à produire des capsules à d'autres cellules de *S.pneumoniae* vivantes mais non encapsulées (R). Griffith propose donc l'existence d'un processus biologique qui permet le transfert entre cellules d'une enzyme productrice de capsules. Il nomme ce phénomène « la transformation » (Griffith., 1928). Les résultats de Griffith sont reproduits par d'autres groupes de recherche au cours des années qui suivent. Ainsi, en 1931 Dawson et Sia parviennent à induire la transformation directement dans des cultures bactériennes (Sia et Dawson, 1931). En 1932, Alloway parvient à induire la transformation à partir de lysats de cellules bactériennes (S) filtrés de tous composants membranaires, démontrant ainsi que le matériel de transformation soluble était tout aussi efficace pour induire la transformation que des cellules entières (Alloway, 1932). En 1944, Avery, MacLeod et McCarty ont caractérisé les molécules composant la fraction liquide d'Alloway qui était responsable de la transformation. Étonnamment, les analyses réalisées montrent que le lysat contenait presque essentiellement des acides désoxyribonucléiques polymérisés. Ils proposent donc que l'élément à l'origine du principe de la transformation et du transfert de trait soit l'ADN (Avery et al., 1944). Cette découverte ne fut pas seulement une étape majeure dans la compréhension de la transformation bactérienne mais également dans le développement de la génétique moderne. En effet, l'expérience d'Avery, MacLeod et McCarty fut la première étude faisant de l'ADN le vecteur de l'hérédité. Soixante et onze ans plus tard nos connaissances de la transformation bactérienne ont considérablement évoluées. On dénombre aujourd'hui plus de 80 espèces bactériennes naturellement transformables et également réparties entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Tableau S1). Les différentes étapes des processus de capture, internalisation et intégration ont été analysées pour de nombreux modèles. Et des méthodes de transformation artificielle ont même été développées faisant de cette dernière le cheval de bataille de la biologie moléculaire moderne.

B- Pourquoi les bactéries transforment-elles ?

Les raisons pour lesquelles les bactéries transforment de l'ADN demeurent encore aujourd'hui controversées. Trois modèles non mutuellement exclusifs pourraient expliquer la raison d'être évolutive de ce mécanisme.

- Le premier modèle envisage l'utilisation de l'ADN internalisé comme source de carbone, azote et phosphore. Cette hypothèse est largement débattue par la communauté scientifique, les différents arguments apportés n'étant pas suffisamment concluants. En effet, la majorité des études supportant cette hypothèse ont mesuré le niveau de compétence des bactéries après modification du pool de nucléotides composant le milieu. Si une telle modification du pool de nucléotides permet une induction de la compétence chez *Haemophilus influenza* et *Bacillus subtilis*, il induit un stress réplcatif chez *Streptococcus pneumoniae* et le système SOS chez *Escherichia coli* (Sinha et al., 2013 ; Redfield, 2001 ; Foster, 2005). Le fait que *comEB*, un gène impliqué dans le recyclage des nucléotides, soit localisé dans l'opéron dédié à la transformation chez *B. subtilis* a également été un argument avancé pour soutenir le rôle de la transformation dans la nutrition (Redfield, 2001). Cependant, l'analyse de l'orthologue de *comEB* de *S. pneumoniae* et *H. influenza* montre que ce dernier n'est pas induit lors de la compétence chez ces deux bactéries (Clavery et al., 2006). On peut également se demander pourquoi un mécanisme impliqué dans la nutrition serait régulé de manière aussi stringente puisque se nourrir est une nécessité de tous les instants? De plus l'existence chez certaines espèces bactériennes, comme *V. cholerae*, de voies d'import de nucléotides pour la nutrition contredit ce rôle (Blokesch et Schoolnik, 2008). Il semble en effet contre intuitif pour une espèce de développer deux mécanisme biologiques différents pour atteindre un but identique. Il apparait ainsi assez difficile de conclure d'un point de vue universel quant au rôle de la transformation dans la nutrition.

- Le second modèle propose que l'ADN internalisé puisse être utilisé dans la réparation des dommages à l'ADN. Dans ce modèle, des séquences d'ADN provenant d'espèces bactériennes proches ou identiques pourraient servir de matrice pour réparer des lésions par recombinaison homologue. Des études ont été réalisées chez *B. subtilis* pour tenter de déterminer si la bactérie pouvait utiliser l'ADN transformé comme matrice de réparation. Bien que les résultats obtenus aient laissé suggérer l'existence d'une relation entre la transformation et la survie après irradiation par ultraviolets (UV), aucune preuve convaincante ne put être apportée (Michod et al., 1987 ; Hoelzer et Michod, 1991 ; Redfield, 2001). De

plus, une étude similaire a été réalisée sur *H. influenza* sans qu'aucun lien entre transformation et réparation ne puisse être observé (Mongold, 1992). En outre, on peut se demander pourquoi la compétence n'est-elle pas systématiquement régulée par les dommages à l'ADN si la réparation est une de ses fonctions primaires. En effet, alors que la compétence est induite après exposition à des stress génotoxiques tels que des UV ou des antibiotiques chez *S. pneumoniae* et *L. pneumophila*, elle ne l'est pas chez *B. subtilis* et *H. influenza* (Charpentier et al., 2012). Tout comme pour la nutrition, le manque de démonstrations concluantes et les contradictions entre les différents modèles d'études ne nous permettent pas de conclure quant à la validité de ce modèle.

- La dernière raison pour laquelle les bactéries transforment de l'ADN est pour augmenter leur diversité génétique. Alors que la nutrition et la réparation amènent un avantage immédiat à la bactérie, la diversité génétique offre un avantage à long terme. En effet, l'acquisition d'informations génétiques potentiellement utiles telles que des facteurs de virulences, des fonctions métaboliques ou des résistances aux antibiotiques pourraient permettre une adaptation rapide dans certaines conditions de stress (densité de population, dommage à l'ADN, famine...). Une étude réalisée sur 1000 générations de *H. pylori* a ainsi pu démontrer que les bactéries compétentes possédaient un avantage évolutif comparé à des cellules non compétentes de par le fait qu'elles étaient capables de s'adapter (fitness) plus rapidement (Baltrus et al., 2008). Une autre étude sur *Acinetobacter baylyi* a mis en évidence que des souches multi-résistantes aux antibiotiques étaient obtenues plus rapidement dans les souches compétentes que dans les souches non compétentes (Perron et al., 2012). Enfin, il a été suggéré à l'issue d'une étude *in silico*, que la transformation pouvait prévenir la détérioration irréversible du génome d'une population présentant une mutagenèse importante (ou « Cliquet de Muller ») par restauration des gènes délétés ou inactivés (Takeuchi et al., 2014). Ainsi, bien qu'il existe de nombreux avantages à la transformation bactérienne, l'augmentation de la diversité génétique demeure pour l'heure la seule fonction évolutive acceptée pour chacun des modèles bactériens.

C- Principe de la transformation bactérienne

La transformation bactérienne est divisée en trois étapes que sont la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène. Bien que les systèmes de capture de l'ADN soient globalement similaires entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, la présence de deux membranes et d'un espace périplasmique impose l'existence de certaines différences. Ces systèmes sont présentés dans la figure 5. Chez les bactéries à Gram positif, l'ADNdb est capturé par un pilus constitué de l'assemblage ordonné de la protéine ComGC. Cet ADNdb est réceptionné par ComEA avant d'être dégradé par une nucléase (EndA chez *S. pneumoniae*) en ADN simple brin. Une fois l'ADNsb généré, il est internalisé dans le cytoplasme via le canal ComEC. Chez les bactéries à Gram négatif, la capture de l'ADN n'est pas un processus continu mais semble être un mécanisme à 2 étapes (Seitz et Blokesch, 2014 ; Stingl et al., 2010). Le pilus dédié à la transformation, qui est constitué de sous unités PilE, traverse la membrane externe via le pore de sécrétion PilQ. Dans un premier temps, le pilus va capturer et transporter l'ADN dans le périplasme au travers de pilQ. Une fois dans le périplasme, l'ADNdb est réceptionné par la protéine ComE où il est dégradé en ADNsb par une protéine inconnue chez les bactéries à Gram négatif. Ce n'est qu'une fois que l'ADNdb est dégradé en ADNsb que la bactérie va pouvoir procéder à la seconde étape qui consiste à transporter l'ADN dans le cytoplasme via le canal ComA. Dans le cytoplasme, l'ADN est traité de manière similaire que ce soit chez les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. L'ADNsb est protégé d'une dégradation par la fixation des protéines Ssb puis DprA et par le recrutement consécutif de la protéine RecA. Cette dernière va polymériser le long de l'ADNsb et permettre l'intégration dans le génome de la bactérie par recombinaison homologue (Johnston et al., 2014) (figure 6A).

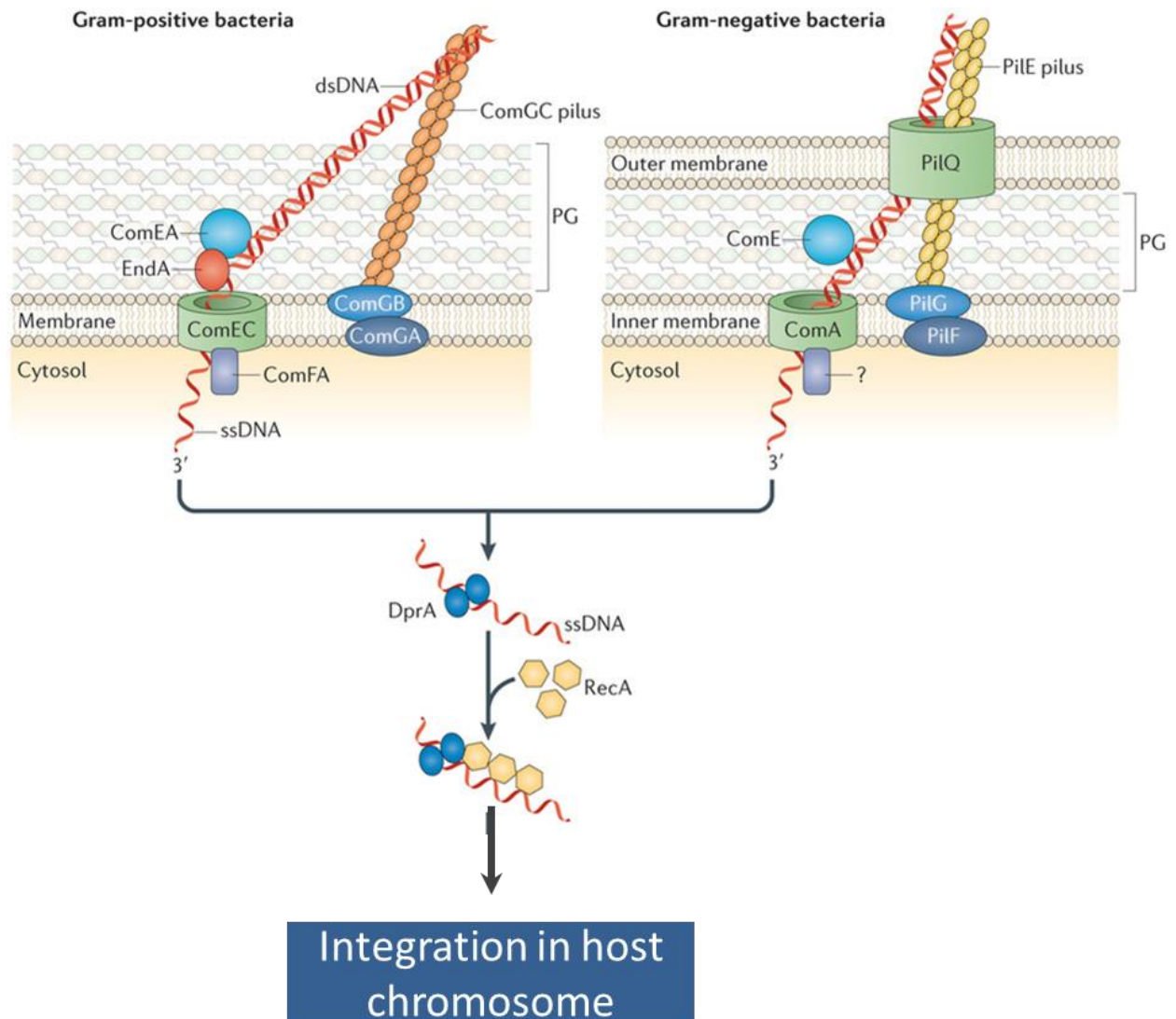


Figure 5: Modèle de la transformation chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Certaines protéines supplémentaires sont nécessaires à la capture de l'ADN (ComGB, ComGA, PilG, PilF). ComFA est une translocase ATPase dépendante uniquement identifiée chez les bactéries du phylum des firmicutes et impliquée dans le passage de l'ADN dans le cytoplasme. PG : peptidoglycane. (Johnston et al., 2014)

D- La Transformation de plasmide

En règle générale, la machinerie d'internalisation ne fait pas le distinguo entre l'ADN chromosomique et l'ADN plasmidique. Le plasmide est capturé sous forme double brin et est transporté dans le cytoplasme en multiples fragments d'ADNsb. Les deux facteurs limitants du transfert de plasmides entre bactéries sont la reconstitution d'un plasmide entier et la présence dans la cellule receveuse d'une machinerie de réplication adaptée au dit plasmide (Lorenz et Wackernagel, 1994). Le processus d'établissement des plasmides dans les cellules bactériennes a été relativement peu étudié mais certains travaux ont tout de même été réalisés chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*. A l'heure actuelle nous disposons de trois modèles de reconstitution de plasmide. Dans le premier modèle, des multimères d'ADNsb seraient internalisés en configuration « head-to-tail ». Le brin complémentaire serait alors synthétisé par la machinerie de réplication de la bactérie et le plasmide serait re-circularisé par hybridation (Figure 6C). Dans un second modèle, il est proposé qu'un des deux brins du plasmide soit internalisé puis qu'à un moment la machinerie d'internalisation change de brin et fasse entrer le brin complémentaire. Les deux brins d'ADNsb s'hybrideraient et se re-circulariseraient pour reformer un plasmide entier (Kidane et al., 2012). Il est toutefois possible que les brins d'ADN internalisés soient trop courts pour pouvoir reconstituer une molécule entière. On suppose dans ce cas, que les fragments d'ADNsb recombinent entre eux afin de former une molécule partiellement hybridée de pleine taille, qui peut alors être répliquée (Figure 6D) (Kidane et al., 2009). Outre ces trois modèles, un plasmide peut être reconstitué par un processus nommé « facilitation ». La transformation par facilitation est un mécanisme qui permet à un plasmide simple brin possédant des séquences homologues avec le chromosome bactérien de s'hybrider sur ce dernier (Figure 6B). Pour ce faire, il est nécessaire que les séquences homologues soient situées aux extrémités de l'ADNsb de part et d'autre de la séquence manquante. Une fois hybridé, le brin envahissant va initier sa réplication en utilisant le chromosome bactérien comme matrice et ainsi combler son « gap ». Les brins envahissants ne sont pas intégrés et les molécules d'ADN chromosomiques et plasmidiques sont séparées tandis que le plasmide réplique le brin complémentaire manquant (Lopez et al., 1982).

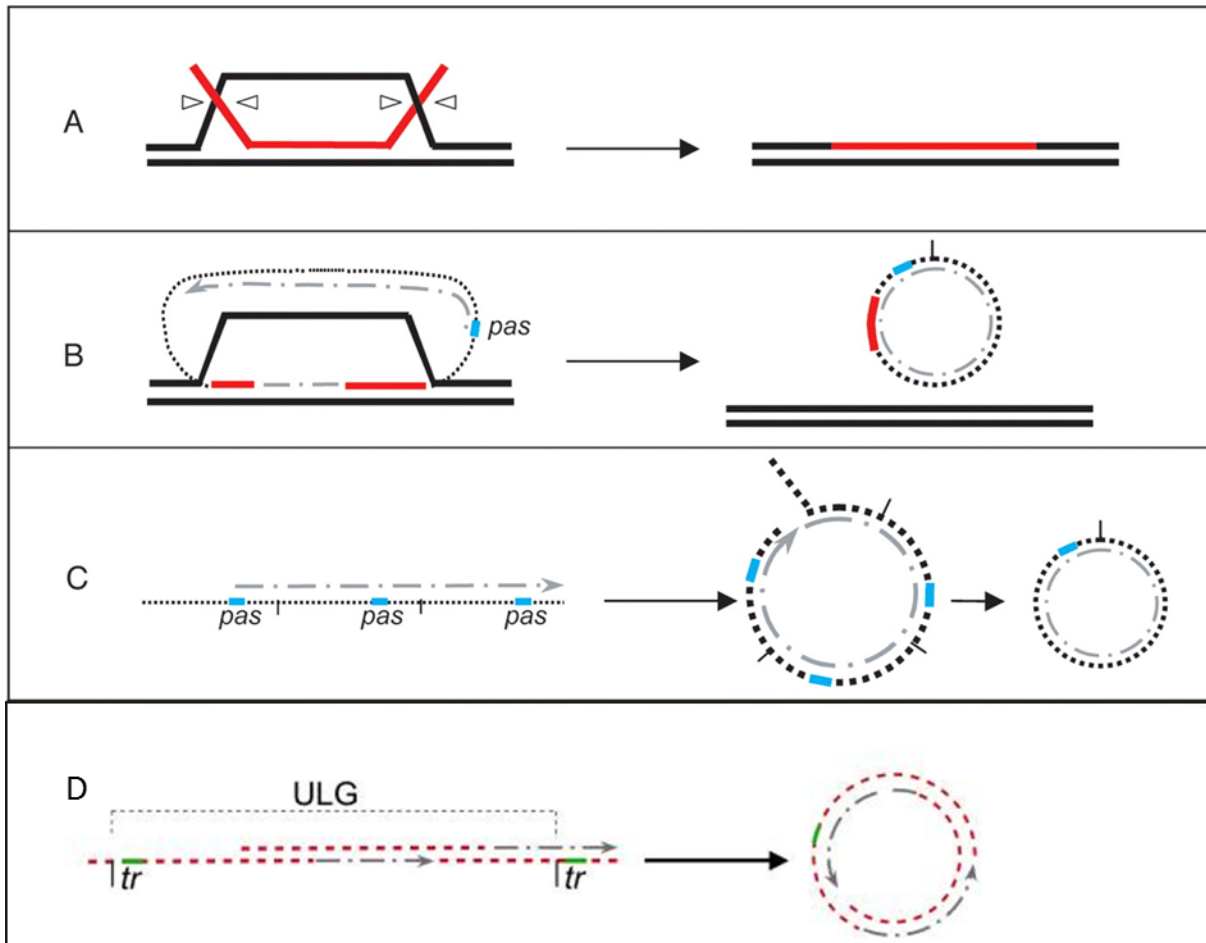


Figure 6 : Modèle de transformation naturelle de différents substrats d'ADN. A) transformation chromosomique. Le substrat est un brin d'ADNs b d'origine chromosomique ou plasmidique B) Transformation de plasmide par facilitation. C) Transformation plasmidique. Pas : site d'initiation de la réplication. D) Reconstitution d'un plasmide de pleine taille par recombinaison des fragments d'ADNs b. ULG : unit length plasmid genome (Kidane et al., 2012).

E- La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un mécanisme permettant un échange entre deux molécules d'ADN homologues ou homéologues. Chez les bactéries, la recombinaison homologue possède deux fonctions. Elle permet l'intégration d'ADN exogène dans le génome et elle permet de réparer certaines lésions de l'ADN. Les dommages principalement réparés par ce mécanisme sont des cassures d'ADN simple-brin et des cassures d'ADN double-brin. Le mécanisme par lequel se produit la recombinaison homologue est toujours dépendant de la protéine RecA mais les médiateurs impliqués dans le recrutement de cette dernière varieront en fonction du type de substrat (Figure 7). Dans le cas d'une réparation de cassure simple-brin, le complexe RecFOR va venir se fixer à la jonction ADNs b/ADNdb et va permettre la polymérisation de RecA le long du filament d'ADNs b. Le nucléofilament formé, va alors

pouvoir détecter les séquences homologues et initier l'échange de brins (Michel et al., 2007). Dans le cas d'une cassure double-brin, c'est le complexe AddAB (ou RecBCD selon l'espèce bactérienne) qui va se fixer aux extrémités de la cassure et va entamer une étape de dégradation de l'ADN. Après rencontre d'un site spécifique nommé Chi, la dégradation du brin 3' va cesser produisant la création d'une extrémité 3' sortante. RecA va se fixer et polymériser sur cette extrémité et initier la recombinaison avec la séquence homologue (Dillingham et Kowalczykowski, 2008). Il convient de noter que les sites Chi n'ont été identifiés que pour un petit nombre d'espèces bactériennes. Dans le cas de l'intégration d'une séquence d'ADN exogène lors de la transformation, le médiateur, qui va permettre le recrutement de RecA n'est pas AddAB ou RecFOR mais un autre médiateur nommé DprA (Mortier-Barrière et al., 2007). DprA est une protéine dimérique indispensable à la transformation bactérienne (Quevillon-Cheruel et al., 2012). Bien que DprA soit conservée dans 84% des 317 génomes bactériens séquencés en juin 2006, toutes ces espèces ne sont pas compétentes ou du moins n'ont pas encore été démontrées comme telles (Mortier-Barrière et al., 2007). Mis à part son rôle dans le recrutement de RecA, DprA est également impliquée dans la protection de l'ADN et semble capable de stimuler l'activité des méthylases (Bergé et al., 2003 ; Dwivedi et al., 2013).

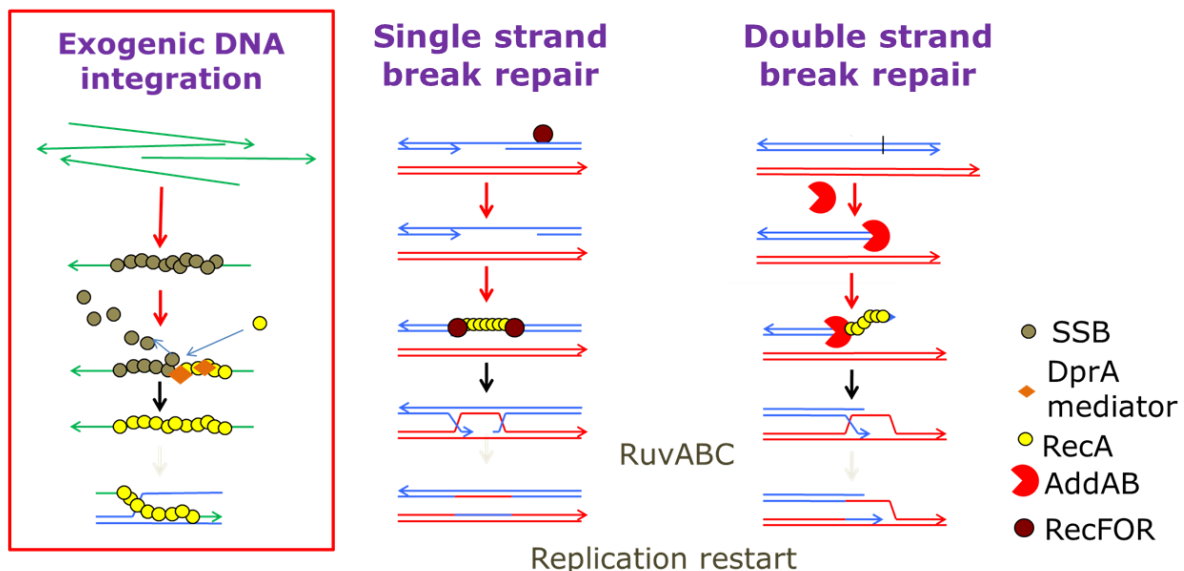


Figure 7: Modèle de la recombinaison homologue chez les bactéries. L'échange de brins d'ADN mènera à la création d'une structure en jonction de Holiday. Cette structure sera résolue par le complexe RuvABC

F- Limitation de la transformation par les mécanismes biologiques.

Bien que l'acquisition de nouveaux gènes offre un avantage indéniable d'un point de vue évolutif, cela comporte également certains risques. Une intégration incontrôlée de séquences d'ADN hétérologues pourrait notamment finir par menacer l'intégrité du génome bactérien. Pour diminuer ce risque, les bactéries disposent de certains outils qui permettent de limiter l'intégration de séquences hétérologues pour privilégier les séquences d'ADN provenant d'espèces bactériennes proches ou identiques. Ces mécanismes, qui ne sont pas toujours bien compris, varient en fonctions des espèces bactériennes.

- Le premier mécanisme limitant la transformation est la reconnaissance des séquences DUS (DNA Uptake Sequence). Ces séquences DUS sont des séquences nucléotidiques spécifiques dispersées le long du chromosome de certaines espèces bactériennes telles que *Haemophilus influenza* ou *Neisseria gonorrhoeae* et qui sont reconnues par des récepteurs situés à la surface de la bactérie (Voir chapitre III). Le seul récepteur à avoir été identifié à ce jour est la piline mineure ComP de *N. gonorrhoeae* (Cehovin et al., 2013). Ainsi, un ADN qui ne possède pas la séquence DUS correcte ne pourra être transformé par la bactérie. Bien que certaines séquences soient partagées par plus d'une espèce bactérienne, les DUS permettent en général de restreindre la transformation à des fragments d'ADN de la même espèce (Chen et Dubnau, 2004).

- Le second mécanisme qui permet de limiter la transformation naturelle est le système de restriction-modification (R/M). Les systèmes R/M sont composés de deux enzymes. La première est une enzyme de restriction qui va cliver de petites séquences nucléotidiques spécifiques situées sur des ADNdb non méthylés. La deuxième est une méthylase qui va méthyliser l'ADN double brins chromosomique afin de protéger ce dernier de l'action de l'enzyme de restriction. Ces systèmes sont présents dans 90% des génomes bactériens séquencés et ont été historiquement décrits comme un moyen pour la bactérie de se protéger contre les bactériophages par destruction de l'ADN infectieux (Roberts et al, 2009). Il est aujourd'hui admis que ces systèmes de R/M peuvent également limiter le transfert de séquences d'ADN hétérologues de façon plus ou moins importante en fonction des espèces bactériennes. Bien que certains modèles aient été proposés, le mode exact d'action de ces enzymes et l'étape à laquelle elles interviennent demeurent inconnus. (Johnston et al., 2013).

II- La transformation chez les bactéries à Gram positif

La transformation bactérienne chez les bactéries à Gram positif a principalement été étudiée chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. Ces deux espèces partagent énormément de caractéristiques communes vis à vis de la transformation mais cependant certaines différences existent.

A- Le processus d'internalisation

Pour les deux espèces bactériennes, l'ADN capturé est séquence indépendante. Lors de la capture, l'ADN est fragmenté en des fragments d'ADNdb d'une taille approximative de 6kb pour *S. pneumoniae* et 13.5 à 18kb pour *B. subtilis* (Lorenz et Wackernagel, 1994 ; Dubnau, 1999). Une fois capturé, l'ADNdb est dégradé en ADNsb par une nucléase. Les produits de la dégradation sont relâchés dans le milieu extracellulaire sous forme de bases libres pour *B. subtilis* et d'oligonucléotides pour *S. pneumoniae*. Chez *S. pneumoniae*, l'ADNsb est transporté dans le cytoplasme selon une polarité 3'→5' alors que le brin complémentaire est dégradé selon une polarité 5'→3'. Les vitesses de dégradation et de transport d'une molécule unique d'ADN ont été déterminées et apparaissent être similaires (90-100 nt/s à 31°C) (Mejean et Claverys, 1993). Cette similarité suggère un couplage entre le transport d'un brin et la dégradation de l'autre. Aucune polarité d'entrée n'a été déterminée pour *B. subtilis* mais la vitesse d'entrée de l'ADN a été estimée à 80nt/s à 37°C (Maier et al., 2004). La taille moyenne des fragments d'ADN intégrés chez *B. subtilis* est d'environ 8.5kb contre 6.3kb pour *S pneumoniae* (Lorenz et Wackernagel, 1994 ; Croucher et al., 2011).

B- La machinerie d'internalisation

La machinerie d'internalisation des bactéries à Gram positif (voir figure 5) a principalement été caractérisée chez *B. subtilis* avec quelques études complémentaires chez *S. pneumoniae*. Le pseudopilus dédié à la transformation est évolutivement associé à la famille des pili de type 4 et est majoritairement constitué des protéines ComGC mais également, en proportion plus restreinte, des protéines ComGD, ComGE et ComGG. Les pili de type IV sont majoritairement impliqués dans les interactions entre cellules bactériennes, l'adhésion aux cellules hôtes et la mobilité. Le pseudopilus serait capable de capturer l'ADN libre dans le milieu extracellulaire et de lui faire traverser le peptidoglycane. En dépit du manque de preuves expérimentales, on suppose que le passage de l'ADN s'effectuerait par la

rétractation du pilus (Chen et Dubnau, 2004). La nucléase EndA, qui est associée à la dégradation de l'ADNdb en ADNsb, a uniquement été identifiée chez *S. pneumoniae* (Mejean et Clavery, 1993). De la même manière, la nucléase NucA qui est une endonucléase de surface impliquée dans le clivage de l'ADNdb a été identifiée chez *B. subtilis* mais pas chez *S. pneumoniae* (Provvedi et al., 2001). NucA serait impliquée dans la création d'une extrémité libre sur l'ADNdb afin de faciliter la prise en charge de l'ADN par la machinerie de translocation. Des études par microscopie à fluorescence suggèrent que la machinerie d'internalisation est localisée au milieu de la cellule chez *S. pneumoniae* et au pôle chez *B. subtilis* (Figure 8) (Bergé et al., 2013 ; Hahn et al., 2005).

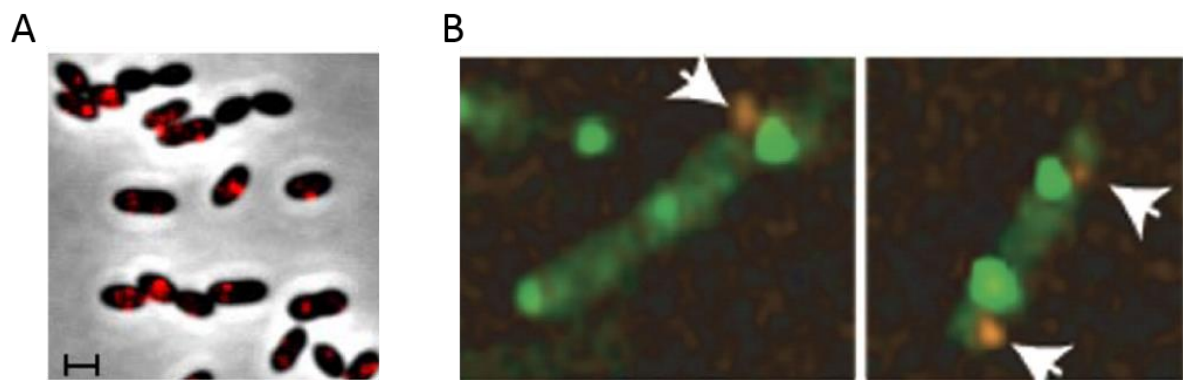


Figure 8: Localisation de la capture d'ADN fluorescent chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. A) L'ADN fluorescent en rouge localise principalement au milieu des cellules chez *S. pneumoniae*. (Bergé et al., 2013) B) L'ADN fluorescent en rouge localise principalement aux pôles des cellules chez *B. subtilis*. Le signal vert correspond à la fluorescence fournie par ComGA-GFP. (Hahn et al., 2005)

C- La régulation de l'entrée en compétence

S. pneumoniae et *B. subtilis* sont deux espèces bactériennes naturellement transformables mais pas constitutivement compétentes. En effet, *B. subtilis* devient compétente uniquement pendant sa phase stationnaire et *S. pneumoniae* uniquement durant sa phase exponentielle. Chez cette dernière, la compétence se développe de manière simultanée dans à peu près toutes les cellules bactériennes, dure 15 min puis disparaît rapidement (Claverys et al., 2006). Chez *B. subtilis* la compétence se développe lentement et uniquement chez 10% à 20% des cellules de la culture (Maamar et Dubnau, 2005). L'entrée en compétence de ces deux bactéries est dépendante de l'activation du régulon de compétence comprenant les gènes nécessaires à la transformation (Figure 9). L'activation de ces régulons est, pour les deux bactéries, déclenchée par la sécrétion et la détection d'un peptide. Dans le

cas de *S. pneumoniae*, c'est un petit peptide de compétence de 17 acides aminés appelé CSP (codé par ComC), pour « Competence Stimulating Peptide », qui est sécrété pendant la phase exponentielle. La fixation de ce peptide sur la protéine ComD va entraîner l'autophosphorylation de cette dernière et le transfert d'un phosphate à un régulateur partenaire nommé ComE. Ce dernier va alors activer l'expression de *comX* qui est le facteur sigma régulant l'expression des gènes de compétence chez *S. pneumoniae*. Chez *B. subtilis* le facteur de compétence est d'abord synthétisé sous une forme inactive de 55 acides aminés avant d'être clivé et sécrété. Le peptide qui ne fait alors plus que 10 acides aminés va stimuler ComP qui va alors céder un phosphate à son partenaire ComA. ComA-P va activer la transcription de *comS*, ce qui va permettre l'accumulation de ComK, l'activateur transcriptionnel des gènes de compétence (Clavery et al., 2006).

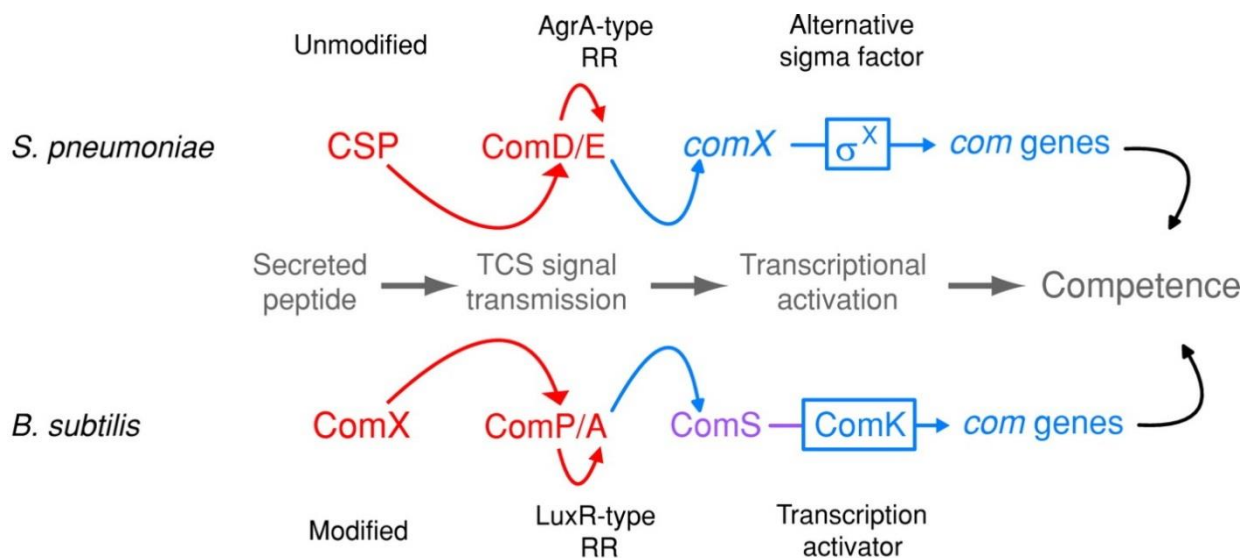


Figure 9: Induction de la compétence chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. Les gènes *com* comprennent les gènes impliqués dans l'internalisation et l'intégration de l'ADN exogène. En rouge : voies de signalisation entre cellules. En bleu : contrôle transcriptionnel. En mauve : Contrôle post-transcriptionnel. (Claverys et al., 2006)

D- L'entrée en compétence chez *S. pneumoniae* : un quorum sensing?

Le quorum sensing (QS) est un phénomène biologique permettant une régulation synchronisée de l'expression de gènes particuliers au sein d'une population bactérienne en fonction de la densité de cette population. Ce phénomène repose sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles via l'utilisation de molécules signal. Les systèmes d'induction de la transformation de *S. pneumoniae* et *B. subtilis* ont donc souvent été considérés dans la

littérature comme un exemple de quorum sensing. (Waters et Bassler, 2005). Cet état de fait, vis-à-vis de *S. pneumoniae*, a cependant été remis en cause par Claverys et ses collègues dans une revue parue en 2006 (Claverys et al., 2006). En s'appuyant sur des résultats présentés dans cette revue, ils démontrent que chez *S. pneumoniae* l'induction de la compétence après un choc alcalin se produit toujours 40 à 45 min après inoculation et cela indépendamment de la densité de la population. Il semble de plus possible que le niveau de CSP dans le milieu extracellulaire ne soit pas uniquement le résultat de l'augmentation de la population bactérienne. En effet, on sait aujourd'hui que des blocages de la fourche de réplication induisent une augmentation du nombre de copies de l'opéron *comCDE* par cellule et donc une augmentation du niveau de CSP (Slager et al., 2014). Puisqu'une molécule qui ne s'accumule pas passivement ne peut être rapporteur d'une population cellulaire, cela signifie que CSP n'est pas toujours impliqué dans un phénomène de quorum sensing.

E- La régulation de la sortie de la compétence

Concernant la sortie de l'état de compétence, les connaissances sont assez limitées. Chez *S. pneumoniae* il a été démontré que la répression des gènes de compétence reposait sur des boucles de rétrocontrôles (figure 10). La première boucle de rétrocontrôle implique la protéine ComE. Lors de sa phosphorylation, ComE-P devient capable d'induire l'expression de l'opéron *comCDE*, *comX* et *comW* (Martin et al., 2013). L'augmentation de l'expression de ComE mène à une augmentation du rapport ComE/ComE-P. Hors, si ComE-P est capable d'agir comme activateur transcriptionnel vis-à-vis de *comCDE*, *comX* et *comW*, ComE non phosphorylé est capable de réprimer l'expression de ces mêmes gènes. La répression de l'expression de *comX* va logiquement mener à une répression de l'expression des gènes de compétence et une sortie de l'état de compétence. Il faut noter que l'augmentation de l'expression de *comD* pourrait également participer à l'augmentation du rapport ComE/ComP par déphosphorylation de ComE-P (Figure 10A). La seconde boucle de rétrocontrôle mise en évidence implique DprA (Mirouze et al., 2013). Cette protéine, qui est exprimée lors de la compétence, serait capable d'interagir avec ComE-P. Cette interaction mènerait à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de ComE-P et donc à l'inhibition de l'expression des gènes de compétence. Le mode d'action exact par lequel DprA inhibe ComE-P n'est pas encore déterminé. (Figure 10B)

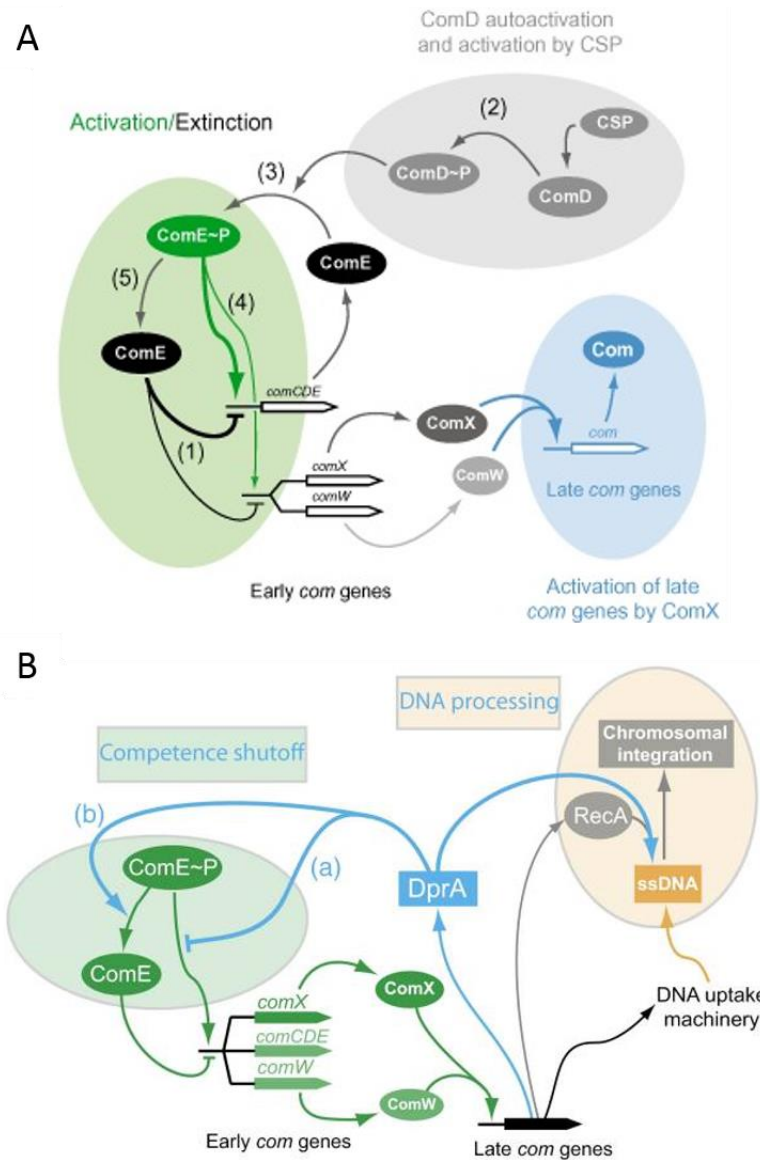


Figure 10 : Mécanismes de rétrocontrôle de la compétence chez *S. pneumoniae* A) Boucle de rétrocontrôle par ComE. B) Boucle de rétrocontrôle par DprA. (Mirouze et al., 2013 ; Martin et al., 2013)

Chez *B. subtilis*, il a été démontré que la protéine Spo0A, était impliquée à la fois dans l'entrée et la sortie de compétence. Lors du processus de sortie de l'état de compétence, Spo0A se fixe sur la séquence promotrice de *comK*, inhibe son expression et conséquemment inhibe l'expression des gènes de compétence (Mirouze et al., 2012). La sortie de la compétence se produit uniquement en cas d'amélioration de l'environnement bactérien (changements du milieu de culture). Les bactéries compétentes affichent cependant un délai de 90 min avant de pouvoir se diviser à nouveau. Ce délai n'est pas observé chez les cellules non compétentes. Cette différence est principalement due au fait que chez *B. subtilis*, la

division cellulaire des bactéries compétentes est stoppée (Haijema et al., 2001). Il est proposé que cette pause soit une étape nécessaire pour permettre aux bactéries de finaliser les multiples événements de recombinaison. Il semble exister deux mécanismes à l'origine de cette inhibition de la division. Ces mécanismes impliquent la protéine ComGA mais également les protéines Maf et MreB. ComGA est une ATPase impliquée dans le processus d'internalisation de l'ADN exogène. Bien que l'on ignore le mécanisme exact par lequel ComGA agit, on sait que cette dernière est impliquée dans l'inhibition de l'élongation cellulaire, la ségrégation des nucléoïdes et la formation des « Z-ring ». Maf est quant à elle une protéine naturellement séquestrée par ComGA. Lorsque ComGA est inactivée, cela provoque la libération de Maf qui va alors inhiber la formation du septum (Briley et al., 2011). Le second mécanisme d'inhibition de la division implique la protéine MreB. Cette dernière est une protéine essentielle pour l'élongation cellulaire. Il est proposé que dans les cellules compétentes ComGA soit capable de séquestrer MreB et ainsi d'inhiber la division cellulaire (Mirouze et al., 2015). La reprise de division cellulaire est probablement réalisée via la libération de MreB et de Maf.

F- Le fratricide microbien chez *S. pneumoniae*

Il a été démontré que des cellules compétentes de *S. pneumoniae* étaient capables de lyser de manière ciblée les cellules non compétentes. Cette lyse est réalisée par la sécrétion de facteurs lytiques de la part des deux types de cellules et la production de facteurs protecteurs de la part des cellules compétentes (Figure 11). Plusieurs rôles biologiques possibles ont été attribués à ce mécanisme. Parmi ces derniers, on trouve la possibilité de libérer des facteurs de virulence, acquérir des nutriments, lyser d'autres souches bactériennes et bien évidemment faciliter les échanges d'ADN via la libération d'ADN chromosomique (Guiral et al., 2005 ; Havartsein et al., 2006).

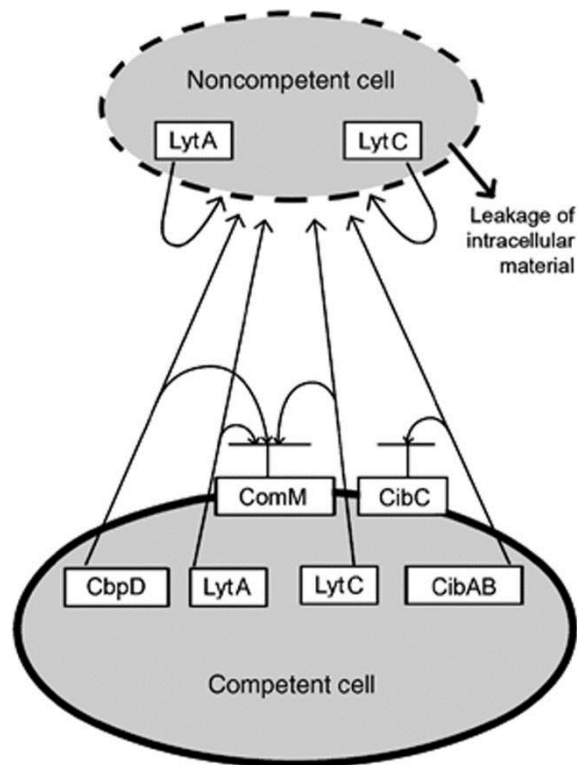


Figure 11 : Mécanisme de fratricide chez *S. pneumoniae* (Johnsborg et Havarstein, 2009). LytA et LytC sont respectivement des amidases et des lysozymes. CbpD et CibAB sont deux facteurs qui détruisent les parois cellulaires. ComM et CibC sont des protéines produites par les bactéries compétentes et qui les protègent de la lyse.

III- La transformation chez les bactéries à Gram négatif

A la différence des bactéries à Gram positif, où deux modèles d'étude dominent, la caractérisation du processus de transformation chez les bactéries à Gram négatif a été réalisée sur un grand nombre d'espèces bactériennes différentes. Les premières études ont initialement été centrées sur les bactéries du genre *Haemophilus* et *Neisseria*, mais par la suite, des groupes de recherches se sont attelés à l'étude des mécanismes de transformation d'autres espèces bactériennes telles que *H. pylori*, *V. cholerae* et dans une moindre mesure *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas stutzeri* et les bactéries du genre *Acinobacter*. Cette multiplicité des modèles a logiquement mené à l'acquisition de connaissances inégales en fonction de l'espèce bactérienne considérée et à l'impossibilité d'imposer un modèle en adéquation avec l'ensemble des bactéries à Gram négatif. Cela a cependant permis de mettre en évidence que même si le mécanisme de transformation est un processus commun à de nombreuses bactéries, chaque espèce possède ses propres spécificités.

A- La capture de l'ADN chez les bactéries à Gram négatif

A la différence d'Acinobacter, *N. gonorrhoeae* et *H. influenza* capturent préférentiellement l'ADN provenant d'espèces proches ou identiques. Cette sélection s'effectue par la reconnaissance de séquence DUS de 10 à 12 nucléotides (Elkins et al., 1991 ; Danner et al., 1980). Il a été démontré que chez *H. influenza*, le contenu en A+T encadrant la séquence DUS influence les chances de capture de la molécule d'ADN. Il apparaît ainsi que des séquences d'ADN riche en A+T étaient capturées 48 fois plus qu'une séquence riche en G+C (Danner et al., 1982). Il semblerait toutefois que la capture de l'ADN puisse parfaitement être réalisée en absence de toutes séquences DUS chez *N. gonorrhoeae* (Duffin and Seifert, 2010). Ceci est également le cas pour *H. influenza* mais uniquement en conditions de pH acide (Goodgal et Mitchell, 1984). Chez *N. gonorrhoeae*, l'impact des séquences DUS sur la capture d'ADN n'est pas proportionnel à la fréquence de transformation. Il a donc été supposé que les séquences DUS puissent jouer un rôle secondaire mais pour l'instant inconnu, en aval de l'internalisation (Duffin and Seifert, 2010). Bien que *Pseudomonas stutzeri* ne possède pas de séquence DUS, il semble exister chez cette bactérie un mécanisme lui permettant de reconnaître l'ADN étranger. Ainsi, même si la bactérie est capable de capturer l'ADN étranger et l'ADN de sa propre espèce, la fréquence de recombinaison avec de l'ADN hétérologue est bien plus faible que celle observée avec de l'ADN homologue (Carlson et al., 1983). A la différence des autres modèles bactériens, *N. gonorrhoeae* et *P. stutzeri* sont également capables de capturer et transformer de l'ADNsb. L'efficacité de transformation de ce substrat apparaît toutefois diminuée d'un facteur 20 à 60 chez *P. stutzeri* (Meier et al., 2002)

- Le système de restriction/modification chez *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae possède un système de restriction modification particulièrement efficace sur les plasmides exogènes mais pas sur l'ADN chromosomique. Ceci s'expliquerait par le fait que l'ADN chromosomique est transporté sous forme simple brin alors que les plasmides sont reconstitués dans le cytoplasme sous forme double-brin. Le système R/M n'étant efficace que sur l'ADNdb il pourrait limiter la transformation par plasmide mais pas celle par un chromosome. L'ADNsb ne serait pas dégradé lors de la formation de l'hétéroduplex d'intégration grâce à la méthylation du brin résident (Hamilton et Dillard, 2006). Il faut noter que si ce modèle d'action peut fonctionner chez *N. gonorrhoeae*, cela n'est pas le cas pour les espèces bactériennes dont le système R/M est actif sur la transformation par de l'ADN chromosomique.

B- La machinerie d'internalisation des bactéries à Gram négatif

La machinerie de transformation des bactéries à Gram négatif et précédemment présentée dans la figure 5, a été principalement caractérisée chez *N. gonorrhoeae*. L'existence de cette machinerie chez les autres modèles bactériens a été extrapolée à partir de recherches de gènes homologues par analyse bio-informatique et d'expériences de génétique. Le complexe comprend un pseudo pilus qui, comme pour *S. pneumoniae* et *B. subtilis*, est évolutivement associé à la famille des pili de type IV. Ce filament est le résultat de la polymérisation de la protéine PilE par l'ATPase PilF. PilG joue également un rôle dans la biogénèse du pilus. Lors de sa polymérisation, le pilus s'étend vers la membrane externe jusqu'à traverser le pore formé par la sécrétine PilQ. Cette dernière protéine est évolutivement associée aux systèmes de sécrétion de type II. Il est proposé qu'une fois que l'ADN est fixé par le pilus de transformation, le pilus va être dépolymérisé par PilT afin de permettre l'entrée de l'ADN dans le périplasme. PilT est une autre ATPase impliquée dans la mobilité par rétraction de pili mais non nécessaire à la biogénèse du pseudopilus. Une dernière protéine, nommée PilC, semble être impliquée dans la stabilisation des pili (Chen et Dubnau, 2004). La protéine impliquée dans la dégradation de l'ADNdb en ADNsb n'a été identifiée chez aucune des bactéries à Gram négatif.

- Le transformasome de *H. influenzae*

Chez *H. influenzae*, la capture et l'internalisation de l'ADN s'effectue au niveau des transformasomes (figure 12). Ces derniers sont de petites vésicules de 20 nm de diamètre localisées à la surface des cellules. Des études ont démontré que ces vésicules étaient le lieu de capture de l'ADN. Dans le modèle proposé par le groupe de Hamilton O. Smith, l'ADNdb est capturé dans le transformasome et après 5 minutes l'un des brins d'ADN est dégradé tandis que l'autre est transporté dans le cytoplasme. Les ADN surenroulés ainsi que certaines molécules relâchées ne sont pas transportés dans le cytoplasme. Cette caractéristique pourrait expliquer la faible fréquence de transformation de *H. influenzae* avec des plasmides. Une fois que les bactéries quittent la compétence, les vésicules sont relâchées dans le milieu extracellulaire. (Kahn et al., 1983 ; Barany et al, 1983)

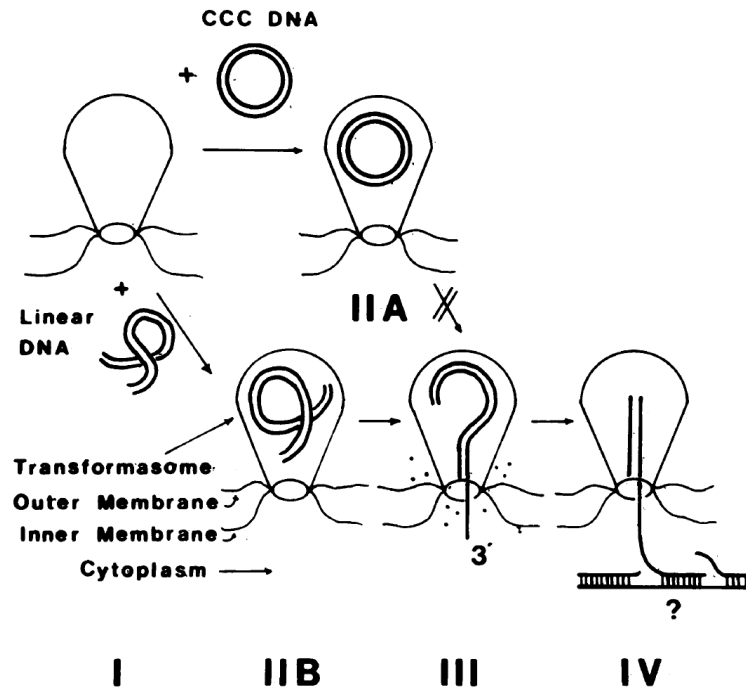


Figure 12 : Modèle de capture de l'ADN via le transformasome chez *H. influenzae*. (Barany et al, 1983)

Il convient de noter que ces études ont été réalisées au milieu des années 80 et que depuis 1986 aucune autre étude sur cette structure n'a été réalisée. En outre, la caractérisation de la machinerie de capture de l'ADN de *H. influenzae* repose majoritairement sur des études génétiques ainsi que sur nos connaissances de la machinerie de capture de *N. gonorrhoeae* (Sinha et al., 2012). Enfin, Jean Pierre Claverys a proposé de reprendre le nom de transformasome pour désigner cette fois toutes les protéines impliquées dans la capture, l'internalisation et l'intégration de l'ADN pour toutes les espèces compétentes.

C- La régulation de la compétence

1) La régulation de la compétence chez *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae est une des espèces bactériennes connues pour être constitutivement compétentes. A l'heure actuelle aucun facteur ou stimuli exogène n'a été identifié comme à l'origine de cette compétence. L'ADN transformé par *N. gonorrhoeae* provient principalement de cellules sœurs autolysées mais peut dans certaines souches être le résultat de sécrétions d'ADN endogène par un système de sécrétion de type IV (Hamilton et al., 2005). Les mécanismes de régulation de ces phénomènes sont pour le moment inconnus.

2) La régulation de la compétence chez *H. influenzae*

H. influenzae est une bactérie qui devient compétente lors de son entrée en phase stationnaire ou lorsque les cellules sont transférées sur un milieu de culture pauvre en nutriments. Il a été démontré que l'addition d'AMP cyclique durant la phase exponentielle induisait l'entrée en compétence et que les protéines réceptrices d'AMP cyclique (CRP) étaient essentielles à l'entrée en compétence (Wise et al., 1973 ; Chandler, 1992). Le régulon impliqué dans l'entrée en compétence a été identifié en 2005 par Redfield et ses collègues (Redfield et al., 2005). Le régulon est composé de 13 unités transcriptionnelles possédant toutes une séquence régulatrice de 22pb nommée CRP-S (site de fixation pour CRP). Étonnamment, l'expression de ces gènes n'est pas seulement conditionnée par la fixation de CRP (protéine réceptrice d'AMPc) mais également par l'action de la protéine Sxy. Bien que le mode d'action exact par lequel l'AMPc, CRP et Sxy parviennent à réguler l'expression des gènes de compétence demeure inconnu, un modèle d'action a été proposé par le groupe de recherche de R. J. Redfield (Cameron et al., 2008). Dans ce modèle, l'AMPc et CRP sont nécessaires à l'induction du gène *sxy* par fixation de CRP sur la séquence promotrice de *sxy*. Le transcrit de *sxy* possède d'ordinaire une structure secondaire en tige boucle. La présence de cette structure secondaire inhibe la traduction de l'ARNm de *sxy* et serait ainsi impliquée dans la régulation de l'expression de *sxy*. Redfield et ses collègues proposent qu'en conditions de famine, la transcription des ARNm s'effectue plus lentement en raison du manque de nucléotides. Ce ralentissement permettrait la fixation des ribosomes sur le l'ARNm avant que la structure en tige boucle ne puisse se former. Ainsi, en conditions défavorables, la traduction des ARNm de *sxy* serait plus élevée et le niveau de la protéine serait augmenté. Une autre hypothèse est que la régulation de l'expression de *sxy* soit réalisée par un phénomène de riboswitch impliquant cette structure en tige boucle. (Cameron et al., 2008).

3) La régulation de la compétence chez *V. cholerae* (figure 13)

Pendant de nombreuses années *V. cholerae* a été considérée comme une espèce bactérienne non compétente. Il a fallu attendre 2005 pour que Meibom et ses collègues démontrent que *V. cholerae* est capable de transformer de l'ADN lorsque de la chitine est présente dans le milieu de culture (Meibom et al., 2005). Il existe plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation de l'entrée en compétence chez *V. cholerae*.

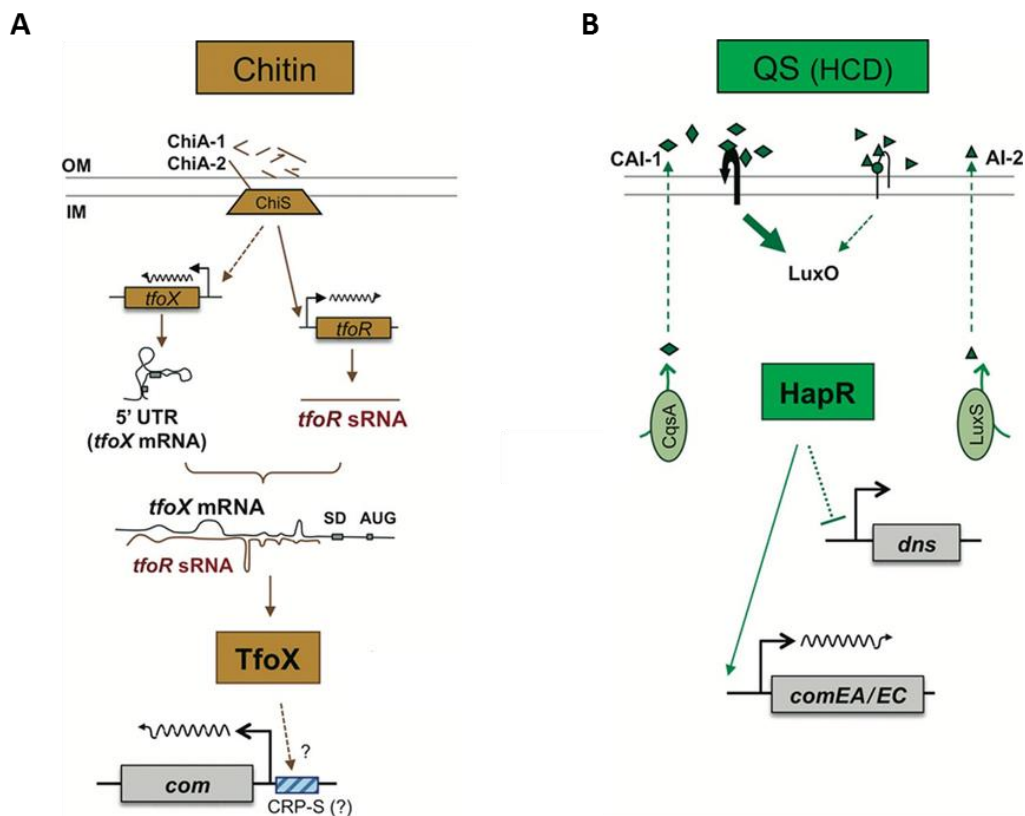


Figure 13 : Modèle d'induction des gènes de compétence chez *V. cholerae*. (Seitz et Blokesch, 2013) (Voir le texte pour les explications)

a) Un mécanisme Sxy like (figure 13 A)

Le premier est un mécanisme similaire au système de régulation de *H. influenzae*. Un récepteur nommé ChiS détecte la présence de chitine dans le milieu extracellulaire et induit l'expression de deux gènes. Le premier code pour un small RNA (sRNA) nommé TfoR. Le second code pour TfoX, une protéine similaire au régulateur de compétence Sxy de *H. influenzae* et qui est nécessaire à l'induction de l'expression des gènes de compétence. L'ARNm de *tfoX* forme d'ordinaire des structures en tige boucles inhibant sa traduction. TfoR serait capable de s'hybrider avec la partie 5'UTR de l'ARNm de *tfoX* et d'induire le relâchement de ces tiges boucles pour permettre l'initiation de la traduction de *tfoX* (Yamamoto et al., 2011). En 2012 Lo Scudato et Blokesch ont démontré que l'induction de la compétence était également dépendante de la quantité d'AMPc intracellulaire. Bien que la relation entre le niveau d'AMPc et TfoX ne soit pas connue, il est proposé que TfoX puisse agir conjointement avec des CRP comme cela est le cas pour Sxy de *H. influenzae*.

b) Un mécanisme de quorum sensing (figure 13B)

Le quorum sensing (QS) régule un certain nombre de mécanismes biologiques chez *V. cholerae*. Il permet notamment d'inhiber la production de facteurs de virulence et la fabrication de biofilms lorsque la densité cellulaire devient élevée (Zhu et al., 2002 ; Hammer et Bassler., 2003). En 2005, Meibom et ses collègues démontrent que la régulation de l'expression de HapR, qui est le régulateur principal du quorum sensing chez *V. cholerae*, permet de moduler l'efficacité de transformation. Il apparaît également que la fréquence de transformation est augmentée en cas de croissance prolongée. On peut dès lors supposer qu'il existe un lien entre régulation de la compétence et quorum sensing. En 2008, Blokesch et Schoolnik constatent que HapR induit l'inhibition de l'expression de la nucléase extracellulaire *dns* (Blokesch et Schoolnik, 2008). Selon eux, la répression de l'expression de *dns* permettrait de diminuer la dégradation de l'ADN extracellulaire potentiellement transformable. Cette inhibition semble d'autant plus importante lorsque l'on sait que *V. cholerae* est capable de transformer des fragments d'ADN allant jusqu'à 42kb (Blokesch et schoolnik, 2007). Il a également été constaté que HapR induisait l'expression de certains gènes de compétence tel que *comEA* et que son absence inhibait l'entrée en compétence (Antonova et Hammer, 2011). Une étude réalisée en 2012 a prouvé que la majorité des gènes induits par le QS étaient différents de ceux induits par la voie TfoX, soulignant ainsi une collaboration entre les deux voies vis-à-vis de l'induction de la compétence (Lo Scudato et Blokesch, 2012). Le mécanisme de quorum sensing repose sur la sécrétion et la détection de molécules de signalisation. A ce jour deux molécules ont été identifiées comme jouant un rôle d'auto-inducteur similaire aux peptides CSP de *S. pneumoniae* et ComX de *B. subtilis*. La première est nommée CAI-1 (Cholera AutoInducer 1) et est l'inducteur majoritaire de la compétence intra-espèces chez *V. cholerae*. La seconde molécule, qui est nommé AI-2 (autoinducer 2), est considérée comme un inducteur universel du fait de sa production par de nombreuses espèces bactériennes (Suckow et al., 2011 ; Antonova et Hammer, 2011). Bien que possédant un faible pouvoir inducteur, AI-2 pourrait néanmoins jouer un rôle dans le transfert de gènes. En effet, AI-2 pourrait être sécrétée par d'autres espèces n'appartenant pas au genre vibrio et stimuler l'entrée en compétence de *V. cholerae*.

c) Un mécanisme de fratricide

Il a été démontré que lors de son entrée en compétence *V. cholerae* induisait l'expression d'un système de sécrétion de type VI (T6SS). Ce T6SS va permettre, via l'injection de toxines intracellulaires, de lyser les cellules voisines sensibles et ainsi

augmenter la quantité de matériel génétique utilisable pour la transformation (Borgeaud et al., 2015). Ce mécanisme est très semblable au mécanisme de fratricide observé chez *S. pneumoniae*.

4) La régulation de la compétence chez le genre *Pseudomonas*

Pour les bactéries du genre *Pseudomonas*, l'induction de la compétence se produit lors de l'entrée en phase stationnaire ou lors de la croissance sur milieux limités en carbone, azote et phosphore (Lorenz et Wackernagel, 1990 ; Lorenz et Wackernagel, 1991). *P. stutzeri* possède une machinerie d'internalisation similaire aux autres bactéries à Gram négatifs. Toutefois, des études ont mis en évidence que *P. stutzeri* co-transcrivait une piline secondaire en plus de sa piline principale. Cette piline secondaire, nommée PilA2, possède 55% d'identité avec pilA1 qui est la piline majeure. Alors que d'ordinaire la délétion des pilines secondaires induit une diminution de la fréquence de transformation chez les bactéries compétentes, la délétion de *pilA2* produit étonnamment un phénotype hypertransformable sans pour autant modifier la quantité d'ADN capturé (Graupner et Wackernagel, 2001). Il a donc été proposé que PilA2 soit un facteur antagoniste vis-à-vis de la transformation et que la modulation de son niveau d'expression définisse le degré de transformation de la bactérie.

Troisième partie : La transformation
chez *H. pylori*

I- Découverte de la transformation chez *H. pylori*

En 1990, Nedenskov-Sorensen et ses collègues décident de déterminer si la bactérie, encore nommée *Campylobacter pylori* à l'époque, est naturellement compétente pour la transformation. Pour cela, ils décident d'incuber 25 isolats cliniques streptomycine sensibles avec de l'ADN extrait d'une souche de *C. pylori* 11637 streptomycine résistante. Le but était de déterminer si les isolats cliniques étaient capables d'acquérir le marqueur génétique offrant la résistance à la streptomycine. Après 20 min d'incubation, la capture de l'ADN fut bloquée par ajout de DNase dans le milieu. Les bactéries furent étalées sur boîtes au sang avec ou sans exposition à la streptomycine et après 3 jours de croissance le nombre de colonies fut recensé pour chaque condition. La fréquence de transformation fut déterminée par calcul du ratio colonies strepR/colonies totales. Sur les 25 isolats testés, 22 apparurent comme naturellement compétents avec une fréquence de transformation moyenne de 5.10^{-4} . La même expérience, fut réalisée avec de l'ADN provenant non pas de *C. pylori* mais de *Campylobacter jejuni*. Dans ce dernier cas, aucun transformant ne put être observé (Nedenskov-Sorensen et al., 1990). Dans les années qui suivirent, les mécanismes de transformation de *H. pylori* furent caractérisés et ce dernier devint un solide modèle d'étude pour la transformation bactérienne. Les années passant, il est cependant devenu de plus en plus clair que la transformation bactérienne chez *H. pylori* était différente des autres modèles. Si le mécanisme général est le même, les nombreuses particularités de la bactérie l'ont peu à peu menée à être frappée d'ostracisme pour être aujourd'hui qualifiée de « black sheep » de la transformation. (Johnston et al., 2014)

II- La machinerie d'internalisation de *H. pylori*

Une des principales spécificités de *H. pylori* est sa machinerie d'internalisation. Alors que les autres bactéries compétentes utilisent un pilus de type IV ou un système de sécrétion de type II, *H. pylori* requiert un système de sécrétion de type IV.

A) Les systèmes de sécrétion de type IV

Les systèmes de sécrétions de type IV sont ordinairement utilisés pour transloquer des macromolécules bactériennes dans le milieu extracellulaire ou dans d'autres cellules. Cela peut être des protéines injectées dans des cellules de mammifère ou des plasmides transférés lors de la conjugaison. Le système de sécrétion de type IV de référence est le système Vir utilisé par *Agrobacterium tumefaciens* (figure 14). *A. tumefaciens* est une bactérie à Gram négatif infectant les plantes et qui est responsable de la maladie nommée « galle du collet ».

La survenue de cette maladie est dépendante de l'injection d'un plasmide Ti (pour Tumor Inducing) dans la cellule végétale. Une fois injecté, une partie du plasmide va s'intégrer dans le génome de la bactérie. Cette intégration dans le génome de la plante va provoquer une multiplication anarchique des cellules et la formation de nodules racinaires caractéristiques de la maladie. Le système de sécrétion Vir est le produit de l'assemblage des protéines VirB1-VirB11 (virB operon) et du récepteur VirD. Le tout forme un canal au travers des enveloppes cellulaires permettant la sécrétion de macromolécules (Lai et Kado, 2000).

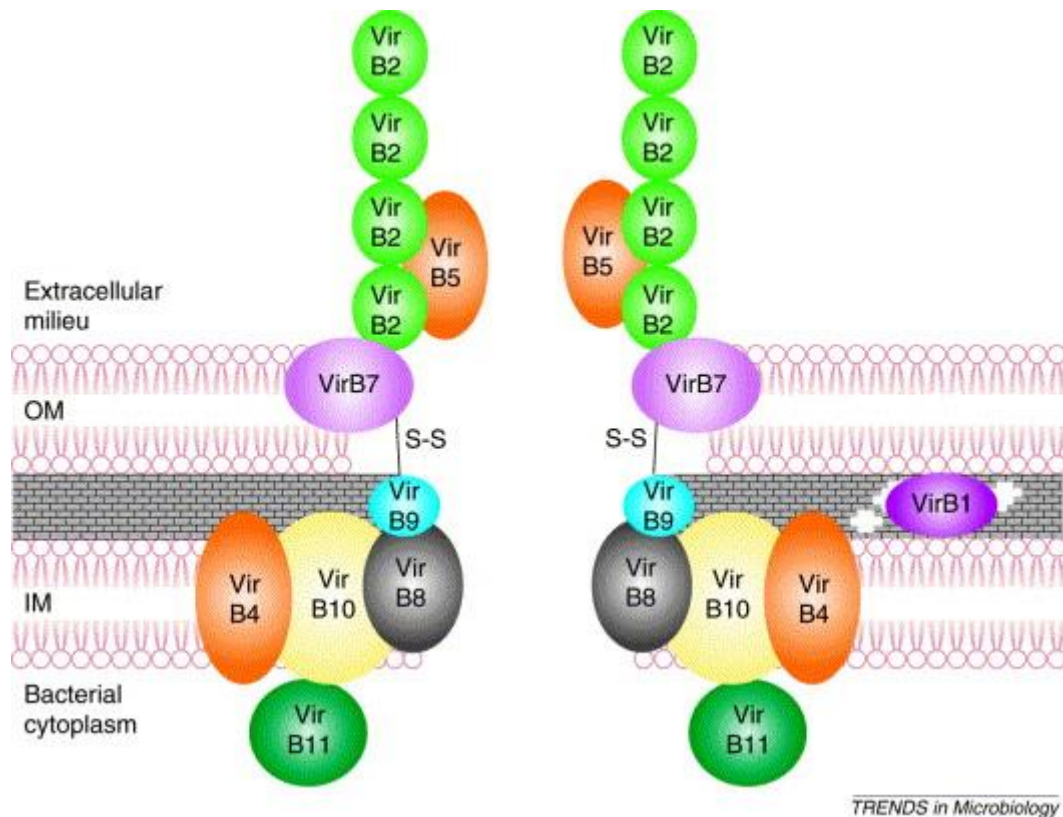


Figure 14 : Structuration du système de sécrétion de type IV Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. (Smeets and Kusters, 2002)

B) Le système de sécrétion de type IV de *H. pylori*

En 1998, Hofreuter et ses collègues parviennent à identifier deux gènes impliqués dans la transformation bactérienne. Ces deux gènes, nommé *comB2* et *comB3*, codent pour des protéines ayant une forte homologie avec les protéines VirB composant les systèmes de sécrétion de type IV (Hofreuter et al., 1998). Dans les années qui suivent, le laboratoire de Rainer Haas va caractériser ce nouveau système de sécrétion de type IV et démontrer son implication dans la capture de l'ADN lors de la transformation (Hofreuter et al., 2001 ; Karnholz et al., 2006). Aujourd'hui on sait que le système de sécrétion de type IV est codé par

deux opérons. Le premier opéron code pour 3 protéines ComB2 à ComB4 tandis que le second code pour 5 protéines ComB6 à ComB10. Des études d'homologie de séquences ainsi que l'analyse topologique de ComB6 ont permis de prédire la structure du complexe ComB (Karnholz et al., 2006). Ce dernier permettrait, comme pour le T4SS d'*A. tumefaciens*, de former un canal traversant les membranes cellulaires (Figure 15). Ainsi ComB2, B4 et B6, qui sont des protéines indispensables à la transformation, seraient respectivement situées à la surface de la membrane externe, associées à la membrane interne et intégrées dans la membrane interne. ComB2 aurait pour rôle de faciliter la capture de l'ADN, tandis que ComB4 est une ATPase probablement impliquée dans la biogénèse du complexe ComB ou dans la translocation de l'ADN exogène. L'absence de ComB6 induirait une déstabilisation complète du complexe T4SS. ComB7 n'est pas essentielle à la transformation mais semble plutôt posséder un effet modulateur par stabilisation du complexe ComB. Des études bio-informatiques et des expériences de génétique ont permis d'identifier l'homologue de ComEC chez *H. pylori* et de valider son rôle dans la transformation (Yeh et al., 2003, Stingl et al., 2010). Il convient toutefois de noter que la protéine ComEC de *H. pylori* est beaucoup plus petite et seulement lointainement apparentée aux autres protéines ComEC. En effet, ComEC de *H. pylori* est constituée de 437 acides aminés contre 746 pour ComEC de *S. pneumoniae* (Johnston et Claverys, 2014).

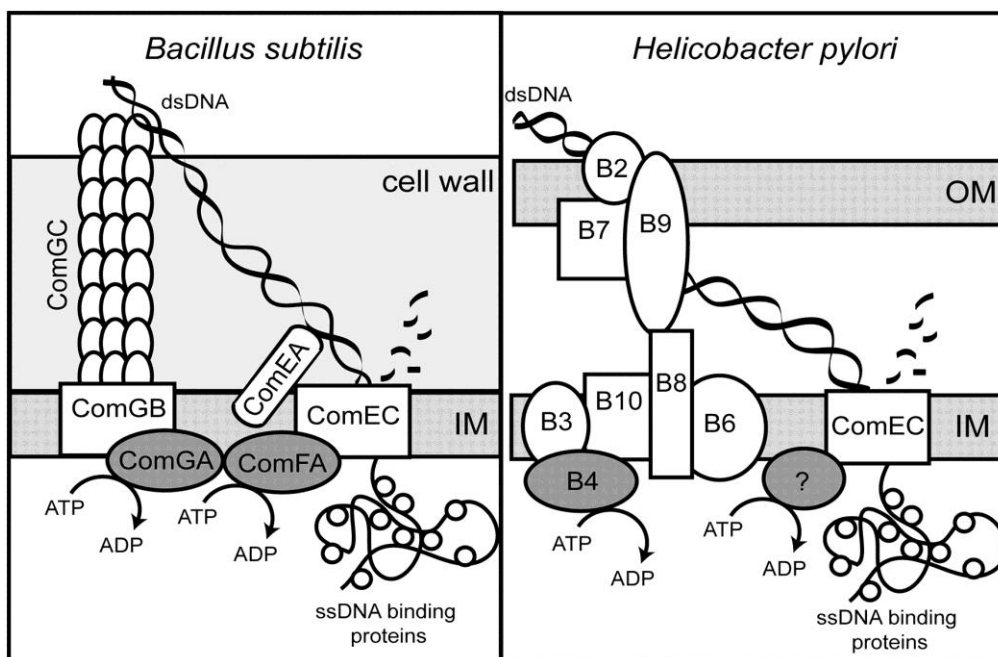


Figure 15 : Topologie cellulaire prédite du T4SS de *H. pylori* comparé au pilus de type IV de *B. subtilis*. (Stingl et al., 2010).

C) Le mécanisme d'internalisation et d'intégration (figure 16)

Le modèle d'internalisation de l'ADN exogène chez *H. pylori* repose principalement sur nos connaissances du processus de transformation des autres espèces bactériennes ainsi que nos connaissances du T4SS. Bien que de nombreux acteurs doivent encore être identifiés, une étude réalisée par Stingl et ses collègues en 2010 a permis de proposer un processus en deux étapes (Stingl et al., 2010). Dans ce dernier, *H. pylori* capture l'ADNdb exogène sans distinction de séquences. Une fois capturé, l'ADNdb est transporté dans la périplasmique où il serait dégradé en ADNsb. Les protéines impliquées dans la capture de l'ADNdb ainsi que dans sa dégradation restent à identifier. Une fois sous forme simple-brin, l'ADN est transporté dans le cytoplasme par le pore ComEC. L'énergie nécessaire à cette translocation est fournie par une ATPase également inconnue. Une fois dans le cytoplasme, il est postulé que l'ADN est protégé des nucléases par la polymérisation de protéines le long du brin. Alors que chez certaines bactéries, il existe une protéine SsbB dédiée exclusivement à la protection de l'ADN exogène et une protéine SsbA dédiée exclusivement à la protection de l'ADN lors de la réplication, *H. pylori* ne possède qu'une seule et unique SSB. DprA va par la suite venir se fixer sur le brin d'ADN pour permettre la formation de nucléofilament de RecA et l'intégration du brin d'ADN transformant dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue (Ando et al., 1999).

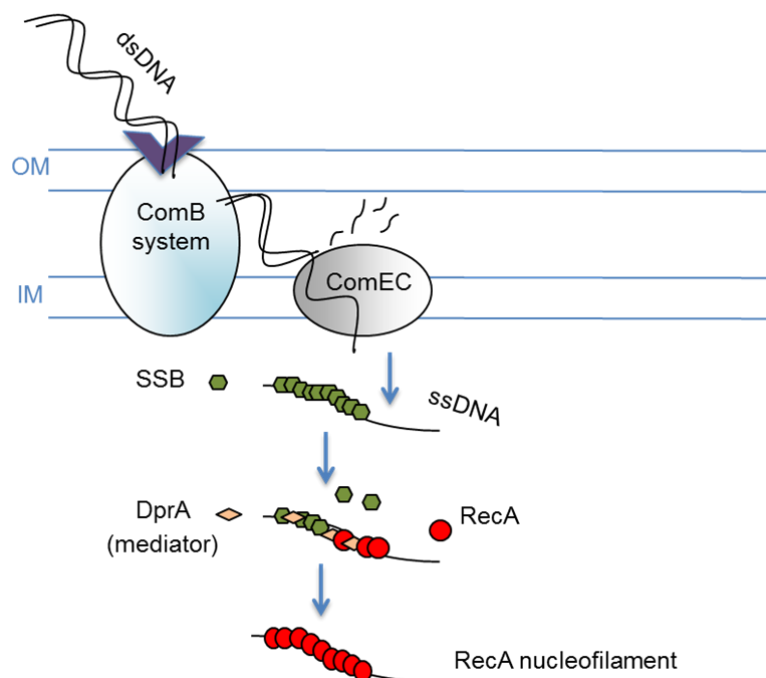


Figure 16 : Modèle de la transformation chez *H. pylori*. OM : membrane externe. IM : membrane interne. (Voir texte pour les explications)

D) Intégration de l'ADN transformant

En fonction des souches étudiées et de l'origine du substrat d'ADN utilisé, la taille moyenne des séquences d'ADN acquises par transformation chez *H. pylori* varie entre 420 et 4300pb (Humbert et al., 2011 ; Aras et al., 2002) . Cela est bien petit comparé à des bactéries comme *B. subtilis* et *S pneumoniae* qui acquièrent en moyenne des fragments de 8.5kb et 6.3kb. Lors de la caractérisation des mécanismes d'intégration de *H. pylori*, deux groupes de recherche ont remarqué que, dans 10% des recombinants, le fragment importé du donneur était interrompu par de petites séquences d'ADN du receveur. Ces petites séquences, de tailles variables, ont été nommées séquence ISR (Interspersed Sequences of the Recipient) (Lin et al., 2009 ; Kulick et al., 2008). La présence de gaps d'intégration a déjà été observée chez *S. pneumoniae* et a été attribuée à des mécanismes de réparation de mismatch ou d'excision de base à la suite de l'invasion du brin donneur dans le chromosome (Guerrini et Fox, 1968). Lin et ses collègues soulignent que puisque *H. pylori* ne possède pas de système de mismatch repair fonctionnel cette explication est peu probable. Ils suggèrent plutôt que les gaps sont le résultat de multiples événements d'invasions de brins. Bien que Kulick et ses collègues aient démontré que le niveau d'expression de la glycosylase *mutY* influe sur la fréquence des ISR, il apparaît que MutY n'est pas indispensable à leur formation. Il semble donc exister de multiples mécanismes générateurs d'ISR à l'origine de ces intégrations en mosaïque.

E) Les nucléases impliquées dans la transformation chez *H. pylori* : impact de la protéine NucT

Que ce soit EndA de *S. pneumoniae* ou NucA de *B. subtilis*, ou encore Dns de *V. cholerae*, les nucléases jouent un rôle important dans la transformation bactérienne. Chez *H. pylori*, la seule nucléase à avoir été décrite comme jouant un rôle dans la transformation est la protéine périplasmique NucT. Cette protéine a été identifiée en 2004 par O'Rourke et ses collègues comme étant la protéine responsable de la majorité de l'activité nucléase chez *H. pylori* (O'rourke et al., 2004). Ils ont déterminé que la protéine était associée aux membranes plasmiques et que sa délétion induisait une diminution de la fréquence de transformation d'un facteur 10 à 100. Ils ont également réalisé une caractérisation biochimique sommaire de la protéine et ont ainsi déterminé que c'était une endonucléase thermostable cation-indépendante qui coupe préférentiellement l'ADNsb sans préférence de séquence. Toutefois, aucune caractérisation n'a été réalisée vis-à-vis d'une possible activité exonucléase, de son interaction vis-à-vis de l'ADN ou du mécanisme de coupure. Sept ans

plus tard, le laboratoire de Nina Salama a publié une étude qui caractérisait les facteurs impactant la transformation chez *H. pylori*. Ils sont parvenus à démontrer que la présence d'une protéine NucT active limite la taille des fragments intégrés sans toutefois observer de diminution significative de la fréquence de transformation lorsque le gène est délété (Humbert et al., 2011). Plus récemment les travaux de Liechti et Goldberg ont démontré que NucT était également impliquée dans un mécanisme de recyclage des purines par clivage de l'ADN extracellulaire. Ce mécanisme est indépendant du système ComB. Ils démontrent ainsi que NucT est une protéine nécessaire à la croissance en milieu pauvre et potentiellement indispensable à l'infection (Liechti et Goldberg, 2013). Les auteurs n'ont toutefois pas été capables de déterminer si l'activité de la protéine sur l'ADN extracellulaire était due à sa présence sur la membrane externe ou si la protéine était libérée dans le milieu extracellulaire lors de la mort des cellules bactériennes. Si cette dernière hypothèse s'avérait correcte, alors le rôle de NucT dans le recyclage des purines serait probablement une tâche secondaire et son rôle principal resterait à déterminer.

III- La régulation de la transformation chez *H. pylori*

Comme expliqué précédemment, les bactéries doivent posséder un moyen de réguler le phénomène de transformation si elles ne veulent pas voir l'intégrité de leurs génomes menacée. Cette balance entre diversité génétique et stabilité génétique peut être ajustée de deux façons. La bactérie peut, soit favoriser l'intégration de séquences inoffensives par l'utilisation de séquences DUS ou des systèmes R/M, soit réguler sa compétence afin de limiter la quantité d'ADN transformé.

A) Sélection des séquences d'ADN transformant

La capture de l'ADN chez *H. pylori* n'est pas dépendante de la reconnaissance de séquences DUS. La bactérie peut donc capturer n'importe quel type d'ADN indépendamment de son origine. Il existe toutefois des systèmes R/M qui vont permettre de contrôler l'ADN internalisé. Il existe trois types de systèmes R/M chez les bactéries. Le plus étudié d'entre eux et également le plus simple, est le système R/M de type II. *H. pylori* possède de nombreux systèmes R/M de ce type, mais ces derniers peuvent être souches spécifiques, à phase variable et le plus souvent inactivés par des mutations (Alm et al., 1999 ; Aras et al., 2002). Ainsi, alors que chaque souche de *H. pylori* possède plus d'une vingtaine de systèmes R/M, seule une petite partie d'entre eux est active. La souche 26695, par exemple, possède 14 systèmes R/M de type II mais seuls 4 d'entre eux sont actifs (Lin et al., 2001). Les travaux réalisés par

les laboratoires de Nina Salama et Martin J Blazer ont démontré que le système R/M limitait les échanges d'ADN chromosomique entre des souches non isogéniques par réduction de l'efficacité de transformation et réduction de la taille du fragment intégré. Le fait que l'efficacité de transformation soit diminuée mais pas totalement abolie indique que le clivage de l'ADN transformé est partiel et limité à certains sites (Aras et al., 2002 ; Humbert et al., 2011). Il a en outre été démontré *in vitro* que DprA pouvait protéger l'ADN des enzymes de restriction par stimulation de l'activité des méthylases (Dwivedi et al., 2013). Bien que ce rôle potentiel de DprA ne doive pas être négligé, il semble pour le moment prématuré d'inclure ce mécanisme dans le processus de transformation. En effet, il faudrait pour cela connaître avec précision l'étape à laquelle interviennent les systèmes R/M et également parvenir à démontrer l'existence d'un tel rôle *in vivo*.

B) Régulation de la compétence

Bien que *H. pylori* soit une des rares bactéries constitutivement compétentes, la survenue de pics de transformation durant certaines phases de croissance suggère l'existence d'un système de régulation (Baltrus et Guillemain, 2006) (Figure 17).

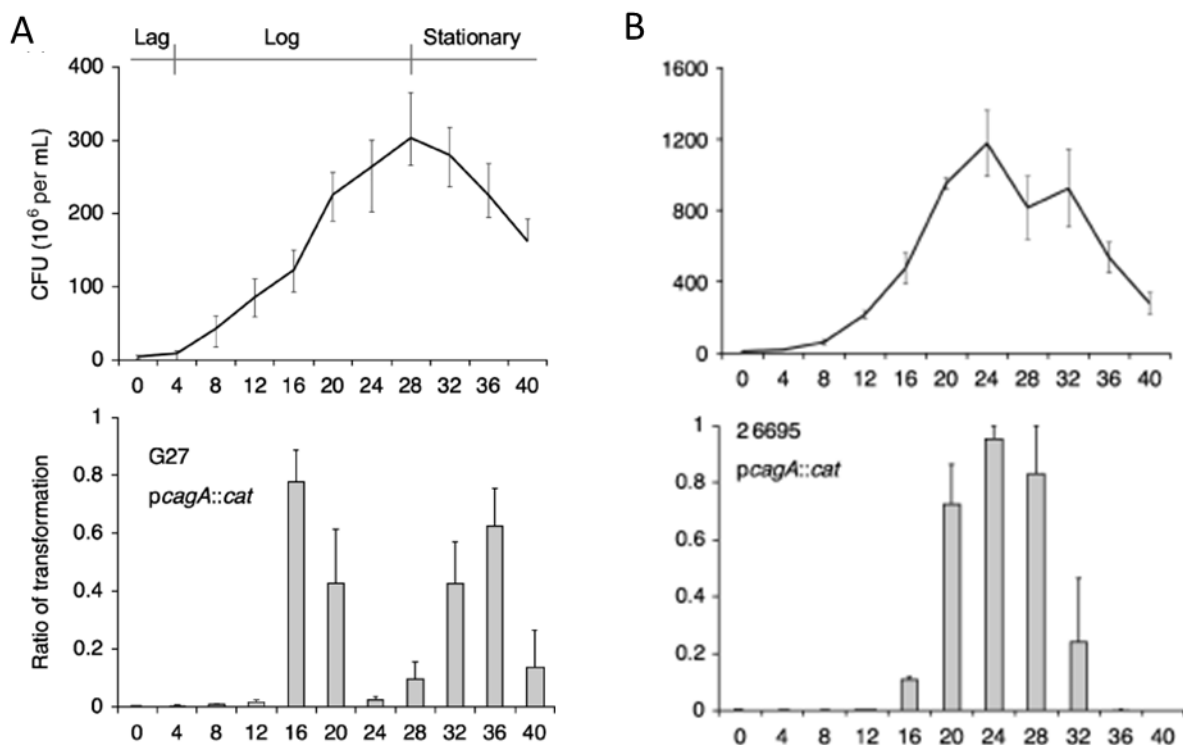


Figure 17 : Pics de transformation en fonction de la phase de croissance chez *H. pylori*. Le nombre de pics de transformation ainsi que leurs phases d'apparition varient en fonction des souches. A) pics de transformation pour la souche G27. B) pics de transformation pour la souche 26695. La transformation a été mesurée avec un plasmide possédant le gène *cagA* interrompu par une cassette de

résistance au chloramphénicol. Le ratio de transformation est le nombre de transformants rapporté au plus grand nombre de transformants détectés durant la courbe de croissance (Baltrus et Guillemin, 2006)

A ce jour, les médiateurs impliqués dans le processus de régulation de la compétence chez *H. pylori* demeurent inconnus. Les études réalisées au laboratoire ont néanmoins permis de mettre en évidence que MutS2 pourrait être impliquée dans cette régulation. Alors que cette protéine est homologue à une protéine majeure du MMR chez *E. coli* (MutS), MutS2 de *H. pylori* n'est pas impliquée dans la réparation. Au contraire, il apparaît que MutS2 possède *in vivo* et *in vitro* une action inhibitrice vis-à-vis de la recombinaison (Pinto et al., 2005 ; Damke et al., 2015). La modulation de l'expression de cette protéine pourrait donc permettre à la bactérie de réguler son efficacité de transformation. Dorer et ses collègues ont également démontré en 2010 que les dommages à l'ADN induisent la compétence chez *H. pylori*. Ils ont en effet observé que l'induction de cassures d'ADN par la ciprofloxacine ou dans un mutant $\Delta addA$ mène à l'induction des gènes de compétence et à l'augmentation de la fréquence de transformation. Ils ont également observé que la surexpression du gène *comB4* mène au même phénotype. Ils proposent donc un modèle selon lequel une augmentation du nombre de cassures double-brin de l'ADN dans le cytoplasme serait détectée et mènerait à l'induction de la compétence (figure 18). L'augmentation de l'expression des gènes de compétence mènerait alors à l'augmentation de la quantité d'ADNs*b* importée. Ces derniers seraient par la suite détectés par la cellule et participeraient au maintien du niveau de transformation par induction des gènes de compétence. Les auteurs suggèrent que le processus à l'origine de ces inductions est dépendant de RecA puisque la surexpression de ComB4 dans un mutant $\Delta recA$ ne produit pas d'augmentation de la transformation. Une telle réponse aux dommages à l'ADN pourrait être un moyen pour la bactérie de contrebalancer l'absence de système SOS. Parmi les gènes régulés positivement, Dorer et ses collègues ont également noté la présence du gène HPG27_320. Ce dernier est un lysozyme homologue au lysozyme du phage T4. Ils ont analysé l'impact du lysozyme sur la transformation et sont parvenus à démontrer que cette protéine contribuait à l'approvisionnement du milieu extracellulaire en ADN (Dorer et al., 2010). Ce mécanisme rappelle beaucoup le phénomène de fratricide de *S. pneumoniae*.

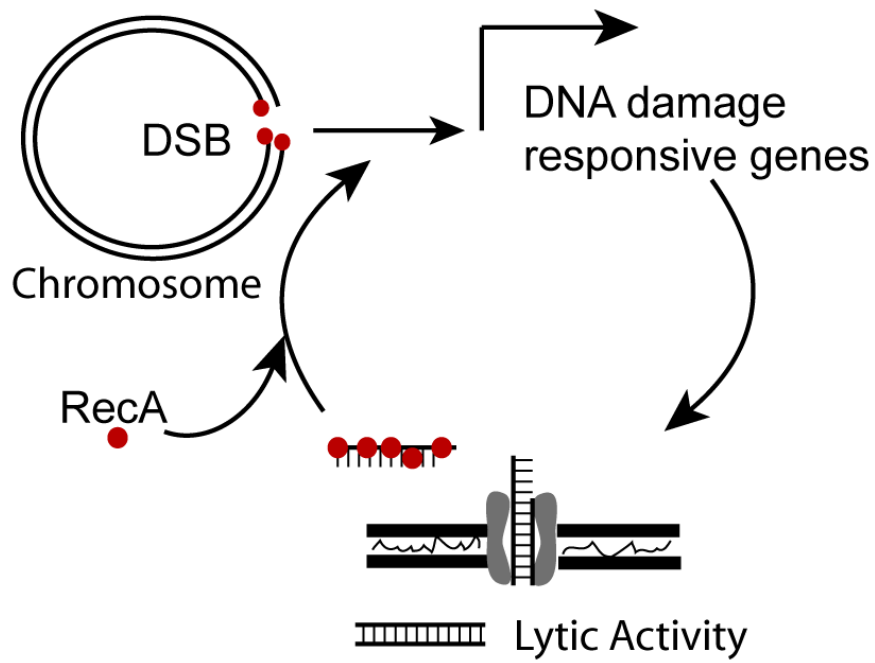


Figure 18 : Modèle d'induction de la transformation par les dommages à l'ADN chez *H. pylori*. Les gènes de réponses aux dommages à l'ADN comprennent des gènes impliqués dans la compétence (Dorer et al., 2010).

IV) Projet de thèse

Helicobacter pylori est une des espèces bactériennes les plus variables décrite à ce jour. Cette variabilité a pour origine un très fort taux de mutagenèse spontanée associé à de nombreux événements de transferts horizontaux. *H. pylori* est en effet naturellement compétente pour la transformation de l'ADN qui est le processus biologique permettant la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène dans le génome de la bactérie.

L'objectif de ma thèse était de mieux caractériser le mécanisme de transformation de cet organisme en utilisant notamment des techniques permettant la visualisation du processus de transformation en temps réel.

Dans un premier temps, j'ai donc développé une méthode permettant de visualiser *in vivo* la capture et l'internalisation d'ADN lors de la transformation chez *H. pylori*.

En parallèle, en poursuivant les travaux initiés au laboratoire sur l'étude de la transformation dans certains mutants des voies de réparation de l'ADN, j'ai cherché à déterminer quels étaient les facteurs responsables de l'induction de la compétence dans ces souches.

Enfin, en utilisant à la fois les approches biochimiques, microscopiques et génétiques, j'ai cherché à caractériser le rôle de la nucléase NucT dans la transformation.

Résultats

I) Visualisation directe de la capture de l'ADN chez *H. pylori*

A- Présentation des travaux de recherche

La transformation bactérienne est un processus biologique permettant la capture, l'internalisation et l'intégration d'ADN exogène dans le génome de la bactérie. Ce mécanisme favorise la diversité génétique au sein d'une population et peut permettre son adaptation rapide aux changements environnementaux.

De nouvelles approches par microscopie ont été développées au cours des dernières années afin de mieux appréhender le déroulement de la transformation. Ces travaux ont permis de visualiser la formation de foci d'ADN transformant (ADNt) à la surface des bactéries compétentes mais pas leurs internalisations dans le cytoplasme (Gangel et al., 2014 ; Stingl et al., 2010 ; Hahn et al., 2005 ; Berge et al., 2013). Cette limitation est principalement due aux types de marquages utilisés lors de ces études (CY-3, CY-5 ou YOYO). Le groupe de M. Blokesch a été capable de suivre le passage de l'ADNt dans le cytoplasme mais le suivi de ce dernier était indirect puisque son entrée dans le cytoplasme a été déduite de la formation de foci RecA-GFP (Seitz et Blockesch., 2014).

Nous avons décidé d'utiliser un ADN marqué par insertion d'un nucléotide fluorescent ATTO au lieu des marquages Cy ou YOYO précédemment utilisés. Les analyses microscopiques réalisées sur des cellules vivantes nous ont permis de visualiser la formation de foci d'ADN et pour la première fois leur internalisation dans le cytoplasme. Le suivi en trois dimensions de ces foci nous a également permis de démontrer que ComEC est nécessaire à l'internalisation de l'ADN dans le cytoplasme de *H. pylori*.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 1.

Ces travaux ont été initiés par Aurélie Mathieu lors de son stage post doctoral dans le laboratoire. Elle a défini les conditions de croissance de *H. pylori* dans un dispositif permettant l'observation en temps réel et a réalisé la mise au point de la visualisation de l'ADN fluorescent. J'ai, pour ma part, construit des souches possédant un marqueur cytoplasmique GFP et réalisé les expériences de visualisation de l'internalisation de l'ADN au cours du temps dans différents mutants.

B- Article 1

1 **Direct visualisation of DNA uptake during *Helicobacter pylori***
2 **transformation.**

3

4 Christopher Corbinais¹, Aurélie Mathieu¹, Thierry Kortulewski, J. Pablo Radicella*
5 and Stéphanie Marsin*

6 *CEA, Institute of Molecular and Cellular Radiobiology, F-92265 Fontenay aux Roses,*
7 *France*

8 *INSERM, U967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France*

9 *Universités Paris Diderot et Paris Sud, UMR967, F-92265 Fontenay-aux-Roses,*
10 *France*

11

12

13

14 ¹These authors contributed equally to this work

15 *To whom correspondence should be addressed. Tel: 33-1-46 54 88 57 ; Fax: 33-1-
16 46 54 88 59 ; Email: pablo.radicella@cea.fr. Correspondence may also be addressed
17 to Stéphanie Marsin ; Tel : 33-1-46-54-89-53 ; Fax: 33-1-46 54 88 59 ; Email:
18 stephanie.marsin@cea.fr.

19

20

21

22 **ABSTRACT**

23 Horizontal gene transfer is a potent driver for genetic diversification in bacterial
24 populations. In many species it is accomplished through natural transformation, a
25 process involving exogenous DNA binding, uptake, transport and internalisation into
26 the cytoplasm, where DNA is processed and either integrated into the host
27 chromosome or let as an autonomous replicating plasmid. An increasing number of
28 publications describe the use of microscopy to study the initial steps of
29 transformation. However, direct visualisation of the transforming DNA has been
30 limited to its binding to the surface or, in the case of Gram-negative species, to its
31 entrance into the periplasm. We present here for the first time the direct visualisation
32 of transforming DNA entering the bacterial cytoplasm. We used as a model the
33 Gram-negative pathogen *Helicobacter pylori*, characterized by a large intraspecies
34 variability that results from high mutation rates and efficient horizontal gene transfer.
35 Using fluorescently labelled DNA, we followed for up to 3 hours the fate of
36 transforming DNA foci formed on the bacterial periplasm and eventually internalised
37 into the cytoplasm. We show here that unlike in other competent species the
38 transformation process occurs without inhibition of cell elongation or division. In
39 $\Delta comEC$ strains the tDNA is blocked in the periplasm, confirming the function of
40 ComEC as the inner membrane pore allowing DNA internalisation into the cytoplasm
41 of *H. pylori*.

42

43 INTRODUCTION

44 Natural transformation is a mechanism allowing bacteria to take up DNA from the
45 environment and internalise it into the cytoplasm. Together with transduction and
46 conjugation, natural transformation allows Horizontal Gene Transfer (HGT), favouring
47 the rapid spreading of beneficial traits within a population. DNA transformation takes
48 place in competent bacteria that express several genes required for DNA uptake and
49 internalisation. Only a subset of bacterial species has been proven to be naturally
50 competent. In most of those cases competence is induced by environmental cues
51 that trigger the expression of genes required for transformation. The fraction of the
52 population becoming competent is species-dependent.

53 During transformation most competent bacteria use a type 4 pilus (T4P)
54 structure to transport the incoming DNA through the membrane and into the
55 cytoplasm. The majority of the studies on the mechanisms involved in the initial steps
56 of bacterial transformation have been carried out on the Gram-positive models
57 *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. Although the DNA uptake machinery
58 of naturally competent Gram-negative bacteria shares several proteins with that of
59 Gram-positive models, the presence of two membranes and a periplasmic space
60 imposes specific requirements to the transformation process in Gram-negative
61 species as pointed out early on for *Neisseria gonorrhoeae* (1).

62 Recent data obtained through cell biology-based approaches in the naturally
63 competent pathogens *Vibrio cholerae* and *N. gonorrhoeae*, clearly confirmed the
64 specificities in the DNA uptake mechanism of Gram-negative bacteria mediated by a
65 type IV pseudo pilus, the periplasmic ComEA and the inner membrane ComEC
66 (ComE in the case of the gonococcus) proteins (2-4). Based on these data, the
67 authors proposed a two-step mechanism for DNA uptake in those two pathogens: a

68 pilus-mediated translocation through the outer membrane followed by a pilus-
69 independent shuttling of the transforming DNA (tDNA) through the periplasm and
70 inner membrane into the cytoplasm.

71 To better comprehend the mechanisms involved in the process of
72 transformation new microscopy approaches are emerging. In recent times, several
73 studies revealed the formation of tDNA foci on the surface of competent bacteria (2,
74 5-7). Only one group followed by microscopy the tDNA passage into the cytoplasm
75 (8). However, in that case, the tracking of the incoming DNA was indirect since its
76 presence in the *V. cholerae* cytoplasm was inferred from the formation of RecA-GFP
77 foci.

78 We used *Helicobacter pylori* as a model to follow DNA transformation. This
79 pathogen colonises the stomach of approximately half of the world's population and
80 the infection is associated with peptic ulcer disease and gastric cancer (9).
81 Eradication can be obtained with antibiotic treatment, however, during the last
82 decade, *H. pylori* antibiotic resistance has increased dramatically (10). This
83 augmentation, as well as the large spreading of infection, can be explained by the
84 high adaptability of these bacteria. *H. pylori* is indeed one of the most genetically
85 diverse bacterial species (11). Propagation of new alleles could be strongly favoured
86 by horizontal gene transfer coupled to clonal selection. Indeed, *H. pylori* is so far the
87 only bacterial species described as being constitutively competent. Frequent genetic
88 exchanges between *H. pylori* strains during co-infection (12); Suerbaum and
89 Achtman, 1999, Trends Microbiol, 7, 182-4; Suerbaum and Josenhans, 2007, Nat
90 Rev Microbiol, 5, 441-52} confirmed the presence in this pathogen of an efficient
91 system of DNA transformation and homologous recombination.

92 Several aspects of the overall process of transformation make of *H. pylori* a

93 unique case even among naturally competent Gram-negative bacteria, in particular
94 regarding the initial steps of the process (13). First, the type IV pilus type proteins
95 normally found in the most studied models are replaced by conjugation-type proteins
96 encoded by *comB2-B4* and *ComB6-B10* operons (14, 15). The second major
97 difference relies in the absence of a *ComE(A)* homolog for handling the incoming
98 DNA within the periplasm. Genetic evidence suggests that in *H. pylori*, double
99 stranded DNA (dsDNA) is transported across the outer membrane and into the
100 periplasm by the *ComB* complex (15). As in other species, dsDNA is supposed to be
101 then processed into single stranded DNA (ssDNA) within the periplasm or during
102 cytoplasm internalisation mediated by the inner membrane protein *ComEC*. No
103 protein has so far been identified in *H. pylori* as carrying out the processing of the
104 incoming dsDNA to yield ssDNA. While the periplasmic nuclease *NucT* has been
105 shown to be involved in transformation, its specific role is still unclear (16, 17).

106 Visualisation of the initial uptake of fluorescent DNA by *H. pylori* was first
107 achieved by K. Stingl et al. (7). This study led the authors to propose a two-step DNA
108 uptake mechanism at the cellular pole. By using Cy3-labelled DNA they were
109 however unable to see internalisation into the cytoplasm. We tested here a DNA
110 labelled by incorporation of another fluorescent nucleotide to follow its internalisation
111 into the cytoplasm. Using confocal microscopy analyses on living bacteria, we were
112 able to observe the formation of DNA foci and, for the first time, the subsequent
113 passage of the labelled DNA into the cytoplasm. Using this approach we show that,
114 unlike what has been described for other competent bacteria cell elongation and
115 division are not affected during transformation of *H. pylori*. We also demonstrate that
116 *ComEC* is required for the internalisation of the DNA into the *H. pylori* cytoplasm.

117

118 **MATERIALS AND METHODS**

119 **Oligonucleotides, enzymes and reagents**

120 Oligonucleotides used in this work were from Eurogentec. Restriction
121 endonucleases, DNA polymerases, and DNA modifying enzymes were purchased
122 from New England Biolabs. Culture media and antibiotics were from AES Chemunex
123 and Sigma Aldrich, respectively. Fluorescent nucleotides Atto-550-dUTP (aminoallyl-
124 dUTP) (Jena bioscience) were purchased from Euromedex and integrated in DNA by
125 PCR according to manufacturer's instructions.

126 **Strains and growth conditions**

127 All *Helicobacter pylori* strains were in 26695 background (18) and are listed in Table
128 S1. Plate cultures were grown at 37°C in microaerophilic conditions (5% O₂, 10%
129 CO₂, using the MAC-MIC system from AES Chemunex) on blood agar base medium
130 (BAB) supplemented with 10% defibrillated horse blood (AES) and an antibiotics mix.
131 Plates were incubated from 24 h to 5 days depending on the experiment or the
132 mutant selected. Liquid cultures were grown at 37°C with gentle shaking under
133 microaerophilic conditions in brain heart infusion media (BHI) supplemented with
134 10% defibrillated and de-complemented foetal bovine serum (Invitrogen).

135 To generate the corresponding mutant derivatives, the gene of interest (see list in
136 table S2) cloned with its flanking regions into pJET2.1 (Fermentas) was disrupted by
137 a non-polar cassette carrying either kanamycin- (Kn), apramycin- (Apra), or
138 Chloramphenicol- (Cm) resistance genes. DNA was introduced into *H. pylori* strains
139 by natural transformation and mutants were selected by growth on either 20 µg/ml
140 kanamycin (Kn), 12,5 µg/ml Apramycine (Apra) or 8 µg/ml chloramphenicol (Cm).
141 Allelic replacement was verified by PCR.

142 **Construction of strains expressing GFP**

143 The gene coding for the GFP-mut2 (referred as GFP in the text) was amplified by
144 PCR from plasmid pR1138 (p1257 provided by I.Boneca, Institut Pasteur, Paris) with
145 oligonucleotides OC26
146 (GCGGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAG) and OC28
147 (CGGGGTACCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC) as primers.

148 The 720-bp fragment was inserted into p946, a plasmid harbouring the 600bp around
149 HpUreA start codon. The fragment was inserted between the HpUreA promoter and
150 the antibiotic cassette (Kan resistance), leading to plasmid p1132 expressing Gfp-
151 mut2 under the control of HpUreA promoter. DNA was introduced into *H. pylori*
152 strains as described above. Allelic replacement was verified by PCR.

153 **Natural Transformation Assay**

154 200 ng of genomic DNA from strain LR133 (StrR) (19) was mixed with 15 µl of
155 exponentially growing cells resuspended in peptone water ($1,0 \cdot 10^5$ cells). Mixes were
156 spotted on BAB plates. After 24 hours at 37°C, dilutions of the resuspended spots
157 were plated on BAB with and without the appropriate antibiotic (50 µg/ml Str) and
158 incubated for 3 to 5 days. Transformation frequencies were calculated as the number
159 of resistant colonies per recipient cfu.

160 **PCR DNA labelling**

161 We used a 1,5 kb size fragment corresponding to the amplification of *hp954*
162 disrupted with the gene conferring apramycin resistance. For transformation tests
163 (Tables S3 and S4), we performed PCR with different amounts of fluorescent
164 nucleotides 550 ATTO. Incorporation rates were measured by spectroscopy analysis
165 according to manufacturer, and for microscopy analysis, we used fragments labelled
166 with 2 to 5% of incorporated fluorescent dUTP.

167 **Interaction of fluorescent DNA with *H. pylori***

168 200 ng of ATTO labelled tDNA was mixed with 20 µl of exponentially growing cells
169 (10^5 cells) resuspended in BHI medium. The suspension was incubated for 10 min at
170 37°C in microaerophilic conditions. The cells were then pelleted, washed once with
171 100µl of BHI and resuspended in 20µl of BHI.

172 **Confocal analysis of living bacteria**

173 For growth analysis, samples from exponentially growing bacteria were deposited on
174 35-mm glass bottom Petri dishes as indicated above. Live cell imaging was
175 performed in that case with a PLAN APO 40x objective (NA: 0.95).

176 Samples from bacteria interacting with fluorescent DNA were deposited on 35
177 mm glass bottom Petri dishes. The suspension was covered with BHI medium in
178 1,5% low melting agarose. Live-cell imaging was performed with an inverted Nikon
179 A1 confocal microscope equipped with an environmental chamber allowing the
180 control of temperature (37°C), humidity (90%) and gas mixture (10% CO₂, 3% O₂).
181 Fluorescent images were captured through a Plan APO λ 100x objective (NA: 1.45)
182 or a Plan APO 60x objective (NA: 1.40) by using optimal spatial resolution settings on
183 a Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted
184 ECLIPSE Ti (Nikon Corp., Tokyo, Japan). The cytoplasm compartment volume was
185 defined by using GFP staining (excitation with 488nm laser, emission collected with
186 an 500/50 nm filter set). Atto550 was excited with 532nm laser and emission
187 detected with a 595/50 nm filter set. Image captions were performed every 10
188 minutes during 2 to 10 hours. Image treatment and analysis were performed using
189 NIS and ImageJ software. Three-dimensional image reconstructions and dynamic
190 measurements were done using Volocity® software (Perkin Elmer, Waltham, USA).

191

192

193 **RESULTS**

194

195 **Foci formation on *Helicobacter pylori* with ATTO fluorescent DNA.**

196 Direct visualisation of incoming DNA during transformation has been attempted in
197 several bacterial models. In most cases, labelling of the transforming DNA (tDNA) for
198 microscopy studies was done with intercalating fluorescent dyes. A major limitation of
199 this approach is that intercalating dyes cause significant distortion in the DNA
200 conformation, most likely interfering with its processing by the transformation
201 apparatus. Furthermore, depending on the dye, ssDNA is not efficiently labelled,
202 precluding the observation of later steps of the transformation process. Alternatively,
203 Cy-labelled nucleotides have been used but the results obtained suggested that the
204 modified nucleotides prevent the passage of ssDNA through the inner-membrane (7).
205 In order to overcome these limitations, we chose a fluorescently tagged nucleotide
206 that could be inserted into the DNA by PCR and therefore potentially processed as a
207 regular nucleotide by bacterial proteins. ATTO nucleotides can be integrated into
208 DNA by a Taq polymerase. We used PCR fragments labelled with dUTP-ATTO550
209 (see materials and methods) to analyse tDNA foci formation on *H. pylori*. Figure 1
210 shows that ATTO-labelled DNA can be used to follow tDNA association with the
211 bacteria. Quantification revealed that about 30% of the bacteria display labelled foci
212 (Table 1). As with Cy-labelled probes (7), ATTO-labelled tDNA foci are resistant to
213 DNase treatment (data not shown) and preferentially form at the cell pole (Figure 1).
214 To confirm that the foci formed by the ATTO-labelled tDNA are associated with
215 transformation, we monitored their formation in strains disrupted in different *com*
216 genes with the consequent loss of competence (Figure 1 and Table 1).

217 In $\Delta comB2$ strains where the outer membrane DNA transport complex is

218 inactivated, tDNA foci were essentially absent (<1% of the cells) as found with
219 YOYO-labelled DNA (7). This result confirms the specificity of the ATTO-labelled
220 tDNA foci detected in ComB-proficient bacteria. By analogy with other species, it was
221 proposed that the ComEC protein is localised in *H. pylori* inner membrane and
222 participates to single-stranded tDNA transfer from the periplasm into the cytoplasm
223 (7). Using ATTO-labelled tDNA, we confirmed the presence of foci in *comEC* mutant
224 strains at levels similar to those of the *wild type* strain (Figure 1 and Table1). Taken
225 together, these results show that whereas both the ComB complex and the ComEC
226 putative pore protein are essential for transformation, assembly of tDNA foci in the
227 periplasm requires the outer membrane ComB transport system but not ComEC,
228 supporting the two-step internalisation model.

229

230 **Tracking tDNA in living cells**

231 In order to analyse the initial steps of DNA uptake, we followed the fluorescent
232 ATTO-labelled DNA in living *H. pylori* cells by time-lapse confocal microscopy. It was
233 first necessary to set up the conditions for normal growth during image acquisition.
234 Figure 2A presents an example of lapse time microscopy of an *H. pylori* 26695
235 overnight culture, showing that it is possible to follow the dividing bacteria for over 15
236 hours. From several similar experiments we determined a 2.5 hours generation time
237 under conditions used for image acquisition, in good agreement with the generation
238 time observed for the same strain in liquid cultures (20).

239 To assess the transformation dynamics, we incubated bacteria with ATTO-
240 labelled DNA for 10 minutes and washed them before spreading on glass-bottom
241 petri dish and covering them with a layer of low-melting agarose (see Materials and
242 Methods). The initial images were then captured 30 minutes after mixing the tDNA

243 and the bacterial culture, the time necessary for mounting the slides and identifying
244 positions for image acquisition. Figure 2B presents some examples of tDNA on the
245 *wt* strain at different times. The images show that the tDNA was preferentially
246 retained at the pole of the cell as previously described (7). Binding of the tDNA to the
247 cell surface did not prevent or slow down bacterial division. Indeed, cells harbouring
248 foci divided at the same rate than foci-free bacteria (Fig. 2B), indicating that
249 transformation does not require a pause in cell cycling. The kinetics experiments
250 revealed that the percentage of bacteria presenting distinct fluorescent DNA foci
251 decreased progressively over time (Fig. 2B). In most cases the foci diffused into the
252 cell, suggesting the internalisation of the tDNA and its processing within the
253 cytoplasm.

254 We then analysed the impact of disabling ComB or ComEC on the dynamics
255 of tDNA foci. As expected, in the $\Delta comB2$ strain the proportion of bacteria interacting
256 with DNA remained very low (data not shown). In $\Delta comEC$ bacteria, while the overall
257 rate of disappearance of the foci is similar to that of wild type cells, the foci dynamics
258 are qualitatively different. In *wt* cells foci diffuse along the bacteria before
259 disappearing, whereas in $\Delta comEC$ cells, they retain a globular shape over time and
260 remain in most cases at the bacterial pole (Fig. 2C and 3B).

261

262 **Internalisation of tDNA in living cells**

263 To better follow the tDNA and assess its internalisation in living cells, we labelled the
264 bacterial cytoplasm by expressing a soluble GFP protein in *wt* and $\Delta comEC$ strains.
265 Expression of the fluorescent protein did not affect cell division or growth in our
266 experimental setup. Moreover, we optimised image acquisition conditions to keep a
267 constant GFP signal over time, and therefore were able to follow the GFP

268 fluorescence at constant intensity during 10 hours (data not shown). Using these
269 GFP expressing bacteria, we set up an experiment similar to that described for
270 Figure 2B to follow the fate of the ATTO-labelled tDNA. Figure 3A presents examples
271 of internalisation of tDNA foci in the *wt* strain over 140 minutes after the first image
272 (around 180 minutes after exposure of the cells to the tDNA). Using 3D analysis, we
273 colourised the part of tDNA whose signal overlaps with the GFP-labelled cytoplasm.
274 It is worth noticing that at the time of the first image acquisition (30 minute time point)
275 a significant fraction of the focus can be found within the cell, indicating a fast
276 internalisation process. When we performed the same experiment with a GFP
277 expressing strain disrupted for *comEC* (Figure 3B), the fraction of tDNA inside the
278 mutant bacteria was much smaller than in the *wt* strain (Figure 4A). Whereas in the
279 *wt* strain the mean value of co-localisation reached 90% after 2 hours, it stagnated at
280 44% in the $\Delta comEC$ strain. This latter overlap is likely due to the resolution limit of
281 our system. Moreover, while the average of the volumes of the tDNA foci increased
282 with time in the *wt* strain, it remained at the same low level in the $\Delta comEC$ mutant
283 (figure 4B).

284 To better analyse the dynamics of the tDNA foci in the two strains, we
285 established two categories of foci, one corresponding to those that displayed 0 to
286 45% overlap with GFP, considering them as being outside the cytoplasm, in the
287 periplasm, or undefined due to the resolution limit of the images (in grey in Figures
288 4C and 4D), and the other to those for which the overlap volume with the GFP was
289 between 45 and 100% of the focus, therefore mainly in the cytoplasm (in black in
290 figures 4C and 4D). In *wt* cells, at the start of the experiment, the proportion of foci
291 mostly outside was similar to the proportion of foci mostly internalised. However, the
292 proportion of the foci in the cytoplasm strongly increased over time and represented

293 the majority of the tDNA foci after 150 minutes of interaction. Conversely, in the case
294 of $\Delta comEC$ cells, periplasmic foci were twice more abundant than those within the
295 cytoplasm and the distribution remained stable over time (Figure 4D). Taken together
296 these results support the proposed role of ComEC as the transporter of the tDNA
297 through the *H. pylori* inner membrane.

298

299 **DISCUSSION**

300 The first localisation study of fluorescent tDNA was reported ten years ago for
301 *B. subtilis* (6). Fluorescent dsDNA (alexa 555) was shown to initially localise at the
302 pole in *Bacillus subtilis* cells in close proximity to ComGA, a protein required for tDNA
303 binding to the cell surface. In *Neisseria gonorrhoeae*, the use of fluorescent DNA
304 revealed the dynamics of the DNA in the periplasm during the early stages of
305 transformation (2). In *Streptococcus pneumoniae*, end labelled tDNA (Cy-dsDNA)
306 was found to form foci at the cell equator where it co-localises with ComEA and the
307 EndA nuclease (5). For *H. pylori* the initial localisation of fluorescently labelled tDNA
308 was also shown to be at the cell poles (7). The dyes used in that study, however,
309 seemed to interfere with the transport of the tDNA through the inner membrane
310 precluding the visualisation of a fluorescent tDNA beyond the periplasm. More
311 generally, no direct observation by microscopy of tDNA entering into the cytoplasm
312 during natural transformation of bacteria was reported up to now.

313 Here we show that the transfer of ATTO-labelled DNA through both
314 membranes and into the cytoplasm can be visualised directly. Because the
315 fluorescent moiety interferes with the incorporation of the ATTO-labelled DNA into
316 the host chromosome (Tables S3 and S4), we cannot rule out an effect of the label
317 on the processing of the tDNA. However, its efficient translocation across both

318 membranes indicates that the approach described in this work is suitable for tracking
319 DNA during transformation. Moreover, although *in vivo* analysis of a GFP fusion
320 protein expression was published (6) no time-lapse microscopy analysis of *H. pylori*
321 growth was previously reported. This was probably due to the difficulties encountered
322 for optimising culture conditions for this microaerophilic organism within a microscope
323 observation setup. We used here a confocal microscope equipped with an
324 environmental chamber allowing the control of temperature, humidity and gas mixture
325 (see material and methods). The generation time observed was comparable to that
326 previously observed for liquid cultures of the same strain (20). Furthermore, the
327 constitutive expression of a soluble GFP protein provides a convenient way to
328 determine with little ambiguity when the incoming DNA is present within the
329 cytoplasm by performing overlap analysis of the DNA and the GFP signals. This
330 approach, allowed us to determine that, unlike the case of other competent species
331 studied, the DNA uptake process *H. pylori* is not associated with an inhibition of cell
332 elongation or division. This is consistent with the constitutive nature of competence in
333 this species

334 As previously shown using Cy-labelled DNA, ComB proteins are required for
335 the formation of tDNA foci in the cell periphery. By analogy to the published data
336 obtained with Cy-labelled tDNA (7) and because they are DNase-resistant, it is fair to
337 presume that the ATTO-labelled DNA foci are located in the periplasm. Here, we
338 provide evidence in support of their periplasmic location by showing that in strains in
339 which the gene coding for ComEC is disrupted the foci are stabilised at the periphery
340 of the cell while in wild type cells the DNA signal is internalised into the cytoplasm.
341 While it is widely accepted that ComEC is required for the transfer of tDNA through
342 the inner membrane and into the cytoplasm (21), our results in *H. pylori* and those of

343 Seitz and Blockesch in *V. cholerae* (8) are the first to demonstrate that in $\Delta comEC$
344 mutant strains a DNA proficient for the whole internalisation process remains blocked
345 in the periplasm. We conclude that these results, together with ComEC predicted
346 channel protein characteristics, confirm this protein as the pore through which DNA
347 crosses the inner membrane during transformation of Gram negative bacteria. They
348 also corroborate the two-step internalisation process in Gram-negative bacteria.

349 In conclusion, we presented here an alternative fluorescent DNA labelling that
350 allows to directly visualize the tDNA all the way up to its internalisation into the
351 bacterial cytoplasm. Using this approach we demonstrate that ComEC is required for
352 the passage of the tDNA through the inner membrane. This approach can probably
353 be used in any transformable bacteria to follow directly the tDNA.

354

355 **ACKNOWLEDGEMENTS**

356 We thank Anna Campalans for critical reading of the manuscript, Esma Bentchikou
357 for helpful discussions, Elea Dizet and Emily Orillard for technical assistance and Ivo
358 Boneca for the gift of the plasmid expressing GFP-mut2. We also thank the IRCM
359 microscopy facility for technical support and advice.

360

361 **FUNDING**

362 This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche
363 (ANR-09-BLAN-0271) and CEFIPRA (5203-5) and a doctoral fellowship to CC from
364 the Region Ile de France (Maladies Infectieuses DIM120089)

365

366

367 **REFERENCES**

368

- 369 1. **Facijs, D., and T. F. Meyer.** 1993. A novel determinant (comA) essential for natural
370 transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a comA defect
371 on pilin variation. *Mol Microbiol* **10**:699-712.
- 372 2. **Gangel, H., C. Hepp, S. Muller, E. R. Oldewurtel, F. E. Aas, M. Koomey, and B.**
373 **Maier.** 2014. Concerted Spatio-Temporal Dynamics of Imported DNA and ComE DNA
374 Uptake Protein during Gonococcal Transformation. *PLoS Pathog* **10**:e1004043.
- 375 3. **Seitz, P., and M. Blokesch.** 2013. DNA-uptake machinery of naturally competent
376 *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:17987-17992.
- 377 4. **Seitz, P., H. Pezeshgi Modarres, S. Borgeaud, R. D. Bulushev, L. J. Steinbock, A.**
378 **Radenovic, M. Dal Peraro, and M. Blokesch.** 2014. ComEA Is Essential for the
379 Transfer of External DNA into the Periplasm in Naturally Transformable *Vibrio cholerae*
380 Cells. *PLoS Genet* **10**:e1004066.
- 381 5. **Berge, M. J., A. Kamgoue, B. Martin, P. Polard, N. Campo, and J. P. Claverys.**
382 2013. Midcell Recruitment of the DNA Uptake and Virulence Nuclease, EndA, for
383 Pneumococcal Transformation. *PLoS Pathog* **9**:e1003596.
- 384 6. **Hahn, J., B. Maier, B. J. Haijema, M. Sheetz, and D. Dubnau.** 2005. Transformation
385 proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* **122**:59-71.
- 386 7. **Stingl, K., S. Muller, G. Scheidgen-Kleyboldt, M. Clausen, and B. Maier.** 2010.
387 Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl*
388 *Acad Sci U S A* **107**:1184-1189.
- 389 8. **Seitz, P., and M. Blokesch.** 2014. DNA transport across the outer and inner
390 membranes of naturally transformable *Vibrio cholerae* is spatially but not temporally
391 coupled. *MBio* **5**
- 392 9. **Ford, A. C., and A. T. Axon.** 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and
393 public health implications. *Helicobacter* **15 Suppl 1**:1-6.
- 394 10. **De Francesco, V., F. Giorgio, C. Hassan, G. Manes, L. Vannella, C. Panella, E.**
395 **Ierardi, and A. Zullo.** 2010. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic
396 review. *J Gastrointest Liver Dis* **19**:409-414.
- 397 11. **de Reuse, H., and S. Bereswill.** 2007. Ten years after the first *Helicobacter pylori*
398 genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability
399 and adaptability of a persistent pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**:165-176.

- 400 12. **Kraft, C., A. Stack, C. Josenhans, E. Niehus, G. Dietrich, P. Correa, J. G. Fox, D.**
401 **Falush, and S. Suerbaum.** 2006. Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori*
402 infection. *J Bacteriol* **188**:249-254.
- 403 13. **Hofreuter, D., S. Odenbreit, J. Puls, D. Schwan, and R. Haas.** 2000. Genetic
404 competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. *Res*
405 *Microbiol* **151**:487-491.
- 406 14. **Hofreuter, D., S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Natural transformation competence
407 in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion
408 system. *Mol Microbiol* **41**:379-391.
- 409 15. **Karnholz, A., C. Hoefler, S. Odenbreit, W. Fischer, D. Hofreuter, and R. Haas.**
410 2006. Functional and topological characterization of novel components of the comB
411 DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **188**:882-
412 893.
- 413 16. **O'Rourke, E. J., A. V. Pinto, E. A. Petroni, M. E. Tolmasky, and L. Ielpi.** 2004.
414 Evidence for the active role of a novel nuclease from *Helicobacter pylori* in the
415 horizontal transfer of genetic information. *J Bacteriol* **186**:2586-2593.
- 416 17. **Humbert, O., M. S. Dorer, and N. R. Salama.** 2011. Characterization of *Helicobacter*
417 *pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-
418 strain DNA recombination. *Mol Microbiol* **79**:387-401.
- 419 18. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D.**
420 **Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J.**
421 **Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R.**
422 **Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D.**
423 **Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J.**
424 **M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E.**
425 **Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J.**
426 **C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter*
427 *pylori*. *Nature* **388**:539-547.
- 428 19. **Marsin, S., A. Mathieu, T. Kortulewski, R. Guerois, and J. P. Radicella.** 2008.
429 Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS*
430 *Genet* **4**:e1000146.
- 431 20. **Orillard, E., J. P. Radicella, and S. Marsin.** 2011. Biochemical and Cellular
432 Characterization of *Helicobacter pylori* RecA, a Protein with High-Level Constitutive
433 Expression. *J Bacteriol* **193**:6490-6497.

434 21. **Draskovic, I., and D. Dubnau.** 2005. Biogenesis of a putative channel protein,
435 ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation
436 of disulphide bonds. *Mol Microbiol* **55**:881-896.

437

438

439

440 **TABLE AND FIGURES LEGENDS**

441

442 **Table 1: Transformation rates and DNA foci formation in different *H. pylori*** 443 **strains**

444 Transformation frequencies were measured as indicated in material and methods on
445 at least five independent experiments.

446 The percentage of bacteria harbouring foci are indicated for the different strains +/-
447 standard deviation. At least 3 independent experiments of foci formation were
448 analysed after 30 minutes of incubation (see material and methods) and more than
449 500 bacteria were counted.

450

451 **Figure 1. tDNA foci formation in *WT* 26695 cells.**

452 Bacteria from exponential cultures of *wt*, $\Delta comEC$ or $\Delta comB2$ strains were incubated
453 with 550-ATTO-labelled DNA. After 30 minutes of incubation images were obtained
454 with a confocal microscope as described in Materials and Methods.

455 A. Z maximum projection images are presented. Merged images of ATTO550 (in red)
456 and Differential Interference Contrast (DIC) are shown. Arrows indicate the tDNA
457 foci. Scale bars correspond to 2 μm .

458 B. Proportion of bacteria harbouring one (soft grey), two (dark grey) or more than two
459 foci (black) are indicated for each strain on the graph. At least 3 independent
460 experiments were analysed and more than 900 bacteria were counted.

461

462 **Figure 2. Foci dynamics in living *WT* 26695 cells**

463 A. Microscope visualisation of cell division. Bacteria from an exponential culture were
464 plated under low melting agarose in BHI medium as described in Materials and
465 Methods. Images obtained with a x40 objective at the indicated times correspond to
466 the Z maximum projections of confocal images. Scale bars correspond to 5 μm .

467 B. Foci formation on living bacteria. 26695 bacteria from an exponential culture were
468 incubated with 550-ATTO-labelled DNA before microscope analysis as indicated in
469 Materials and Methods. Three representative bacteria displaying foci are shown over
470 time. The first time shown (30 minutes) corresponds to the time required for sample
471 preparation for microscopy after exposure of the bacteria to tDNA. Images obtained
472 with a x100 objective correspond to Z maximum projections of confocal images.
473 Merged images of ATTO550 (in red) and Differential Interference Contrast (DIC) are
474 shown. Scale bars correspond to 1 μm .

475

476 **Figure 3. Foci internalisation in living cells**

477 *WT* (A) or ΔcomEC (B) GFP-expressing bacteria from exponential cultures were
478 incubated with 550-ATTO-labelled DNA before microscope analysis as described in
479 Materials and Methods. Three representative bacteria harbouring foci were followed
480 over time. Images obtained with a x100 objective at indicated times correspond to the
481 Z maximum projections of confocal images. Scale bars correspond to 1 μm . For each
482 bacterium, 3D overlap between (GFP) and ATTO550 (red) was determined with
483 Volocity software and is indicated in white. The white signal appears stronger than
484 the ATTO signal because it does not represent the intensity of the signal but just its
485 overlapping with the GFP.

486

487 **Figure 4. 4D tracking of tDNA in living bacteria.**

488 GFP-expressing bacteria from exponential cultures were incubated with 550-ATTO-
489 labelled DNA before microscope analysis. 3D overlap was established between GFP
490 and tDNA (ATTO550) with Volocity software as indicated in Materials and Methods.
491 45 bacteria for the WT strain and 41 bacteria for the $\Delta comEC$ were analysed.

492 A. Percentage of overlap. The mean of the percentage of overlap calculated for each
493 detected focus is represented +/- SEM. Kruskal-Wallis statistics indicate that WT
494 curve is significantly different from the one of $\Delta comEC$ ($p < 0.0001$).

495 B. Volume of internalised foci. The mean of the volume of detected foci that
496 overlapped with GFP is indicated +/- SEM. Kruskal-Wallis statistics indicate that WT
497 curve is significantly different from the one of $\Delta comEC$ ($p < 0.0001$).

498 C and D. Evolution of foci populations. In black is represented the proportion of foci
499 that presented between 45% and 100% of overlapping with GFP. In grey is
500 represented the proportion of foci that presented less than 45% of overlapping with
501 GFP.

Table 1: Transformation rates and DNA foci formation in different *H. pylori* strains

Genotype	Transformation frequency (strR/CFU)(x10 ⁻⁴)	% cells with foci	% cells with		
			1 foci	2 foci	>2 foci
WT	3,1(± 4,9)	31,7 (± 5,2)	25,3 (± 1,7)	5,5 (± 4,0)	1,0 (± 0,8)
$\Delta comEC$	< 0,0001	21,0 (± 3,0)	21,5 (± 3,0)	3,3 (± 1,5)	0,2 (± 0,2)
$\Delta comB2$	< 0,0001	0,8 (± 0,6)	0,8 (± 0,6)	nd	nd

Transformation frequencies were measured as indicated in material and methods on at least five independent experiments.

The percentage of bacteria harboring foci are indicated for the different strains +/- standard deviation. At least 3 independent experiments of foci formation on bacteria were analyzed after 30 minutes of incubation (see material and methods) and more than 900 bacteria were counted.

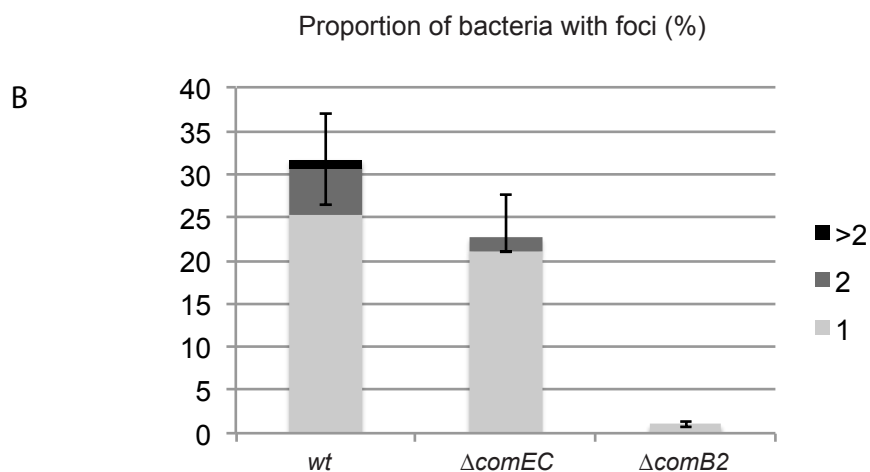
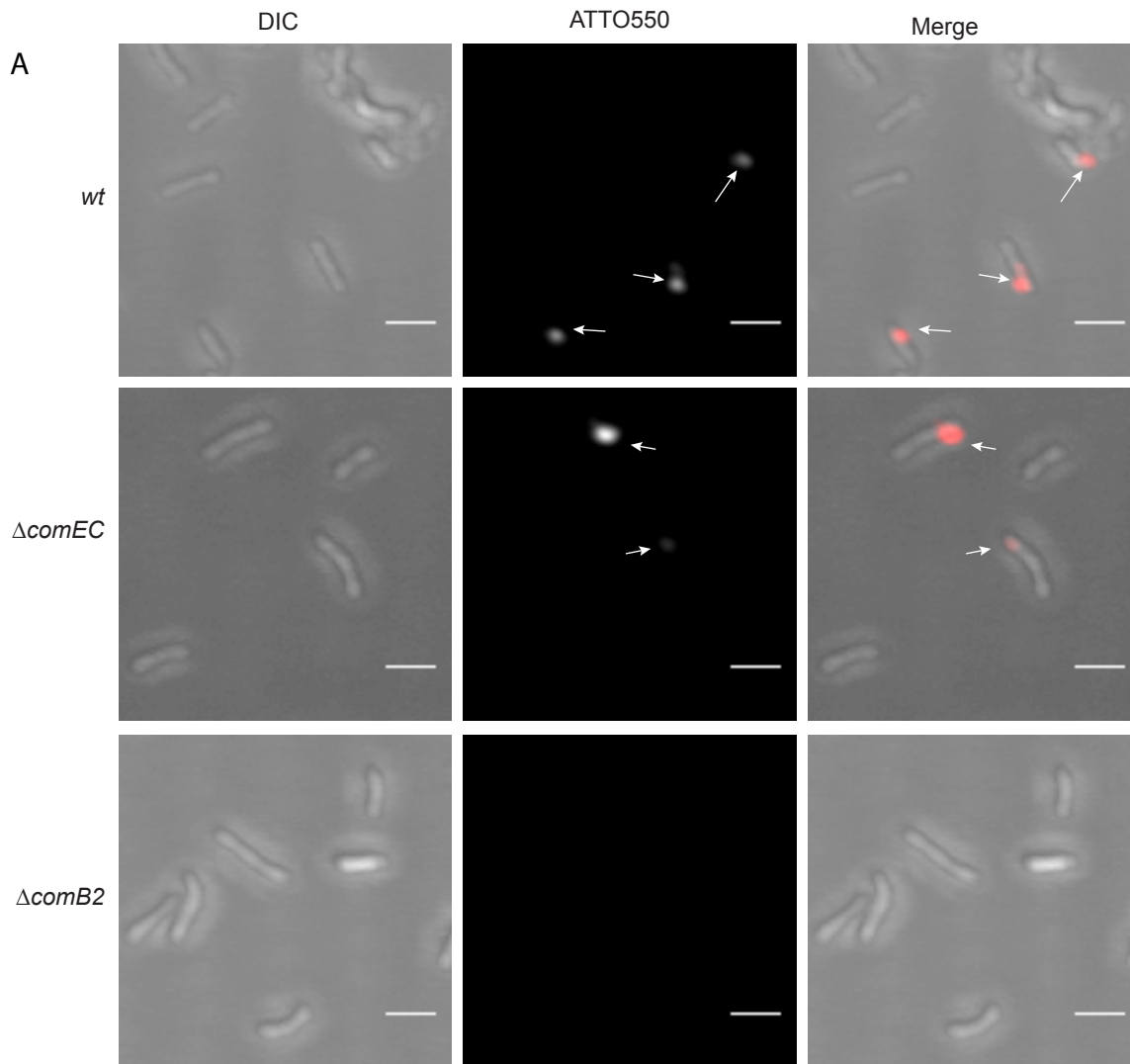


Figure 1. tDNA foci formation in WT 26695 cells.

Bacteria from exponential cultures of *wt*, $\Delta comEC$ or $\Delta comB2$ strains were incubated with 550-ATTO-labelled DNA. After 30 minutes of incubation images were obtained with a confocal microscope as described in Materials and Methods.

A. Z maximum projection images are presented. Merged images of ATTO550 (in red) and Differential Interference Contrast (DIC) are shown. Arrows indicate the tDNA foci. Scale bars correspond to 2 μm .
 B. Proportion of bacteria harbouring one (soft grey), two (dark grey) or more than two foci (black) are indicated for each strain on the graph. At least 3 independent experiments were analysed and more than 900 bacteria were counted.

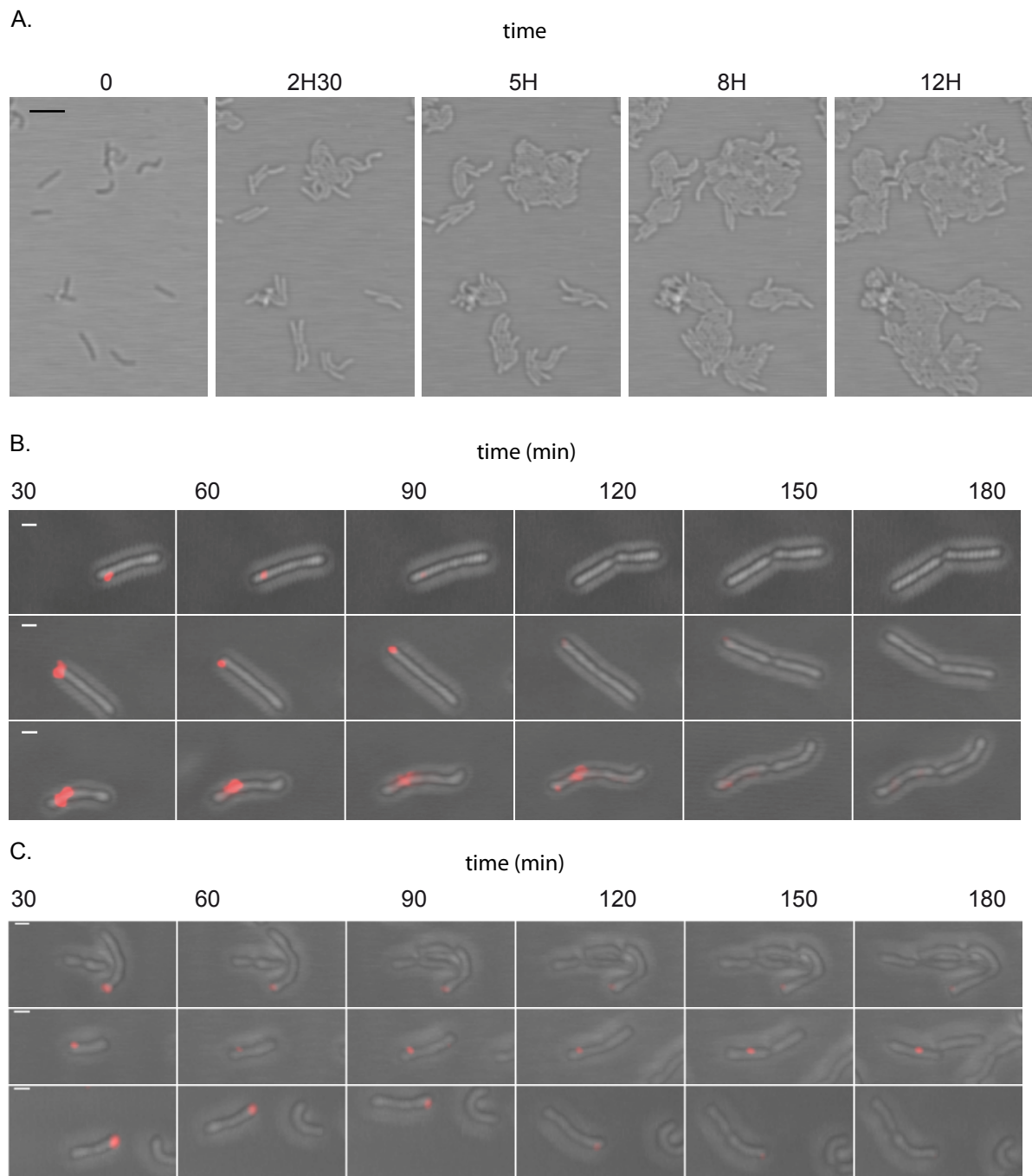


Figure 2. Foci dynamics in living WT 26695 cells

A. Microscope visualisation of cell division. Bacteria from an exponential culture were plated under low melting agarose in BHI medium as described in Materials and Methods. Images obtained with a x40 objective at the indicated times correspond to the Z maximum projections of confocal images. Scale bars correspond to 5 μ m.

B. Foci formation on living bacteria. 26695 bacteria from an exponential culture were incubated with 550-ATTO-labelled DNA before microscope analysis as indicated in Materials and Methods. Three representative bacteria displaying foci are shown over time. The first time shown (30 minutes) corresponds to the time required for sample preparation for microscopy after exposure of the bacteria to tDNA. Images obtained with a x100 objective correspond to Z maximum projections of confocal images. Merged images of ATTO550 (in red) and Differential Interference Contrast (DIC) are shown. Scale bars correspond to 1 μ m.

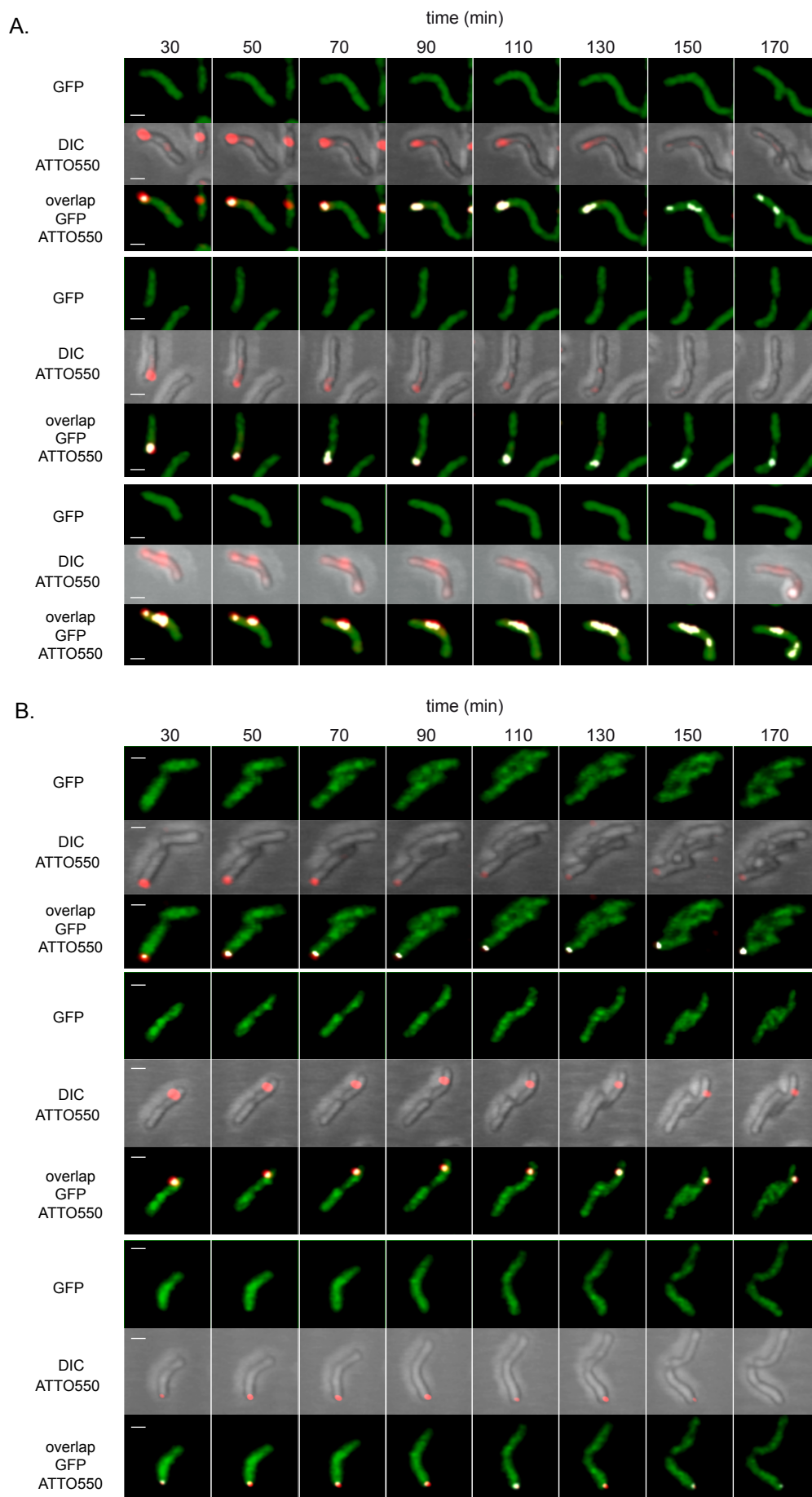


Figure 3. Foci internalisation in living cells

WT (A) or Δ comEC (B) GFP-expressing bacteria from exponential cultures were incubated with 550-ATTO-labelled DNA before microscope analysis as described in Materials and Methods. Three representative bacteria harbouring foci were followed over time. Images obtained with a x100 objective at indicated times correspond to the Z maximum projections of confocal images. Scale bars correspond to 1 μ m. For each bacterium, 3D overlap between (GFP) and ATTO550 (red) was determined with Volocity software and is indicated in white. The white signal appears stronger than the ATTO signal because it does not represent the intensity of the signal but just its overlapping with the GFP.

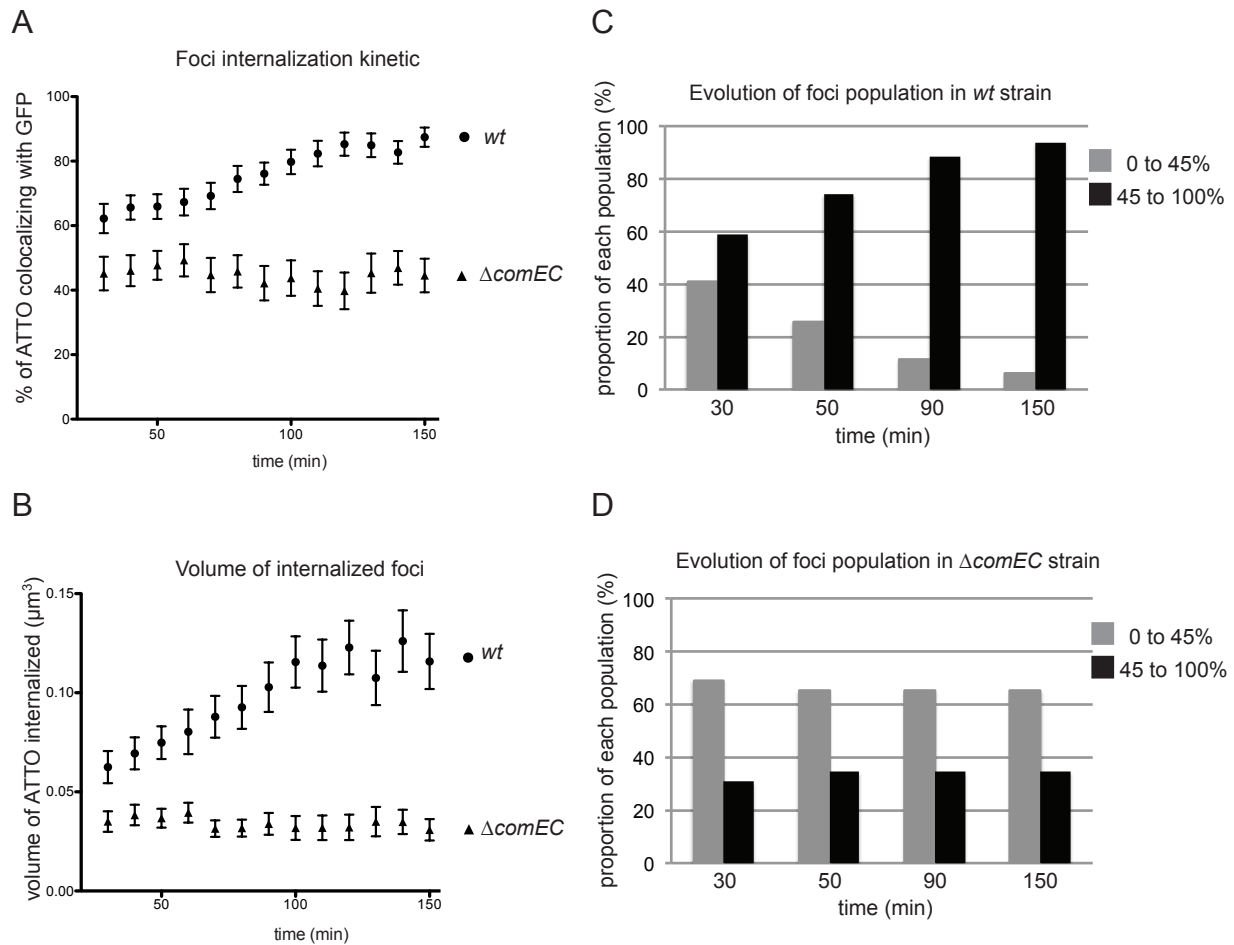


Figure 4. 4D tracking of tDNA in living bacteria.

GFP-expressing bacteria from exponential cultures were incubated with 550-ATTO-labelled DNA before microscope analysis. 3D overlap was established between GFP and tDNA (ATTO550) with Volocity software as indicated in Materials and Methods. 45 bacteria for the WT strain and 41 bacteria for the $\Delta comEC$ were analysed.

A. Percentage of overlap. The mean of the percentage of overlap calculated for each detected focus is represented +/- SEM. Kruskal-Wallis statistics indicate that WT curve is significantly different from the one of $\Delta comEC$ ($p < 0.0001$).

B. Volume of internalised foci. The mean of the volume of detected foci that overlapped with GFP is indicated +/- SEM. Kruskal-Wallis statistics indicate that WT curve is significantly different from the one of $\Delta comEC$ ($p < 0.0001$).

C and D. Evolution of foci populations. In black is represented the proportion of foci that presented between 45% and 100% of overlapping with GFP. In grey is represented the proportion of foci that presented less than 45% of overlapping with GFP.

Table S1: Correspondence between *H. pylori* open reading frame numbers and genes

gene	<i>comB2</i>	<i>comB6</i>	<i>comEC</i>
Orf number	Hp0015	Hp0037	Hp1361

Table S2: *H. pylori* Strains

Strain	Relevant Genotype	From
LR1	26695	
LR133	26695 str ^R	{Marsin et al., 2008, PLoS Genet, 4, e1000146}
LR768/LR769	26695 <i>comB2::Cm</i>	This work
LR770/LR771	26695 <i>comB2::Km</i>	This work
LR711	26695 <i>comB6::Km</i>	This work
LR776/LR777	26695 <i>comEC::Km</i>	This work
LR887	26695 <i>pUreA-GFPmut2-Km</i>	This work
LR901/LR902	26695 <i>pUreA-GFPmut2-Km comEC::Cm</i>	This work
LR903/LR904	26695 <i>pUreA-GFPmut2-Km comB2::Cm</i>	This work

Table S3: Transformation rate of ATTO labelled DNA in *H. pylori* 26695*

The average number of dye-dUTP coupled into a 1500 bp PCR fragment	Transformation rate
0	$1,1 \cdot 10^{-7}$
11	$2,9 \cdot 10^{-8}$
14	$5,2 \cdot 10^{-9}$

*Spontaneous mutation rate $< 2 \cdot 10^{-9}$

Table S4: Transformation rate of ATTO labelled DNA in *H. pylori* 26695*

The average number of dye-dUTP coupled into a 405 bp PCR fragment	Transformation rate
0	$4 \cdot 10^{-4} (\pm 5,3)$
7	$1,5 \cdot 10^{-5} (\pm 0,2)$
11	$4,8 \cdot 10^{-6} (\pm 0,8)$
24	$3,8 \cdot 10^{-7} (\pm 0,9)$
40	$3,2 \cdot 10^{-7} (\pm 0,9)$

*Spontaneous mutation rate $< 2 \cdot 10^{-9}$

C- Travaux complémentaires sur la visualisation de la transformation

La méthode de visualisation de la transformation sur cellules vivantes qui a été utilisée dans l'article présenté précédemment implique un décalage de 30 min entre le moment où les bactéries sont mises en présence de l'ADN fluorescent et le moment où l'acquisition d'images commence. Nous sommes donc incapables de visualiser les toutes premières minutes de la capture de l'ADN. De telles données pourraient pourtant nous permettre d'affiner le modèle de transformation de *H. pylori*. On pourrait par exemple estimer la vitesse à laquelle la bactérie est capable de capturer l'ADN ou même déterminer si l'ADN est capturé de manière homogène sur la surface cellulaire puis concentré au pôle sous forme de foci ou si il y a directement formation de ces foci. Conscients de cette lacune, nous avons décidé d'acquérir un système de microfluidique (cell ASIC, millipore) (figure 19) et de l'utiliser pour visualiser les premières étapes de la transformation chez *H. pylori*.

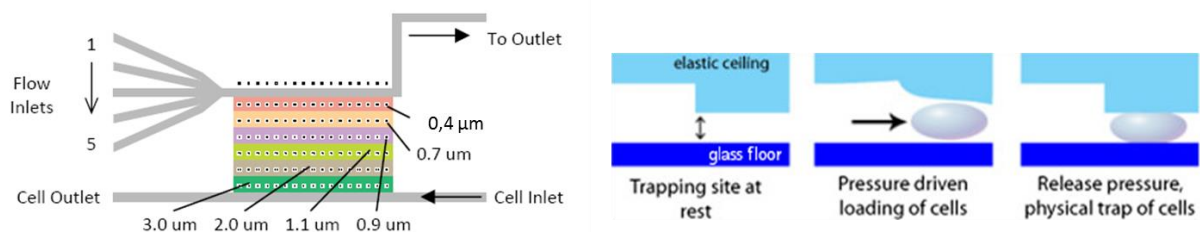
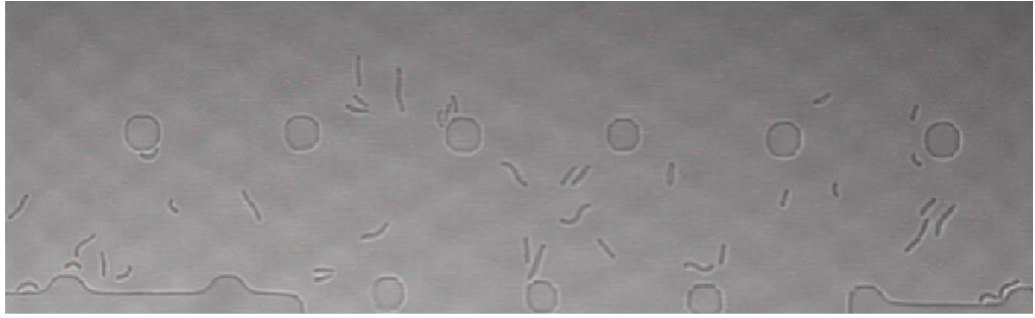


Figure 19 : Système de microfluidique Cell Asic. Le système est un système pressurisé constitué d'une chambre gaz perméable possédant plusieurs hauteurs de plafond allant de 0.4 à 3.0 μm . Un canal permet aux cellules bactériennes de rentrer dans la chambre. Un autre canal situé de l'autre côté de la chambre permet d'injecter jusqu'à 5 solutions différentes dont le milieu de culture. Lors de l'injection des cellules les plafonds de la chambre vont se soulever légèrement. Une fois l'injection terminée, les plafonds retombent et coincent les bactéries dans une zone précise de la chambre en fonction de leurs tailles.

En dépit des nombreuses conditions testées, quasiment aucune croissance bactérienne n'a pu être observée avec *H. pylori* dans ce dispositif (Figure 20). Le fait que des cellules d'*E. coli* poussent tout à fait normalement dans ces mêmes conditions (résultats non présentés) nous laisse penser que ce système de microfluidique est incompatible avec notre modèle d'étude. Nous n'avons aucune certitude quant aux raisons de cette incompatibilité, mais il est possible que le stress occasionné par le système sur la membrane bactérienne altère cette dernière et empêche toute division.

T=0



T=12h

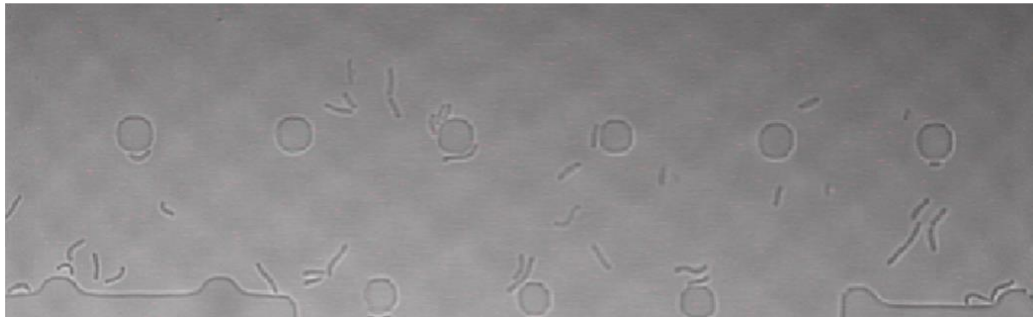


Figure 20 : Croissance de la souche *H. pylori* 26695 dans un système de microfluidique Cell Asic. 12H après lancement de l'acquisition certaines cellules se sont légèrement déplacées mais aucune cellule ne s'est divisée.

II- Défauts de réparation et compétence

A- Problématique de recherche

Comme précisé précédemment, *H. pylori* est une bactérie constitutivement compétente. Cependant, l'existence de pics de transformation laisse supposer qu'il existe bel et bien un système de régulation.

De plus, Dorer et ses collègues ont démontré que chez *H. pylori* la compétence pouvait être augmentée par les dommages à l'ADN. Ils proposent un modèle où l'accumulation de dommages à l'ADN déclencherait l'induction de la compétence chez *H. pylori* et que cette induction serait dépendante de la présence de RecA.

Nous avons déjà observé au sein du laboratoire que la fréquence de transformation était augmentée dans des souches mutées pour certaines voies de réparation (Marsin et al., 2008 ; Marsin et al., 2010). Nous avons donc décidé de caractériser plus précisément quels sont les défauts de réparation qui induisent la compétence chez *H. pylori* et quels sont ceux qui ne l'induisent pas.

B- Visualisation des foci d'ADN sur des cellules fixées

Il a été décrit que chez *H. pylori* l'accumulation de dommages à l'ADN menait à une augmentation de l'expression des gènes de compétence dont les gènes du T4SS. Une telle induction du T4SS devrait en toute logique être accompagnée d'une augmentation de la quantité d'ADN capturé. Nous avons donc décidé de vérifier cette hypothèse par des expériences de visualisation de foci d'ADN fluorescents comme décrit dans l'article 1. Afin de pouvoir réaliser des statistiques, le nombre de cellules comptées ainsi que le nombre d'expériences indépendantes réalisées doivent être relativement importants. Les acquisitions sur cellules vivantes étant particulièrement lourdes et coûteuses, nous avons donc plutôt décidé d'appliquer cette technique sur des cellules bactériennes fixées.

Il a tout d'abord été nécessaire de vérifier que la fixation à la PFA n'induisait pas une différence de phénotype par rapport aux observations obtenues sur les cellules vivantes. Différentes expériences de visualisation de foci ont donc été effectuées sur des souches de *H. pylori* WT, des mutants du T4SS ($\Delta comB2$, $\Delta comB6$) et le mutant $\Delta comEC$ (Figure 21). Nous avons ainsi pu observer que l'absence de T4SS induit une diminution drastique du nombre de cellules présentant des foci et que le mutant $\Delta comEC$ présente un nombre de cellules avec foci relativement similaire à la souche WT. Ces résultats étant similaires à ceux obtenus lors des expérimentations sur cellules vivantes, on peut donc conclure que la fixation à la PFA n'altère pas les phénotypes et donc que notre méthode de visualisation des foci est applicable à des cellules fixées.

On remarque néanmoins que, si les phénotypes sont conservés, les valeurs absolues du nombre de cellules fixées avec foci sont inférieures aux valeurs observées sur cellules vivantes et cela pour chaque souche. Cette diminution du nombre de foci par cellule est probablement due à une altération de l'interaction ADN/protéine par la PFA ou à une détérioration de l'ADN fluorescent.

A

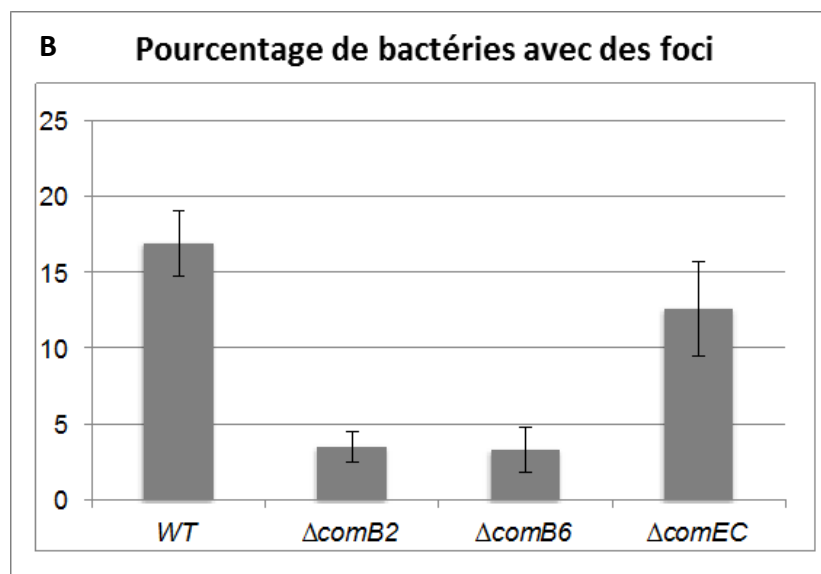
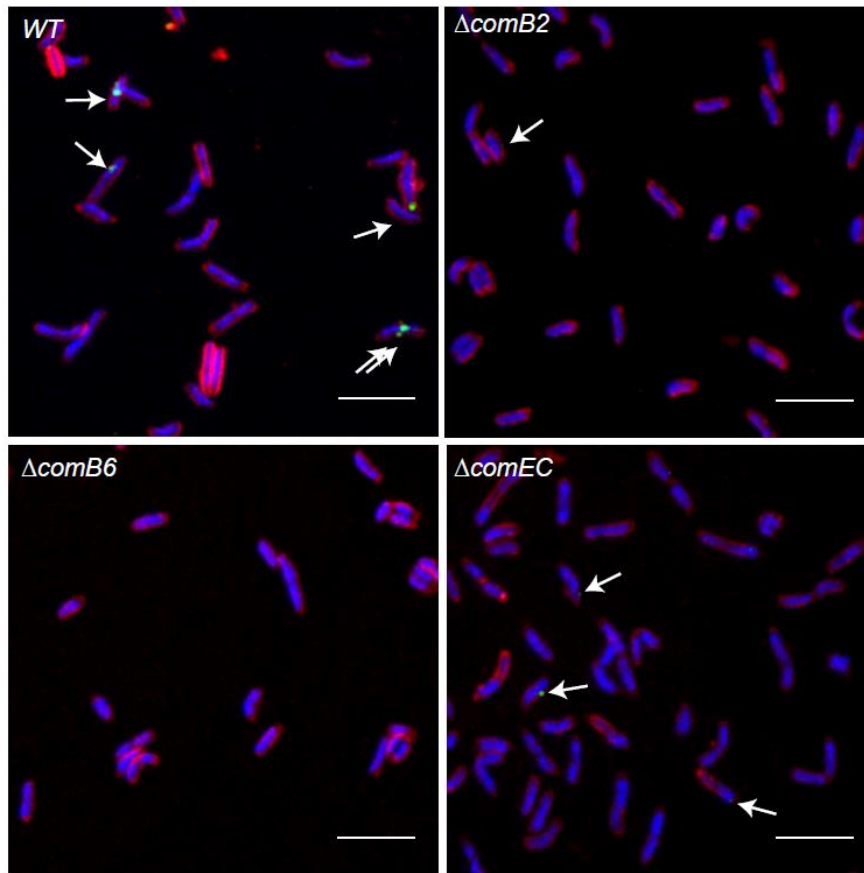


Figure 21 : Formation de foci d'ADN dans différentes souches de *H. pylori*. A) Foci d'ADN visualisés au microscope confocal. L'image est une superposition de trois canaux. Bleu : ADN marqué au DAPI. Rouge : membrane marquée au FM-64. Vert : ADN-ATTO488. Les flèches indiquent les foci d'ADN. Scale bar : 5 μ m. B) Histogramme représentant pour chaque souche le pourcentage de bactéries présentant des foci.

C- La suppression de la voie de réparation par recombinaison homologue induit une augmentation du nombre de foci

Nous avons réalisé des expériences de visualisation de foci sur différentes souches mutées pour différentes voies de réparation. Nous avons ainsi inactivé des gènes impliqués dans la réparation des cassures simple brin (*recO*), dans la réparation des cassures double brin (*addA*) ou dans le BER (*mutY*). PolA est une polymérase impliquée dans la réplication et divers événements de réparation tandis que RecN est impliquée dans la réparation par recombinaison homologue. Les résultats obtenus montrent que les souches $\Delta addA$, $\Delta recO$ et $\Delta recN$ présentent une augmentation significative du nombre de cellules avec foci comparé à la souche WT. Les souches $\Delta mutY$ et $\Delta polA$ ne montrent elles aucune augmentation du nombre de foci (figures 22 et 23).

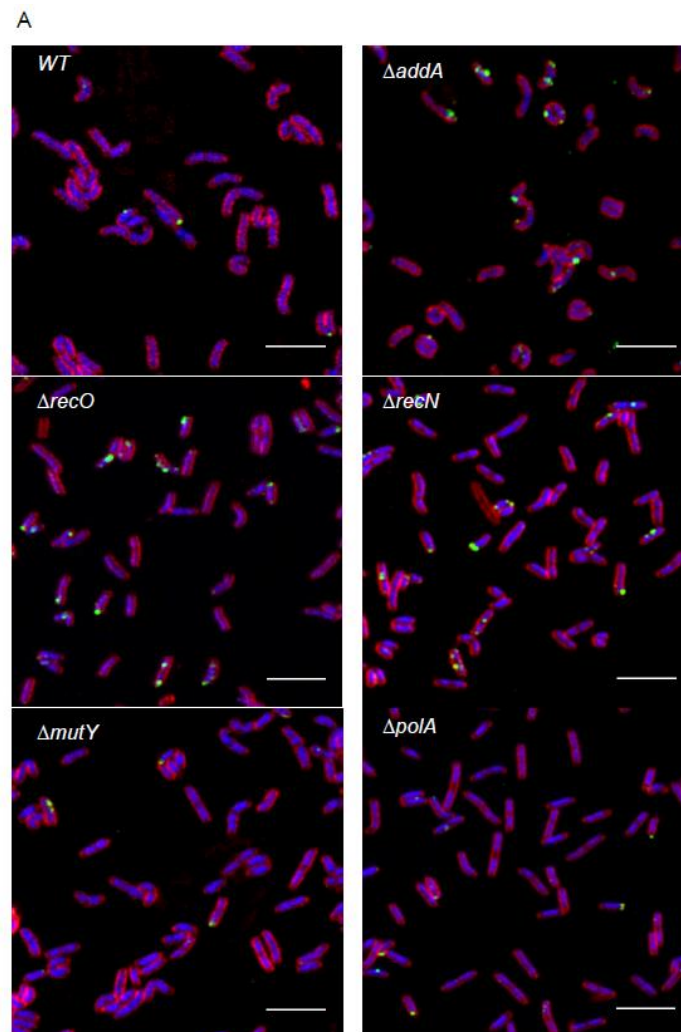


Figure 22 : Formation de foci d'ADN dans des souches de *H. pylori* mutées pour différentes voies de réparation. L'image est un merge de trois canaux. Blue : ADN marqué au DAPI. Rouge : membrane marquée au FM-64. Vert : ADN-ATTO488. Scale bar : 5 µm

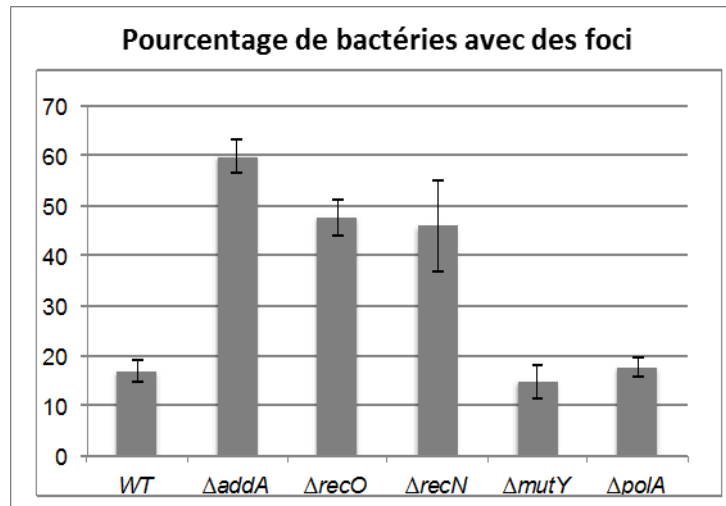


Figure 23 : Histogramme représentant pour chaque souche le pourcentage de bactéries avec des foci.

D- L'augmentation du nombre de foci est corrélée à une augmentation du nombre de T4SS

Afin de déterminer si l'augmentation du nombre de foci est due, comme supposé, à une augmentation du nombre de T4SS nous avons mesuré par western blot le niveau d'expression des protéines ComB8 et ComB10 qui le composent (Figure 24). Après quantification, il apparaît que les mutants $\Delta addA$, $\Delta recO$ et $\Delta recN$ possèdent une plus grande quantité de protéines ComB8 et ComB10 que la souche WT. Le niveau des protéines ComB8 et B10 des souches $\Delta mutY$ et $\Delta polA$ est par contre similaire au niveau de la souche WT. Nous avons également mesuré le niveau de transformation de ces différentes souches et il apparaît que ce dernier est augmenté dans les souches $\Delta addA$, $\Delta recO$ et $\Delta recN$ mais pas dans les souches $\Delta polA$ et $\Delta mutY$ (Tableau 3). La souche $\Delta mutY$ présentant un phénotype hypermutateur (Mathieu et al., 2006) on aurait pu s'attendre à observer une induction de la compétence comme cela est le cas dans des souches hypermutatrices de *S. pneumoniae* (Gagne et al., 2013). Les résultats obtenus semblent donc indiquer que la compétence chez *H. pylori* peut être induite par l'accumulation de cassures de brins d'ADN mais pas par l'accumulation de mutations ponctuelles.

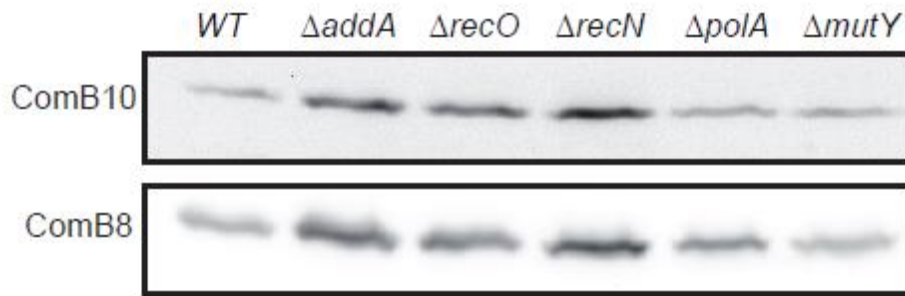


Figure 24 : Western blot anti ComB8 et ComB10 pour les différents mutants de réparation

Genotype	Fréquence de transformation (strR/CFU) ($\times 10^{-4}$)
WT	3,1(\pm 4,9)
$\Delta comB6$	< 0,0001
$\Delta addA$	24,6 (\pm 24,3)
$\Delta recO$	27,3 (\pm 16,4)
$\Delta recN$	10,8 (\pm 12,5)
$\Delta mutY$	7,0 (\pm 3,9)
$\Delta polA$	1,8 (\pm 3,0)

Tableau 3 : Fréquence de transformation des différents mutants de *H. pylori*.

E- Analyse du niveau d'expression de ComB8 et ComB10 dans différents fonds génétiques

Les analyses réalisées sur les différents mutants de réparation ont révélé une parfaite corrélation entre fréquence de transformation, nombre de foci et niveau d'expression du T4SS. Afin de vérifier si cette corrélation était toujours correcte, nous avons mesuré le nombre de foci ainsi que la quantité de protéines ComB8 et ComB10 dans différents fonds génétiques de *H. pylori* connus pour afficher différents niveaux de transformation (Figure 25).

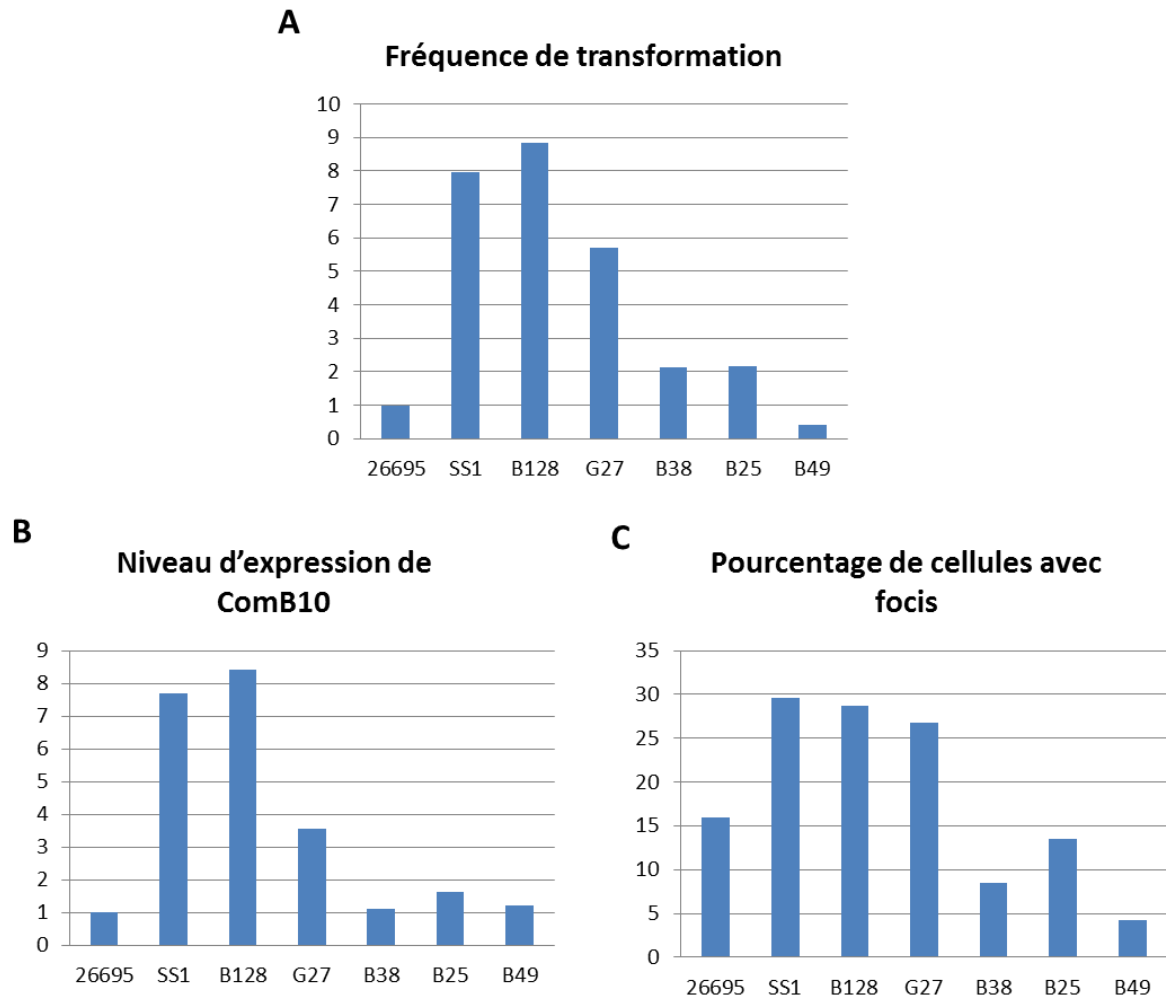


Figure 25 : Fréquence de transformation des différents fonds génétiques de *H. pylori*. A) Fréquence de transformation pour chaque souche. B) Niveau d'expression de ComB10 pour chaque souche. Les fréquences de transformation ainsi que les niveaux d'expression de ComB10 ont été mesurés pendant la phase exponentielle et ont été rapportés aux valeurs de notre souche de référence 26695. C) Pourcentage de cellules avec foci pour chaque souche

On peut ainsi observer qu'à chaque fois qu'une souche affiche une fréquence de transformation supérieure à la 26695, cette dernière affiche également une plus grande quantité de ComB10 et un plus grand nombre de foci par cellule. On peut alors se demander si le niveau d'expression du T4SS détermine la capacité de transformation d'une souche et donc si la quantité d'ADN capturé est le facteur limitant de la transformation chez *H. pylori*.

F- Niveau d'expression du T4SS et niveau de transformation

Afin de répondre à cette question nous avons produit des souches de *H. pylori* surexprimant l'opéron ComB6 à ComB10. Pour cela le promoteur natif de l'opéron a été remplacé par le promoteur du gène *ureA* qui est un promoteur fort (construction plasmidique réalisée par la plateforme CIGEx de l'Institut). Le niveau d'expression des protéines a ensuite été évalué par western blot et la fréquence de transformation de chaque souche a été mesurée. La figure 26 montre que le niveau d'expression de ComB8 est augmenté pour trois des quatre souches construites. Ces trois souches affichent également une augmentation significative de leur fréquence de transformation par rapport à la souche WT, ce qui n'est pas le cas de la souche 924 (tableau 4). Il semble donc que l'augmentation du niveau de T4SS permette à lui seul une amélioration de la fréquence de transformation chez *H. pylori*. Afin de déterminer si l'augmentation de la fréquence de transformation est due à une augmentation de la quantité d'ADN capturé, nous sommes actuellement en train de réaliser des expériences de comptage de foci d'ADN fluorescent chez les souches de surexpression. Nous sommes également en train de vérifier la construction 924 par séquençage afin de déterminer la raison pour laquelle cette souche ne surexprime pas les ComB.

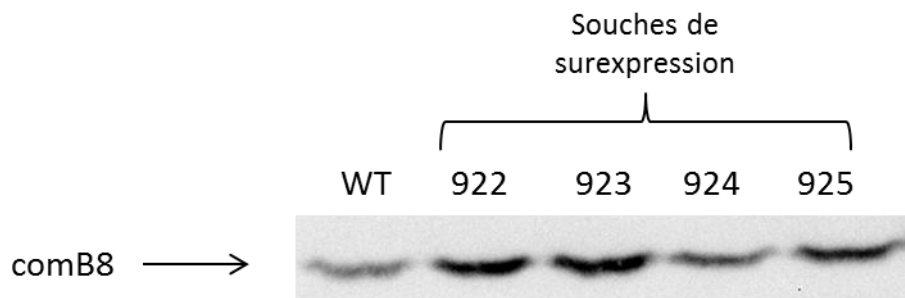


Figure 268: Western blot anti *comB8* dans les mutants de surexpression.

Souches	Fréquence de transformation (strR/CFU) ($\times 10^{-4}$)	Test statistique Mann-Whitney
WT	3,32 (\pm 6.7)	
922	18.4 (\pm 16)	0.0017
923	24.1 (\pm 36)	0.0056
924	3.36 (\pm 1.5)	0.7544
925	12(\pm 4.8)	0.0026

Tableau 4: Fréquence de transformation et test statistique pour chacune des souches surexprimant l'opéron ComB6-B10. Les statistiques ont été réalisées par comparaison avec la souche WT.

G- Données complémentaires

1) Etude de DprB

DprB est une protéine possédant 30% d'identité avec la protéine Yqgf de *E. coli* (Humbert et al., 2011). Puisque ces protéines sont homologues à RuvC, elles ont donc été décrites dans la littérature comme étant potentiellement capables de résoudre les jonctions de Holiday (Aravind et al., 2000). *DprB* est en opéron avec *dprA* et il a été démontré que sa délétion entraîne une diminution de la transformation ainsi qu'un défaut de croissance (Humbert et al., 2011). Zhang et Blaser ont publié en août 2012 un article dans lequel ils montrent que DprB facilite les recombinaisons inter et intragénomiques (Zhang et Blaser, 2012). Ils concluent leur manuscrit en proposant que le rôle de DprB soit effectivement celui d'une résolvasse de jonction de Holiday. L'argumentaire de Zhang et Blaser repose beaucoup sur le fait que l'absence de DprB augmente la sensibilité de la bactérie aux dommages par irradiation UV. Or aucune augmentation de la sensibilité aux dommages à l'ADN n'a été observée dans un mutant $\Delta dprB$ que ce soit dans notre laboratoire (Figure 27) ou le laboratoire de Nina R Salama (Humbert et al., 2011). De plus, en dépit de nombreux tests réalisés, nous n'avons jamais pu observer d'activité résolvasse avec la protéine purifiée.

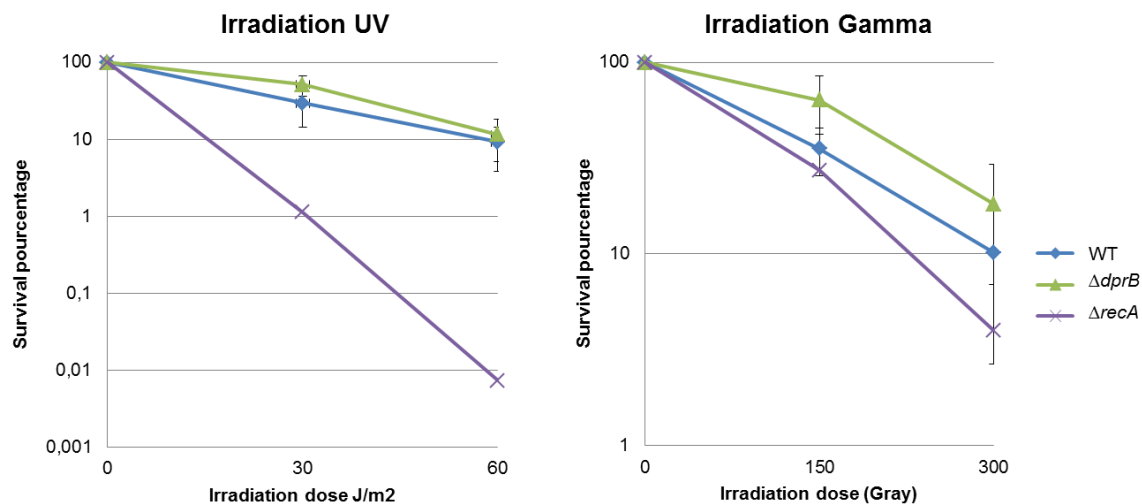


Figure 27 : Mesure de la survie de *H. pylori* après irradiation UV ou Gamma.

Nous avons également observé qu'un mutant $\Delta dprB$ possédait moins de protéines ComB8 comparé à une souche WT. Or si *dprB* était réellement impliqué dans la réparation, la délétion de ce dernier devrait, en accord avec le modèle d'induction de la compétence par les dommages à l'ADN, induire l'expression des gènes de compétence et non la réprimer. L'ensemble de ces données étant en complète contradiction avec les résultats publiés par

Zhang et Blaser, nous pensons que le rôle de DprB reste à confirmer. J'ai construit des souches sur-exprimant DprB et j'ai mesuré leurs fréquences de transformation (résultats non présentés). Malheureusement le phénotype observé s'est avéré très variable d'un clone à un autre et ne nous a pas permis de tirer de conclusion. Sophie Cheruel a tenté de cristalliser et caractériser la structure 3D de la protéine sans succès jusqu'à présent.

2) Etude du gène HP1473

En 2001, Chang et ses collègues identifient 4 gènes potentiellement impliqués dans la transformation chez *H. pylori* (Chang et al., 2001). Parmi ces gènes candidats on retrouve le gène HP1473 de fonction inconnue. Raphael Guerois (IBITEC-Saclay) un de nos collaborateurs, a été capable d'identifier un homologue de ce gène chez *C. jejuni*. Ce dernier avait été identifié lors d'un crible double hybride comme pouvant interagir avec l'homologue de DprA et a été annoté comme une phosphoribosyl-transférase (Parrish et al., 2007). Nous avons construit un mutant Δ HP1473 et avons mesuré la fréquence de transformation de cette souche. Il apparaît qu'en absence de ce gène la fréquence de transformation diminue d'un facteur 1000 (figure 28).

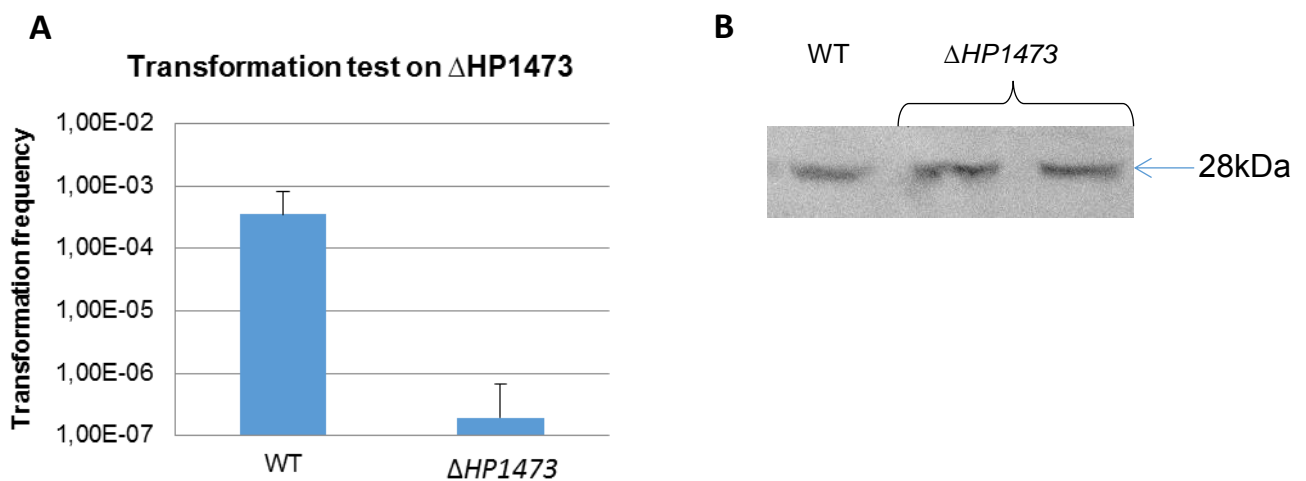


Figure 28 : Phénotype d'un mutant Δ HP1473. A) fréquence de transformation B) western blot contre ComB8.

L'absence de HP1473 n'induit ni variation du nombre de foci, ni variation du niveau de ComB8. Afin d'évaluer si HP1473 joue un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN, nous avons réalisé des tests de survie après irradiation UV ou Gamma. Aucune différence de survie n'a été observée entre le mutant Δ HP1473 et la souche WT (Figure 29).

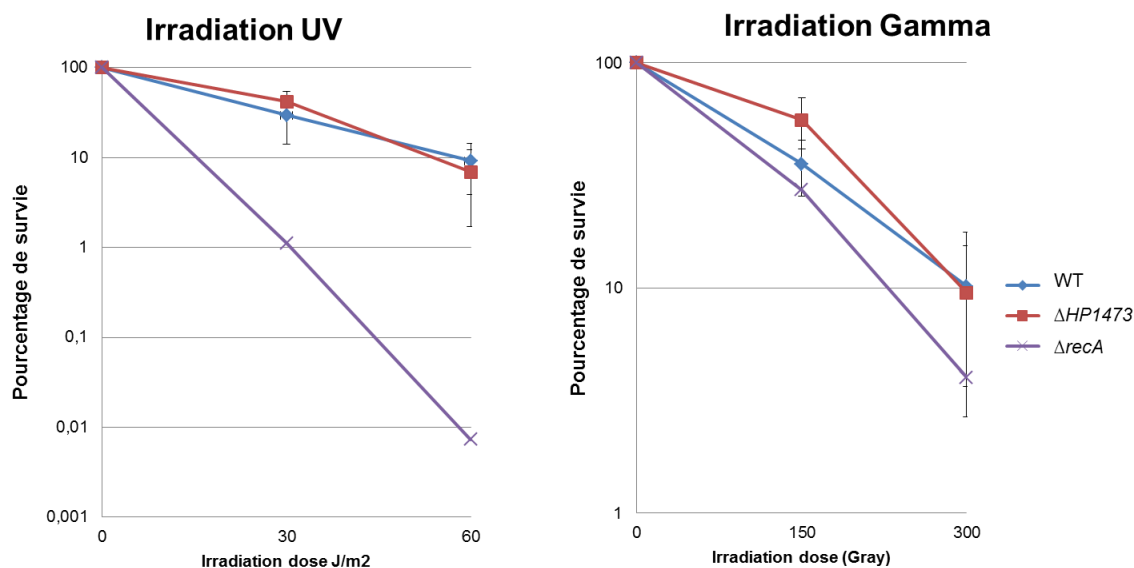


Figure 29 : Test de survie après irradiation chez un mutant $\Delta HP1473$.

Nous avons par la suite recherché si HP1473 jouerait un rôle dans la recombinaison intrachromosomique indépendamment de la réparation. Nous disposons au laboratoire d'un système KDA composé d'une cassette de résistance à l'apramycine (Apra) flanquée de répétitions directs de 358pb à l'intérieur d'un gène de résistance à la kanamycine (Km) (Marsin et al., 2008) (Figure 42 dans Matériel et Méthodes). Un évènement de recombinaison entre ces répétitions va permettre l'excision de la cassette Apra et la reconstitution d'une cassette Km fonctionnelle. En réalisant ce test sur des souches mutées pour certains gènes, on peut donc déterminer si ces derniers sont impliqués dans la recombinaison intra-chromosomique. Nous avons pu déterminer qu'en l'absence de HP1473, la fréquence de recombinaison intra-chromosomique est diminuée d'un facteur 4 (figure 30). Ce résultat est d'autant plus surprenant que HP1473 ne semble avoir aucun impact sur la survie après irradiation gamma alors que les dommages causés par les rayons gamma sont majoritairement réparés par recombinaison homologue. Il conviendrait de déterminer si le rôle de HP1473 sur la recombinaison intra-chromosomique est dépendant ou non de RecA (même groupe d'épistasie). On pourrait pour cela, réaliser des tests de recombinaison dans une souche mutée à la fois pour HP1473 et RecA. Si la fréquence de recombinaison observée est strictement identique à celle d'un mutant $\Delta recA$, cela signifiera que l'impact de HP1473 dans la recombinaison est dépendant de RecA.

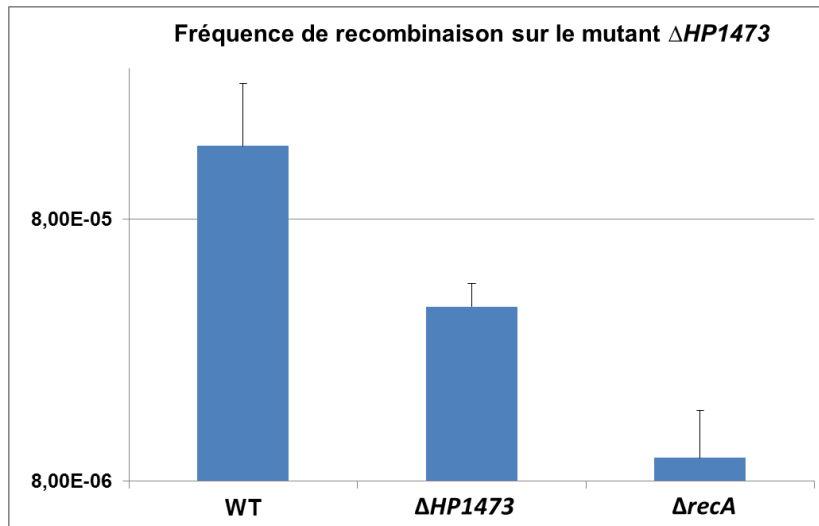


Figure 30 : Fréquence de recombinaison dans différentes souches de *H. pylori*.

Sophie Cheruel et ses collègues (I2BC, Orsay) sont parvenus à produire et à purifier la protéine HP1473. Les expériences de cristallisation n'ont pas abouti jusqu'à présent. Nous avons alors fait produire des anticorps anti HP1473. Des westerns blot contre la protéine ont été réalisés sur des extraits cellulaires de *H. pylori* sans qu'aucune bande spécifique ne puisse être détectée alors que la protéine purifiée est reconnue. Ce résultat pourrait être dû au fait que la protéine est trop faiblement exprimée chez *H. pylori* pour pouvoir être détectée de cette façon. Des tests d'immunofluorescence anti HP1473 ont également été réalisés mais aucun signal spécifique n'a pu être observé. Au vu du peu d'information dont nous disposons et du fait que les phosphatidyl-transférases sont des protéines avec un important nombre de substrats potentiels, il semble donc hasardeux d'initier la caractérisation biochimique de cette protéine pour le moment. Sophie Cheruel a néanmoins été capable de nous fournir une liste de mutations pouvant potentiellement inhiber l'activité transférase de la protéine. L'impact de ces mutations sur la transformation et la recombinaison intra-chromosomique sera évalué par un nouveau post doctorant, Prashant Damke.

III- Etude du rôle de la nucléase NucT

A- Problématique de recherche

H. pylori est une bactérie particulièrement singulière comparée aux autres modèles de la transformation. Elle est en effet la seule bactérie à utiliser un T4SS pour capturer l'ADN et à l'exception de DprA, RecA et ComEC, relativement peu de facteurs ont pu être identifiés par homologie chez cette bactérie.

Les protéines à activité nucléase étant relativement importantes pour la transformation chez les autres espèces bactériennes, O'Rourke et ses collègues décident en 2004 de caractériser la nucléase majoritaire de *H. pylori*. Ils identifient une protéine dont la délétion entraîne une diminution de la fréquence de transformation d'un facteur 18. Elle nomme cette dernière NucT pour « NUClease involved in Transformation » (O'Rourke et al., 2004). En 2011, Humbert et ses collègues évaluent également l'impact de NucT sur la transformation. Les résultats obtenus apparaissent toutefois en contradiction avec les travaux de O'Rourke puisque la diminution de la fréquence de transformation observée dans un mutant $\Delta nucT$ est cette fois non significative (Humbert et al., 2011).

Nous avons réalisé plus de 50 tests de transformations sur différentes souches $\Delta nucT$ et avons toujours observé une diminution significative de la fréquence de transformation (d'un facteur 5) par rapport à une souche WT. Il semble donc que NucT joue bel et bien un rôle dans la transformation naturelle chez *H. pylori*.

Afin de déterminer le rôle exact de NucT, nous avons dans un premier temps réalisé une caractérisation biochimique détaillée de la protéine. Puis en combinant des approches de génétique et de microscopie nous avons pu déterminer que l'activité nucléase de la protéine ne joue pas de rôle dans la transformation. Le rôle exact de NucT dans la transformation et plus largement chez *H. pylori* reste donc à déterminer.

B- Caractérisation biochimique

1) Production de la protéine NucT pure

La protéine a été produite et purifiée par la plateforme CIGEx selon un protocole similaire à celui publié par O'Rourke en 2004. La protéine a d'abord été clonée fusionnée à un tag MBP et produite dans des cellules d'*E. coli*. La présence d'un peptide signal sur le tag MBP a permis d'exporter la protéine dans le périplasma et ainsi de prévenir toute toxicité vis à vis de l'ADN génomique. La protéine NucT-MBP a ensuite été purifiée par passage sur une colonne d'amylose avec élution au maltose. Le tag MBP a été éliminé par clivage avec la protéase TEV et la protéine NucT a été purifiée une seconde fois par passage sur une colonne échangeuse de cation. Afin de caractériser l'activité nucléase de NucT nous avons réalisé des tests d'activité *in vitro*. Pour cela, différents substrats d'ADN marqués au phosphore P-32 ont été utilisés. Une fois la réaction de digestion arrivée à son terme les produits sont séparés sur un gel dénaturant.

2) Détermination du milieu réactionnel

Il a dans un premier temps été nécessaire de déterminer les conditions idéales d'activité de la protéine au travers de différents tests avec des substrats d'ADN marqués au P32. Ces tests ont tous été réalisés à 37°C pendant 30 min tel que décrit dans le matériel et méthode. Il est ainsi apparu que l'activité de NucT est optimale à pH6-7 et à 150 mM NaCl.

H. pylori est une bactérie qui colonise un organe dont le pH varie entre 1.5 et 5. Bien que la bactérie soit capable de contrer l'acidité gastrique il demeure tout même intéressant de déterminer de quelle façon un milieu acide affecte l'activité de NucT. Les tests réalisés semblent indiquer qu'un pH faible provoque une forte diminution de l'activité de la protéine (figure 31).

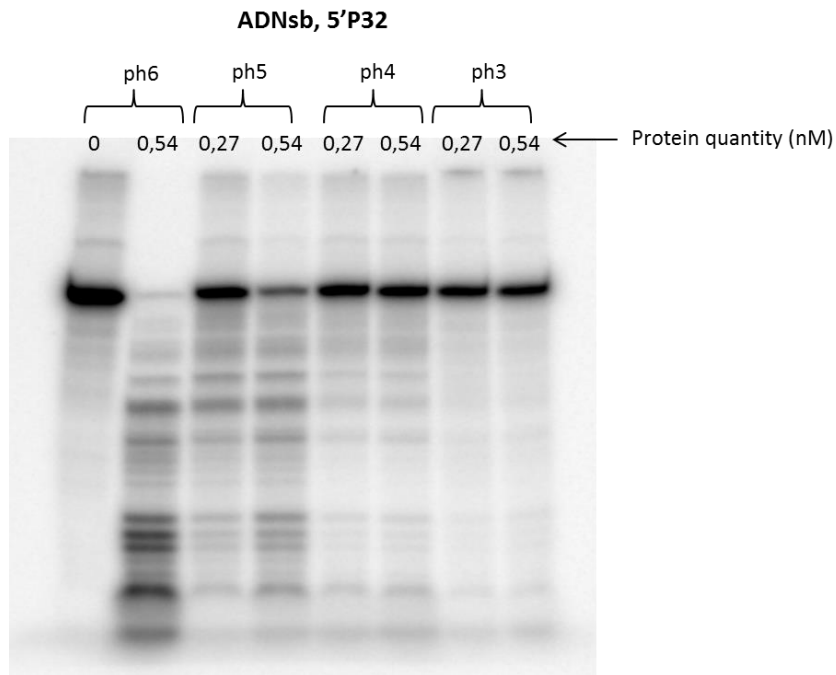


Figure 31 : Activité nucléase de NucT en fonction du pH.

3) NucT est plus active sur l'ADN simple-brin que sur l'ADN double-brin

Nous avons par la suite voulu comparer l'efficacité de dégradation de la protéine sur des substrats d'ADN simple et double-brin marqués avec du phosphore P32 en 5'. On observe ainsi qu'à quantité de protéine égale, NucT est plus active sur l'ADNsb que sur l'ADNdb (figure 32).

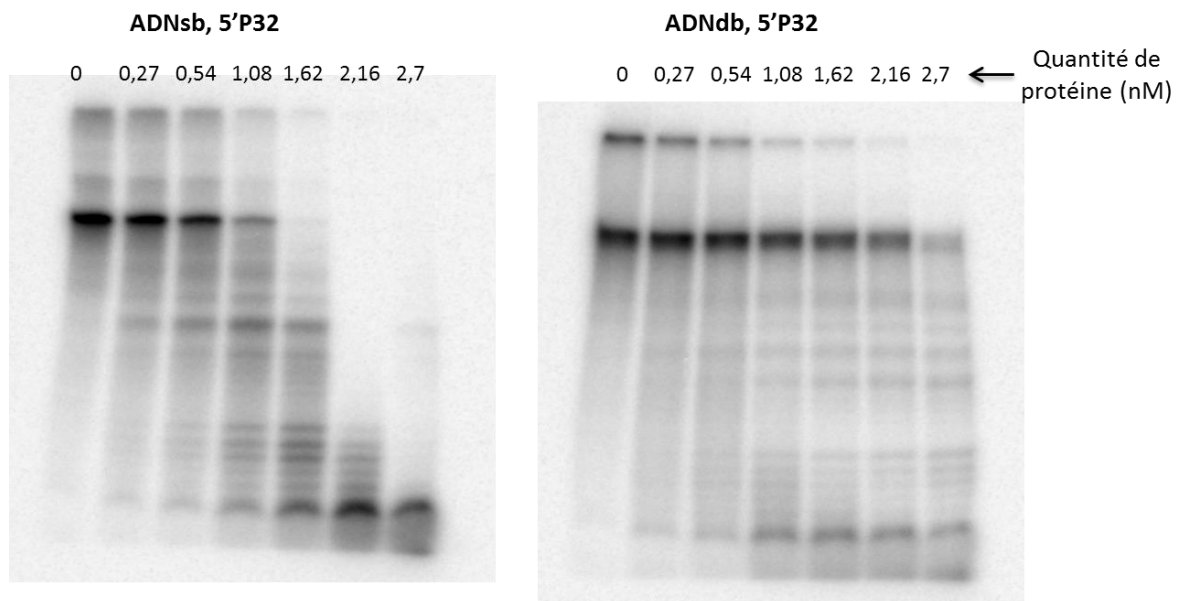


Figure 32 : Activité comparative de NucT sur de l'ADN simple et double-brin. Substrats :62nt

Nous avons réalisé cette même expérience 4 fois et avons déterminé la vitesse de dégradation initiale pour chacun des substrats. Cette vitesse de dégradation initial correspond au coefficient directeur de la droite de dégradation (figure 33) Il apparait ainsi que NucT coupe l'ADNsb 3.2 fois plus efficacement que l'ADNdb.

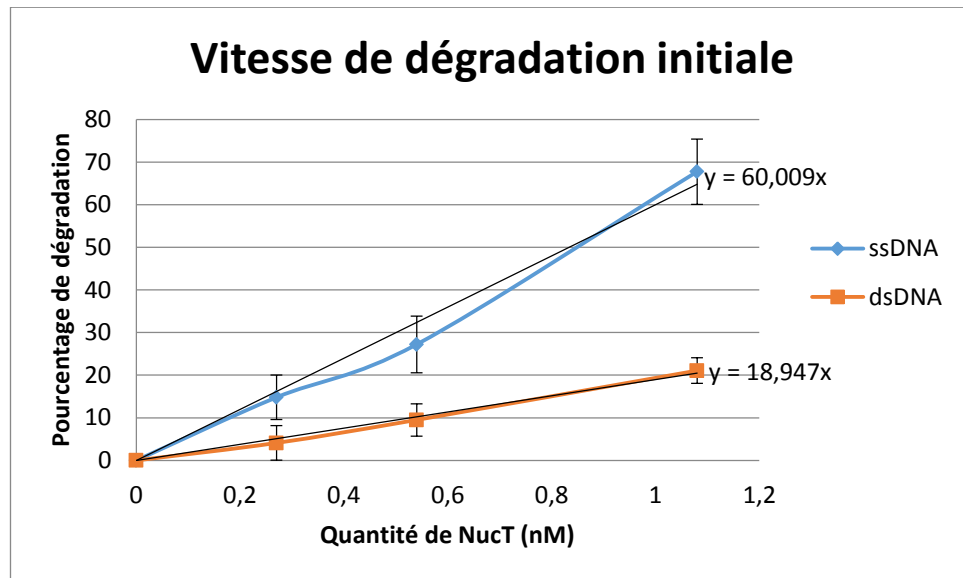


Figure 33 : Pourcentage de dégradation de l'ADN en fonction de la quantité de NucT. Le pourcentage de dégradation est déterminé par la quantification de la quantité de substrats restant à la fin de la réaction rapporté à la quantité de départ.

4) NucT possède une activité endonucléase et 3'exonucléase

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'activité de NucT était de type exonucléase ou endonucléase. Pour cela, l'ADNsb a été marqué au P32 soit en position 3' soit en position 5'. La présence d'une activité exonucléase de polarité identique au marquage mènerait à une disparition immédiate du signal radioactif et à l'absence d'intermédiaires de digestion. Les réactions de dégradation montrent que quel que soit la position du marquage, on observe la présence d'intermédiaires de digestion (figure 34). Il semble donc que NucT ne possède pas d'activité exonucléase mais une activité endonucléase.

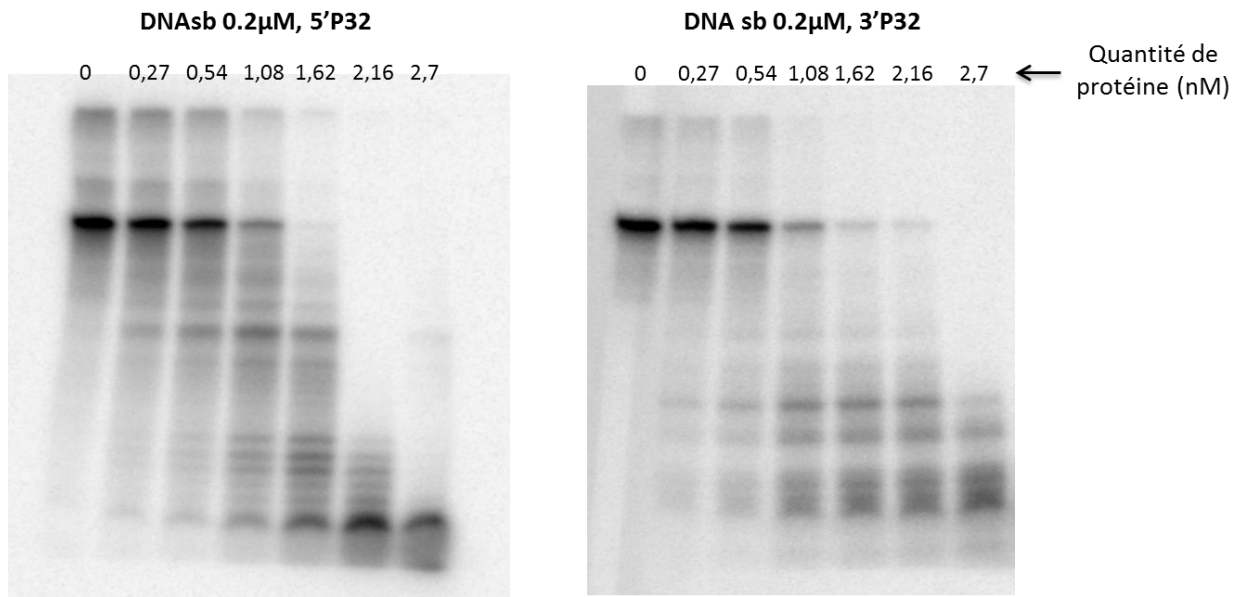


Figure 34 : Activité comparative de NucT sur de l'ADNs b marqué au P32 en 5' ou en 3'.

Si NucT possède bien une activité endonucléase et que son substrat préférentiel est l'ADNs b alors lorsqu'elle est mise en présence d'un ADNdb interrompu par une séquence simple brin, elle devrait cliver en priorité la partie simple brin. Nous avons donc hybridé un ADN de 62nt avec deux oligonucléotides de 18 et 32nt ne laissant ainsi que 12 nucléotides d'ADNs b. Les tests d'activité réalisés montrent effectivement que NucT coupe préférentiellement l'ADN simple brin ce qui mène à l'accumulation d'un produit de 32nt (Figure 35).

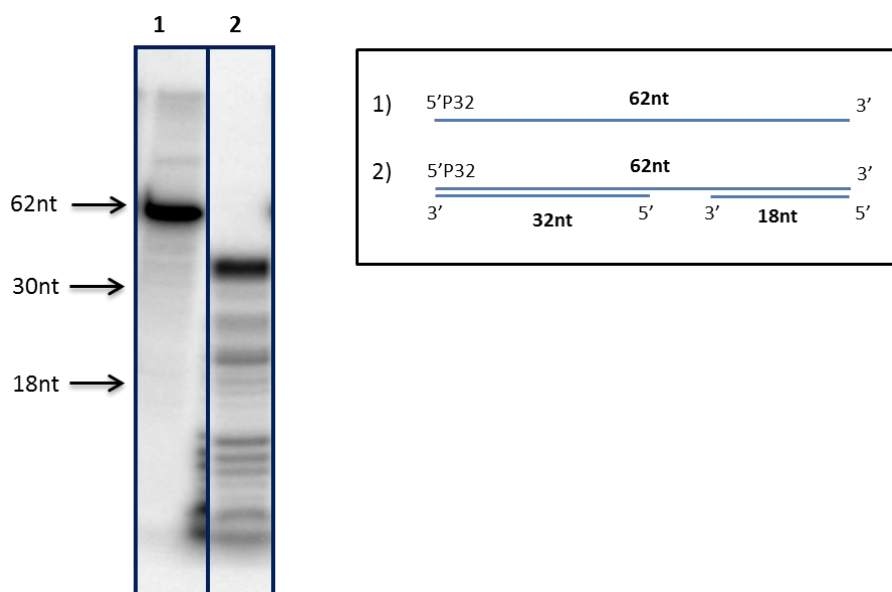


Figure 35 : Activité endonucléase de NucT. Ligne 1 : substrat 1 sans ajout de protéine NucT. Ligne 2 : Substrat 2 avec 2.2nM de protéine NucT. Les deux échantillons ont migré sur le même gel mais à des positions éloignées.

De la même manière, lors de la digestion d'un substrat présentant une extrémité simple brin, la partie simple brin de ce dernier devrait être digérée en priorité ce qui mènerait à la production d'un fragment d'ADN uniquement double brin. Nous avons donc testé un substrat d'ADN de 62nt hybridé avec un oligonucléotide de 32nt sur sa moitié 5'. Après analyse, il apparaît effectivement que plus la réaction de digestion évolue et plus il y a enrichissement d'un produit de 32nt correspondant à la partie double brin du substrat (figure 36A). L'ADNsb est donc bel et bien le substrat préférentiel de NucT. Cette expérience a également été réalisée sur un ADN de 62nt hybridé avec un oligonucléotide de 30nt sur sa moitié 3' (figure 36B). Vu que l'ADN est marqué au P32 en 5', il est impossible de visualiser l'accumulation du produit double brin de 30nt. Nous avons néanmoins pu visualiser la dégradation du substrat et avons noté une importante différence vis-à-vis de l'efficacité de dégradation par rapport au substrat précédent. En effet, le substrat hybridé en 5' et qui possède donc une extrémité 3' libre est dégradé bien plus efficacement que le substrat hybridé en 3'. Cette différence vis-à-vis de l'efficacité de dégradation combinée au manque de netteté des intermédiaires du substrat d'ADNsb marqué au P32 en 3' (Figure 34) prouvent que NucT possède une activité 3' exonucléase en plus de son activité endonucléase.

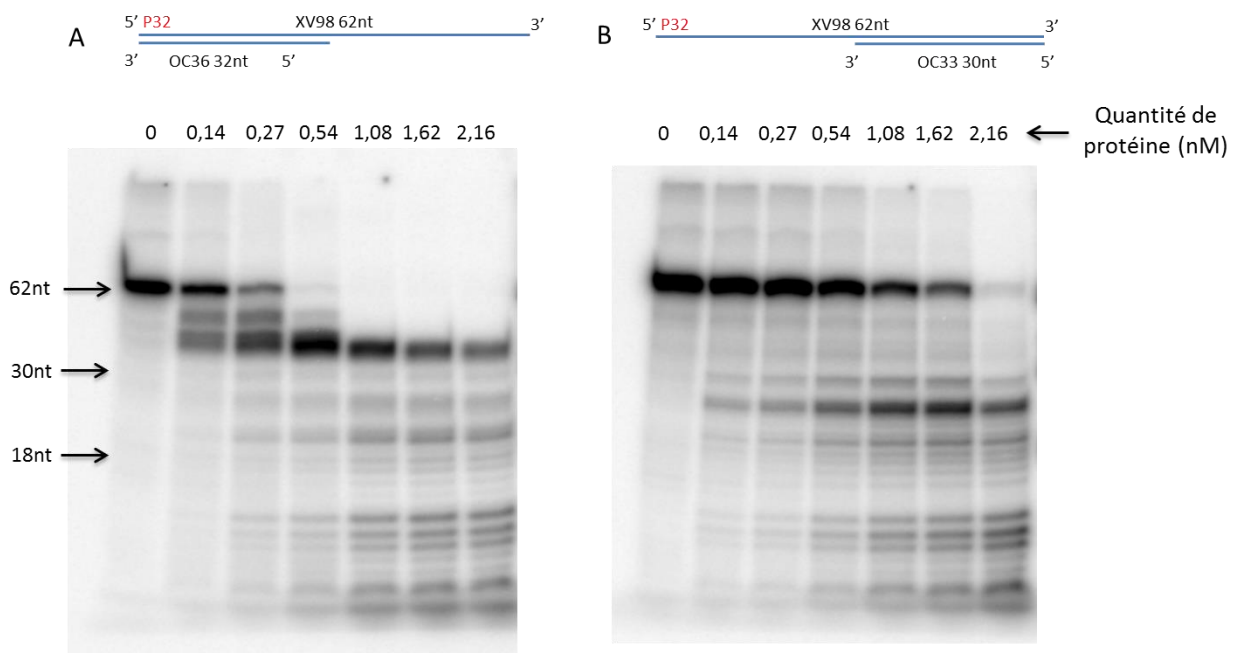


Figure 36 : Activité de NucT sur des substrats semi-hybridés.

5) L'histidine 124 est indispensable à l'activité nucléase

Dans le cadre de notre collaboration, Raphaël Guerois a réalisé une analyse bio-informatique de NucT. Il est parvenu à déterminer que NucT appartient à la famille des protéines phospholipase-D (ou PLD). Ces dernières sont des phosphodiesterases capables d'hydrolyser des phospholipides ou de l'ADN. NucT s'avère être particulièrement proche d'une protéine nommée Zuchini (26 à 28% d'identité) (Ipsaro et al., 2012 ; Nishimasu et al., 2012). Cette protéine est une endonucléase transmembranaire mitochondriale ayant été décrite comme impliquée dans la maturation des piRNA. Les protéines PLD partagent un même mécanisme biochimique ainsi que la présence d'un motif H(X)K(X4)D (HKD) au niveau de leur site actif. Ces protéines se fixent sur leurs substrats et créent une liaison entre une de leurs histidines et un phosphate des liaisons diester. Une fois la liaison réalisée, la protéine va pouvoir cliver l'ADN (ou l'ARN). Raphaël a été capable d'identifier l'histidine de NucT potentiellement impliquée dans la liaison avec le substrat, l'histidine H124. Le CIGEx a donc produit et purifié une protéine portant la mutation H124N et nous avons évalué son activité nucléase. Aucune activité nucléase n'a pu être observée que ce soit sur l'ADNsb ou l'ADNdb (figure 37). Il semble donc que l'histidine 124 soit bel et bien l'histidine impliquée dans la liaison au phosphate.

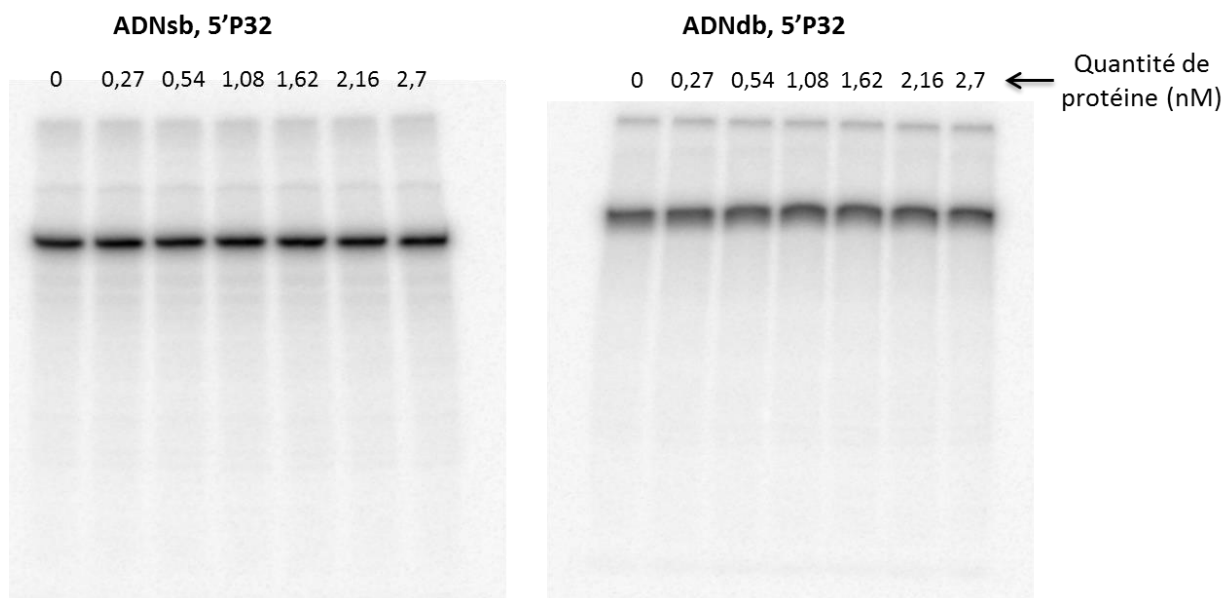


Figure 37 : Activité de dégradation de la protéine NucT H124N. Substrats : 62 nucléotides

6) NucT est également capable de dégrader les ARN

Zuchini étant impliquée dans le clivage de l'ARN nous avons décidé de vérifier si NucT pouvait également cliver de l'ARN et si l'histidine impliquée dans ce clivage était la

même que celle impliquée dans le clivage de l'ADN (figure 38). Il apparaît que l'activité nucléase de NucT sur l'ARN est identique à son activité sur l'ADNsb. NucT H124N étant également incapable de dégrader l'ARN on peut donc conclure que c'est le même site actif qui est impliqué dans le clivage de l'ADN et de l'ARN.

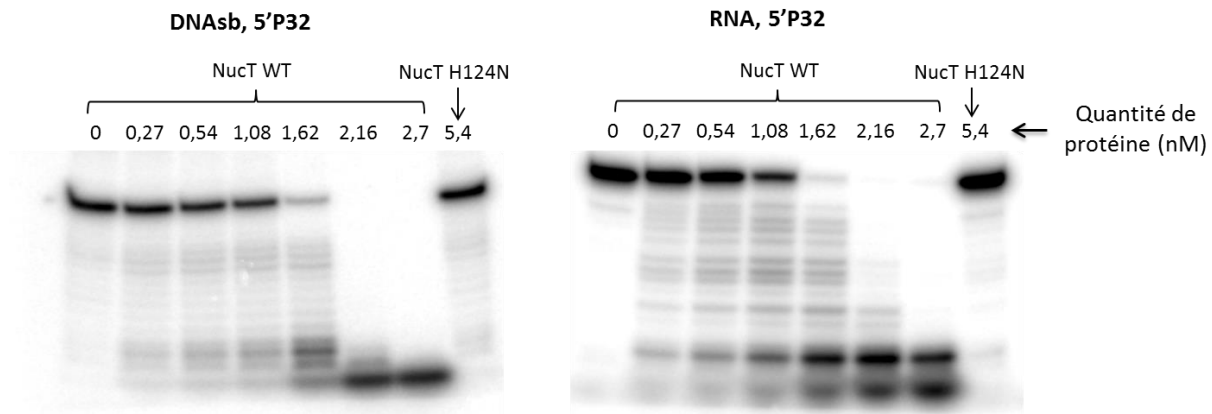


Figure 38: Activité comparative de NucT sur de l'ARN et de l'ADNsb. Taille du substrat d'ARN : 25 nucléotides. Taille du substrat d'ADN : 24 nucléotides.

7) NucT possède une importante affinité pour l'ADN simple brin

Nous avons par la suite voulu évaluer l'affinité de NucT vis-à-vis de différents substrats d'ADN. L'expérience de référence pour ce type de caractérisation est le retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Cette dernière consiste à incubier un substrat d'ADN avec différentes quantités de protéines pendant un certain temps puis de faire migrer les échantillons sur gel non dénaturant. Si la protéine est capable de se fixer sur l'ADN cela va entraîner un retard dans la migration de ce dernier par rapport à l'ADN libre. NucT étant une nucléase cation indépendante hautement active nous avons dû utiliser la protéine mutée NucT H124N afin de ne pas dégrader l'ADN. Les expériences de retard sur gel sur l'ADNsb montrent une disparition de la bande correspondant au substrat seul avec l'augmentation de la quantité de protéine. Alors que cette bande disparaît, une seconde bande correspondant à un complexe protéine/ADN apparaît (1^{er} shift). Lorsque la quantité de protéine est encore plus élevée on observe l'apparition d'une seconde bande correspondant à un second complexe protéine/ADN (2^{ème} shift) (Figure 39 A). Nous avons réalisé cette même expérience 3 fois et avons déterminé la constante de dissociation de NucT pour l'ADNsb. Cette dernière est égale 3.6 nM (Figure 39 B). Nous n'avons par contre pas été capables de visualiser de retard avec de l'ADNdb ou de l'ADNsb d'une taille inférieure à 30nt.

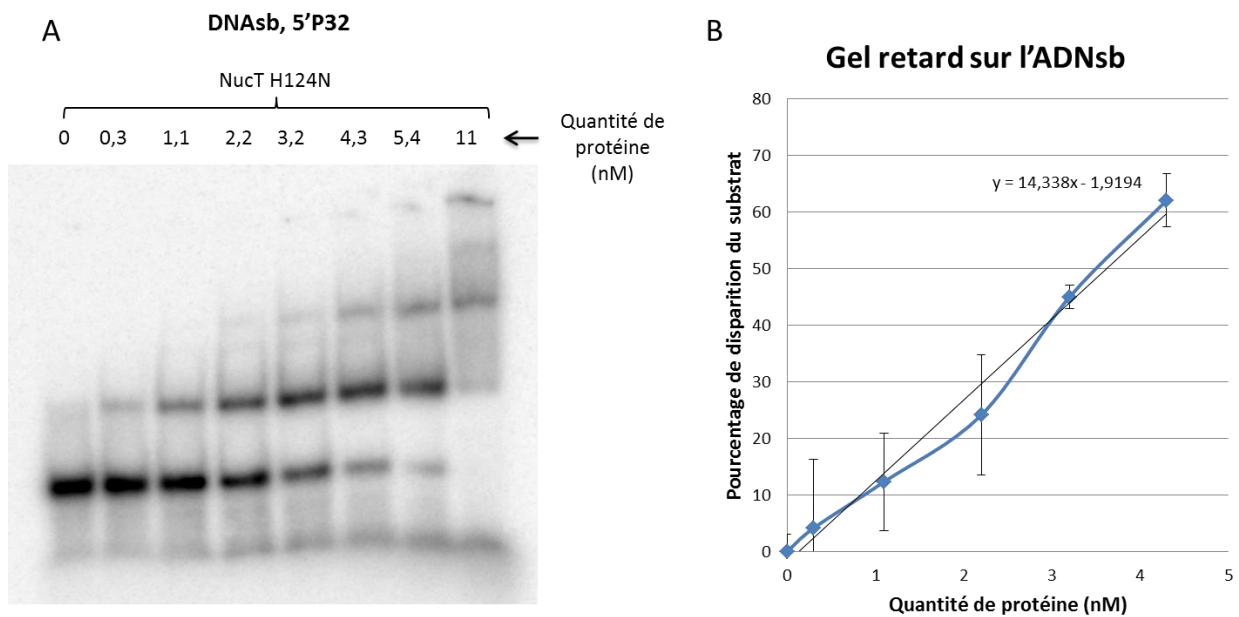


Figure 39 : Retard sur gel de NucT H124N sur un substrat d'ADN simple brin de 62nt.

C- Localisation de la protéine NucT

NucT a par le passé été décrite comme une protéine associée à la membrane (O'rourke et al., 2004) puis considérée comme une protéine sécrétée (Liechti et al., 2013). Afin de déterminer exactement la localisation de la protéine *in vivo* nous avons généré des souches de *H. pylori* possédant une protéine NucT-cherry. Les expériences de microscopie à fluorescence sur cellules vivantes que nous avons réalisées nous ont permis d'observer que NucT est une protéine uniformément localisée le long de la bactérie (Figure 40). Elle est retrouvée à la périphérie de la cellule probablement associée aux membranes ou au périplasma en accord avec les résultats de O'rourke et n'est donc probablement pas une protéine activement sécrétée dans le milieu extracellulaire.



Figure 40: Visualisation de la protéine NucT-cherry par microscopie à fluorescence. Le signal GFP en vert permet un marquage homogène du cytoplasme des cellules. La protéine NucT-cherry en rouge est répartie de manière homogène le long des membranes des cellules. (scale bar : 2µm)

D- Phénotype des souches mutées pour *nucT*

Afin de déterminer si la diminution de la fréquence de transformation dans un mutant $\Delta nucT$ est causée par l'absence d'activité nucléase, nous avons mesuré la fréquence de transformation dans une souche exprimant la protéine NucT avec la mutation H124N. Contre toute attente, il apparaît que les souches NucT-H124N n'affichent pas de diminution de la fréquence de transformation comme cela est le cas dans des mutants de délétion (tableau 5). Il semble donc que le rôle de NucT dans la transformation ne soit pas lié à son activité nucléase.

Genotype	Fréquence de transformation (strR/CFU) ($\times 10^{-4}$)	Test statistique Mann-Whitney
WT	3,32 (\pm 6.7)	
$\Delta nucT$ partielle	0.73 (\pm 2.14)	<0.0001
$\Delta nucT$ totale	0.5 (\pm 7.4)	<0.0001
NucT_H124N	4.87 (\pm 7.0)	0.1975

Tableau 5 : Fréquence de transformation dans les souches mutées pour *NucT*. Les souches $\Delta nucT$ partielles correspondent à des souches dont seule une partie du gène *nucT* a été remplacée par une cassette de résistance à un antibiotique. Les souches $\Delta nucT$ totales correspondent à des souches dont la totalité du gène *nucT* a été remplacée par une cassette de résistance à un antibiotique. Les tests statistiques ont été réalisés en prenant la souche WT comme référence.

E- Données complémentaires

1) Fluorescence et nucléase : création d'artefacts

Nos premiers tests d'activité sur la protéine NucT ont été réalisés avec de l'ADN marqué en 5' avec du Cy5. Ce marquage nous a permis de visualiser la dégradation de l'ADN mais il menait également à l'apparition de bandes fluorescentes ressemblant à des fragments de digestion mais qui s'avèrent être des artefacts (Figure 41). L'apparition de ces bandes semble dépendante du niveau de dégradation de l'ADN puisque elles apparaissent avec l'augmentation de la quantité de protéine dans le mix réactionnel (gamme de protéine) mais également avec l'augmentation de la durée de la réaction enzymatique (cinétique). Un changement de fluorochrome (Cy5 \rightarrow Tamra) ou de la séquence du substrat d'ADN n'ayant pas permis de régler le problème nous avons donc été dans l'obligation de changer de type de marquage pour nous tourner vers la radioactivité. Quelques mois après avoir changé de système de marquage nous avons appris par hasard que nous n'étions pas les seuls à avoir ce

type de problème (C. Elie, communication personnelle). Il semblerait en effet que l'apparition de ces bandes artéfactuelles soit un phénomène récurrent lorsque certaines sondes fluorescentes sont utilisées pour étudier des protéines possédant des activités nucléases. Nous pensons qu'il est pertinent de noter l'existence de ce phénomène puisque nous n'avons trouvé aucune donnée dans la littérature traitant de ce sujet et que le mécanisme à l'origine de la création de ces artéfacts demeure inconnu.

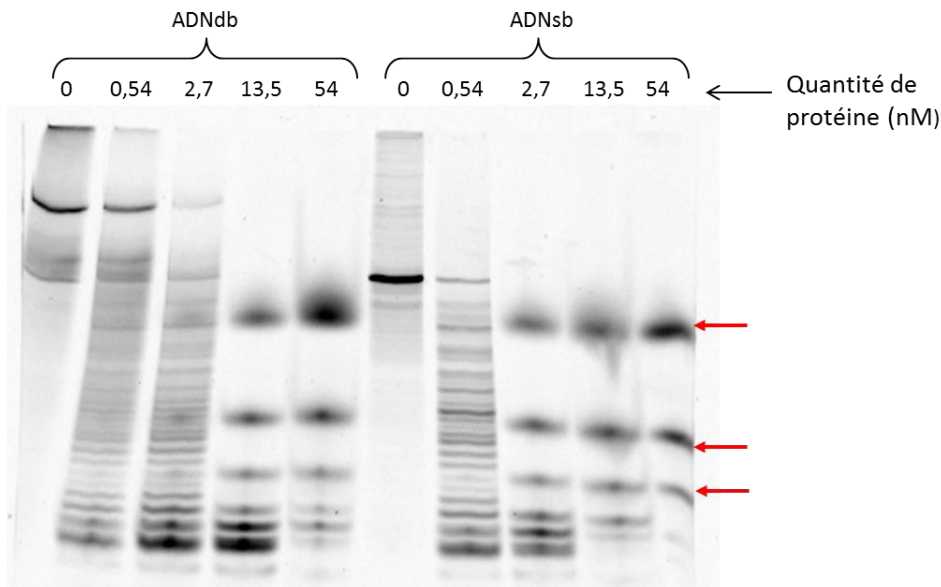


Figure 41: Test d'activité de NucT avec de l'ADN marqué au Cy-5 en 5'. Les flèches rouges indiquent les signaux artéfactuels.

2) Recherche de protéines interagissant avec NucT

Nous sommes parvenus à démontrer de manière certaine que l'absence de NucT engendrait une diminution de la fréquence de transformation. Contre toute attente, l'abolition de l'activité nucléase de NucT ne permet pas de retrouver ce phénotype. Il semble donc que l'implication de la protéine NucT lors de la transformation ne dépende pas de son activité nucléase. Afin de déterminer quel mécanisme permet à NucT d'impacter le mécanisme de transformation, nous avons décidé de rechercher des protéines pouvant potentiellement interagir avec NucT par MBP pulldown. Cette méthode consiste à incuber une protéine NucT-MBP sur une résine d'amylose pour permettre la fixation de la MBP sur l'amylose. Une fois la MBP-NucT fixée, on incube la résine avec des extraits périplasmiques de *H. pylori* afin de permettre aux protéines de l'extrait d'interagir avec NucT. Les protéines fixées sont éluées par lavage avec une solution à haute concentration en sel. Ces protéines candidates ainsi purifiées ont été déposées sur gel dénaturant pour vérification puis identifiées par

spectrométrie de masse dans le cadre d'une collaboration avec J. Armengaud (CEA-Marcoule). L'approche utilisée dans le cas de NucT a été le « shotgun ». Cette approche nous a permis d'identifier l'ensemble des protéines interagissant avec NucT et d'attribuer un score à chacune de ces protéines en fonction de leurs représentations dans l'échantillon par rapport à un contrôle MBP seul. Malheureusement, un très grand nombre de ces protéines à haut score ce sont avérées être des protéines ribosomales ou des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme. Il est très peu probable que NucT interagisse avec des protéines ribosomales vu que ces dernières sont localisées dans un compartiment cellulaire différent de celui de NucT. Il est plus probable que la présence de ces ribosomes dans l'échantillon périplasmique soit le résultat d'une contamination et que l'interaction soit le résultat de la fixation de NucT sur l'ARN ribosomal plus que sur la protéine ribosomale elle-même. Il serait probablement plus intéressant de se concentrer sur les protéines dont la fonction est inconnue (Tableau S2). Prashant Damke a donc généré plusieurs mutants de délétion pour ces gènes et est actuellement en train d'évaluer leurs phénotypes vis à vis de la transformation.

Discussion et perspectives

Helicobacter pylori est une des bactéries pathogènes les plus variables décrite à ce jour. Parmi les nombreux mécanismes à l'origine de cette variabilité génétique on trouve l'échange d'ADN par transformation naturelle. Bien que la transformation bactérienne soit un processus relativement bien caractérisé pour tout un panel d'espèces bactériennes, de multiples questions subsistent quant au processus exact de transformation chez *H. pylori* du fait des nombreuses particularités de cette dernière. Nous avons donc décidé de développer une technique permettant de visualiser en temps réel la capture et l'internalisation d'ADN transformant dans des cellules vivantes de *H. pylori*. Nous avons également cherché à caractériser les mécanismes à l'origine de l'induction de la compétence chez *H. pylori* ainsi que le rôle de NucT dans la transformation.

I- Visualisation de la transformation

A- Croissance de *H. pylori* sous microscope

L'observation de cellules vivantes de *H. pylori* sous microscope à fluorescence n'a été à notre connaissance réalisée qu'une seule et unique fois (Specht et al., 2013). Lors de cette étude, les auteurs ne sont cependant pas parvenus à observer de divisions cellulaires. Ils expliquent cet état de fait par l'importante complexité des conditions environnementales nécessaires à la croissance de la bactérie. Nous avons donc dû déterminer nous même les conditions environnementales compatibles avec la bactérie. Nous sommes aujourd'hui capables de suivre la croissance de *H. pylori* sur plus de 12h avec un temps de génération similaire à celui obtenu en culture liquide. Le fait de pouvoir visualiser la division cellulaire de *H. pylori* est un nouvel outil pour l'étude de cette bactérie. Ce protocole pourrait notamment être utilisé dans le cadre d'études sur la division cellulaire ou sur la formation des coccoïdes. La visualisation de la croissance sous microscope permet également d'évaluer l'impact de certaines mutations sur le métabolisme de la bactérie. Il est ainsi possible de distinguer entre un retard de croissance dû à un temps de génération augmenté et un retard de croissance dû à de la mort cellulaire. C'est exactement le type de distinction que nous avons pu réaliser au laboratoire pour la souche $\Delta addA$. Les analyses microscopiques nous ont en effet permis de déterminer que le retard de croissance dont souffre ce mutant est principalement causé par la mort d'approximativement 25% des cellules à chaque cycle de division (résultats non publiés).

B- ADN-fluorescent et transformation.

La visualisation de la transformation par microscopie à fluorescence a été réalisée chez différentes espèces bactériennes. Dans ces études, l'ADN fluorescent était marqué soit au YOYO soit au Cy. Le YOYO étant un intercalant de l'ADN, il ne peut plus marquer l'ADN une fois qu'il est sous forme simple brin. Il semblerait de plus que le YOYO induise des distorsions du brin d'ADN. Quant au Cy, il a été démontré que sa présence inhibait le transport de l'ADN vers le cytoplasme. Dans les deux cas, il est apparu que la visualisation de l'ADN fluorescent chez *H. pylori* devient impossible une fois que l'ADN atteint le passage de la membrane interne (Stingl et al., 2010). Nous avons donc décidé d'utiliser un autre type de marquage reposant sur des dUTP marqués avec une petite molécule hautement fluorescente. Ces nucléotides étant intégrés dans l'ADN par PCR, nous pensions possible que ce dernier puisse être pris en charge par la machinerie d'internalisation. Il aurait alors été possible de suivre toutes les étapes de la transformation, de la capture de l'ADN jusqu'à son internalisation dans le chromosome bactérien. Nous sommes ainsi parvenus à visualiser la capture de l'ADN fluorescent ainsi que son transport dans le cytoplasme, mais pas son intégration dans le génome. Il est en effet apparu que la présence de dUTP-ATTO dans l'ADN diminue très fortement la fréquence de recombinaison. Il est fort probable que le peu d'évènements de recombinaison observés soient dû à la présence dans le mélange d'une petite quantité d'ADN sans dUTP-ATTO. Nous ignorons quelle étape de l'intégration est bloquée et si cette inhibition est causée par la présence de dUTP dans la séquence d'ADN ou par la présence des molécules fluorescentes à la surface du brin d'ADN. Nous sommes actuellement en train de réaliser des expériences de visualisation de la transformation dans des souches mutées pour DprA et RecA. Ces dernières nous permettront non seulement d'en apprendre plus sur le processus de prise en charge de l'ADN une fois dans le cytoplasme mais également de déterminer à quelle étape de la transformation l'ADN-ATTO est bloqué.

C- Génération de bactérie GFP

Afin de pouvoir suivre l'ADN transformant dans les cellules bactériennes, nous devons disposer d'un marquage cytoplasmique. Nous avons donc utilisé des agents intercalant de l'ADN tels que le Syto-41 ou le Hoechst qui sont traditionnellement utilisés pour marquer les cellules vivantes. Ces derniers se sont malheureusement révélés toxiques pour *H. pylori*. Les divers tests réalisés nous ont permis d'observer un arrêt de la division cellulaire tant que les cellules sont marquées au Syto-41. Après un certain temps, les bactéries

sont capables d'éliminer l'intercalant et de reprendre leur cycle de division. Ces marqueurs n'étant pas adaptés à notre modèle d'étude, nous avons donc décidé d'utiliser des bactéries exprimant une protéine fluorescente localisée dans le cytoplasme. Pour cela, nous avons produits des bactéries exprimant la protéine GFP sous contrôle d'un promoteur fort. Ces dernières se sont révélées très faiblement fluorescentes et donc inutilisables pour le type d'expériences que nous souhaitions réaliser. Des protéines GFP avaient déjà été utilisées chez *H. pylori* lors de précédents travaux sans que le type de mutant exact ne soit précisé. Il est finalement apparu que la GFP mut2, un variant de la GFP classique, est bien plus adapté à *H. pylori*. Cette dernière est plus brillante, plus stable et permet d'avoir un marquage constant du cytoplasme durant plus de 12h.

D- La transformation et division cellulaire

Les expériences de suivi de la transformation que nous avons réalisées nous ont permis de remarquer que les cellules de *H. pylori* présentant des foci se divisent à la même vitesse que les cellules sans foci. Ceci nous a amené à penser que la transformation chez *H. pylori* ne nécessite pas de pause dans le cycle cellulaire comme cela peut être le cas chez *B. subtilis* (Haijema et al., 2001). Bien qu'encourageantes, ces observations ne nous permettent pas, à elles seules, de conclure quoi que ce soit puisque la présence de foci d'ADN ne signifie pas forcément que cet ADN va s'intégrer dans le génome de la bactérie. Ceci est d'autant plus vrai que la fréquence de transformation avec de l'ADN fluorescent ATTO est relativement faible. Afin de déterminer si oui ou non la transformation ralentit le cycle de division chez *H. pylori*, nous prévoyons de produire des souches de *H. pylori* possédant le gène GFPmut2 muté. Ce dernier possèdera une délétion de 4 nucléotides produisant l'insertion d'un codon stop. Ces souches seront mises en présence d'ADN génomique de *H. pylori* possédant le gène non muté et seront immédiatement placées au microscope pour observation. Les bactéries qui recombineront au niveau de la délétion, reconstitueront un gène GFP fonctionnel et deviendront vertes après un certain temps. Nous serons ainsi en mesure d'identifier les bactéries qui transforment et de comparer leur temps de division à des mutants $\Delta comB6$ qui ne transforment absolument pas.

E- ComEC est impliquée dans le passage de l'ADN dans le cytoplasme

HP1361 de *H. pylori* a été identifiée en 2003 comme une protéine impliquée dans la transformation. En dépit du fait qu'elle soit beaucoup plus petite, les analyses bio-informatiques ont permis de déterminer que HP1361 était homologue de ComEC de

B. subtilis. En 2010, Stingl et ses collègues démontrent que chez *H. pylori*, le signal fluorescent d'un ADN marqué au YOYO disparaît après un certain temps. Ils attribuent cette baisse de signal à la dégradation de l'ADN_{db} en ADN_{sb} et à son passage dans le cytoplasme. Ils observent par contre, qu'en absence de ComEC le signal fluorescent de l'ADN-YOYO ne disparaît pas mais reste constant au cours du temps. Prenant appui sur le fait que la souche $\Delta comEC$ est totalement déficiente pour la transformation, ils concluent que ComEC est, comme pour les autres bactéries compétentes, la protéine impliquée dans le transport de l'ADN dans le cytoplasme (Stingl et al., 2010). Notre méthode de visualisation de la transformation nous a permis d'aller plus loin en démontrant clairement qu'en absence de ComEC aucune dynamique de transport vers le cytoplasme n'est observée. Ces données permettent de confirmer l'hypothèse de Stingl selon laquelle ComEC est la protéine impliquée dans le passage de l'ADN dans le cytoplasme. Il demeure néanmoins difficile de déterminer précisément ce qui se passe au niveau de la membrane interne et plus particulièrement dans le cas d'un mutant ComEC. En effet, lors de l'étude de ce mutant nous avons observé qu'en moyenne, 40% du volume des foci colocalise avec le signal GFP. Or si l'ADN est bloqué dans le périplasma, alors aucun signal ne devrait être détectable dans le cytoplasme. Le fait que le volume des foci qui colocalise avec le cytoplasme reste constant au cours du temps dans un mutant ComEC nous laisse penser que l'ADN est bel et bien bloqué dans le périplasma et que le signal observé est à mettre au compte des limites techniques de notre système d'acquisition. Les expériences de visualisation sur cellules vivantes ont été réalisées sur microscope confocal possédant un scanneur résonant. Les microscopes confocaux à balayage ayant une résolution latérale de 200nm, on peut aisément supposer qu'un focus d'ADN bloqué dans un périplasma d'une taille de 20 nm soit détecté comme partiellement cytoplasmique. Il n'existe malheureusement pas à l'heure actuelle de système permettant de réaliser des acquisitions en 3D avec un rapport vitesse d'acquisition/résolution qui soit plus optimal. Les systèmes de hautes résolutions étant pour le moment réservés à des échantillons fixés ou à l'étude de dynamiques plus lentes.

II- Défauts de réparation et compétence

A- Nombre de foci et quantité d'ADN capturé

L'utilisation de l'ADN-ATTO sur cellules de *H. pylori* fixées nous a permis d'analyser un grand nombre de bacilles et de détecter une augmentation de la quantité d'ADN capturé dans des mutants de réparation par recombinaison homologue. Il semble toujours

exister une corrélation entre le niveau d'expression du T4SS et la quantité de cellules présentant des foci. Nous pensons donc que le dénombrement de foci d'ADN est une méthode simple et rapide permettant de déterminer l'impact d'une mutation sur le processus de capture de l'ADN.

B- L'induction de la compétence chez *H. pylori*

En 2010, Dorer et ses collègues démontrent que les dommages à l'ADN induisent la compétence chez *H. pylori* (Dorer et al., 2010). Ils proposent un modèle dans lequel les dommages à l'ADN induiraient l'expression des gènes de compétence au travers d'un mécanisme dépendant de RecA. L'augmentation de l'expression du T4SS mènerait alors à une plus grande quantité d'ADN internalisé. L'accroissement du nombre de séquences d'ADNs_b importées permettrait l'amplification de la compétence par un second mécanisme toujours dépendant de RecA. Les auteurs ont observé une induction de la compétence dans des cellules $\Delta addA$ ou traitées à la ciprofloxacine. Dans les deux cas, les types de dommages principalement générés sont des cassures double-brin. Mais qu'en est-il des autres types de dommages tels que les cassures simple brin, les modifications de bases ou les altérations de la réplication? Les résultats que nous avons obtenus montrent une induction de la compétence dans des mutants $\Delta addA$, $\Delta recN$ et $\Delta recO$ mais pas dans les mutants $\Delta mutY$ et $\Delta polA$. Puisque *H. pylori* possède déjà un taux de mutagenèse spontanée relativement élevé on aurait pu penser qu'une augmentation supplémentaire du niveau de mutagenèse mènerait à une induction de la transformation afin, notamment, d'échapper au « Cliquet de Muller ». Or, nos résultats indiquent que seules les cassures de brins d'ADN induisent la compétence. On peut alors se demander quel est l'avantage que procure la sélection d'un tel mécanisme? *H. pylori* est-elle régulièrement soumise à des cassures de brins d'ADN? On peut assez aisément imaginer que cela est effectivement le cas. L'environnement acide de l'estomac peut être une source majeure de cassures de brins d'ADN. En outre, l'infection par la bactérie induit une inflammation chronique de la muqueuse gastrique. Cette inflammation est une importante source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent à terme induire des cassures de brin d'ADN. On est donc en droit d'imaginer que l'ADN capturé via le processus de transformation est utilisé pour réparer les cassures de brin d'ADN induites par l'environnement de la bactérie.

L'hypothèse de la transformation pour la réparation a été avancée par la communauté scientifique il y a maintenant plusieurs dizaines d'années. Bien que ce modèle soit

particulièrement séduisant de par sa simplicité, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude ayant pu démontrer sa véracité. Les travaux réalisés chez *L. pneumophila* et *H. pylori* n'ont en effet pas permis de mettre en évidence une différence de sensibilité aux agents génotoxiques entre des souches compétentes et des mutants de transformation (Charpentier et al., 2011 ; Dorer et al., 2010). Dans le cas de *H. pylori* le test réalisé était néanmoins relativement préliminaire. Il conviendrait donc probablement de reproduire l'expérience dans d'autres conditions et en testant différents types d'agents génotoxiques.

Plusieurs cascades de régulation menant à l'induction de la compétence ont déjà été décrites chez les bactéries à Gram positif (*B. Subtilis*, *S. pneumoniae*) et les bactéries à Gram négatif (*V. cholerae*, *H. influenzae*). Nos données ainsi que celles du laboratoire de N. Salama, sont les premières à mettre en évidence un mécanisme d'induction de la compétence chez *H. pylori*. Il conviendrait maintenant d'identifier les acteurs indispensables à la mise en place de ce processus d'induction. Dorer et ses collègues ont déjà proposé un modèle d'induction de la transformation chez *H. pylori* qui est dépendant de la protéine RecA. Toutefois, nous disposons actuellement de données préliminaires laissant penser que l'induction des gènes de compétence chez *H. pylori* peut être réalisée en absence de RecA. Ces données, si elles étaient confirmées, seraient alors en contradiction avec le modèle d'induction par les dommages à l'ADN qui a été proposé par Humbert et ses collègues.

C- Existe-t-il un lien entre niveau d'expression du T4SS et fréquence de transformation ?

Nous avons mesuré la fréquence de transformation, le niveau d'expression des *comB* et le nombre de foci chez différentes souches de *H. pylori*. Il apparaît ainsi y avoir une bonne corrélation entre le niveau de transformation et la quantité d'ADN capturé. Il convient de noter que ces mesures ont été réalisées pendant la phase exponentielle, période durant laquelle notre souche de référence possède son pic de transformation. Il est ainsi tout à fait possible qu'à un autre moment de la croissance les différences de transformations entre les souches ne soient plus les mêmes.

D- Détermination des facteurs limitant la transformation

La détermination des facteurs limitant la transformation est une étape importante pour la compréhension des mécanismes de régulation. Notre laboratoire a mesuré par le passé la quantité de protéine RecA présente chez *H. pylori* (Orillard et al., 2011). Cette dernière

s'avère comprise entre 50000 et 80000 molécules par cellule. Ce nombre étant incroyablement élevé on peut difficilement imaginer que la quantité de protéine RecA soit un facteur limitant de la transformation chez *H. pylori*. Dorer et ses collègues ont généré des souches surexprimant DprA sans que cela ne mène à un changement du niveau de transformation. Jusque-là, seule la surexpression de ComB4 a permis d'induire une augmentation de la fréquence de transformation (Dorer et al., 2010). Cependant cette augmentation est supposée être le résultat de l'induction de certains gènes de compétence selon un mécanisme dépendant de RecA. Nos résultats ont permis pour la première fois de démontrer une constante corrélation entre la quantité d'ADN capturé et le niveau de transformation. Il était donc légitime de se demander si la quantité d'ADN capturé n'est pas un facteur limitant de la transformation chez *H. pylori*. Pour répondre à cette question, nous avons produit des souches surexprimant l'opéron *comB6* à *comB10*. En dépit du fait que la totalité du T4SS ne soit pas surexprimée, nous sommes tout de même parvenus à observer une augmentation significative de la fréquence de transformation dans les souches de surexpressions par rapport à la souche WT. Si cette augmentation s'avérait corrélée à une augmentation du nombre de bactéries avec foci, cela signifierait que la quantité d'ADN capturé serait un facteur limitant de la transformation chez *H. pylori*.

III- Analyse du rôle de NucT

A- NucT est une nucléase très active impliquée dans la transformation

Les tests de transformation réalisés nous ont permis de confirmer que l'absence de la protéine NucT induit une diminution de la fréquence de transformation d'un facteur 5. Ces données nous ont laissé penser que NucT pouvait jouer un rôle dans le mécanisme de transformation. Afin de déterminer ce rôle, nous avons réalisé la caractérisation biochimique de la protéine. Nous avons ainsi pu confirmer que NucT est une protéine thermostable, indépendante des cations, appartenant à la famille des protéines PLD. Les travaux décrits dans ce manuscrit montrent que NucT possède une activité 3' exonucléase ainsi qu'une activité endonucléase. Bien que la protéine possède une très forte activité nucléase envers l'ADNsb et l'ARN elle est également capable de cliver l'ADNdb avec une efficacité moindre. Nous avons été capables de déterminer que l'histidine H124 est indispensable à l'activité nucléase.

B- L'activité nucléase de NucT ne semble pas impliquée dans la transformation

Nous avons réalisé des tests de transformation sur des souches d'*H. pylori* exprimant une protéine NucT avec la mutation H124N. Étonnamment, ces souches ne montrent aucune diminution de la fréquence de transformation comme cela est le cas dans un mutant de délétion. Ces souches ont bien entendu été séquencées et nous prévoyons dans les semaines qui viennent de vérifier l'absence d'activité nucléase par réalisation de test d'activité à partir d'extraits périplasmiques. Si ce phénotype devait être confirmé, cela suggérerait fortement que le rôle de NucT dans la transformation n'est pas lié à son activité nucléase. Mais alors comment une nucléase pourrait-elle influencer sur la transformation naturelle sans que son activité nucléase ne soit impliquée? Deux hypothèses s'offrent à nous. Il est tout d'abord possible, bien qu'improbable, que la protéine NucT possède une autre activité enzymatique qui serait, elle, impliquée dans la transformation. La seconde possibilité est que NucT interagisse avec d'autres acteurs protéiques et que l'absence de NucT induise une diminution de l'activité de ces protéines. Cette dernière hypothèse est supportée par le fait que NucT est associée aux membranes cellulaires par des interactions ioniques, probablement de type protéines/protéines (O'rourke et al., 2004).

C- La protéine NucT est localisée de manière homogène le long des membranes cellulaires

Les expériences de microscopie à fluorescence nous ont permis de localiser la protéine NucT-cherry dans des cellules de *H. pylori* vivantes. La protéine semble répartie de manière homogène le long des membranes de la bactérie. Ces résultats restent cependant préliminaires puisque l'on ignore si la protéine NucT-cherry possède une activité nucléase fonctionnelle. Une protéine non fonctionnelle pourrait en effet afficher une localisation cellulaire différente d'une protéine NucT fonctionnelle. Nous prévoyons donc de vérifier l'activité enzymatique de la protéine par réalisation de tests d'activités nucléases avec des extraits cellulaires de périplasmes.

D- L'activité nucléase de NucT est-elle impliquée dans le recyclage des nucléotides ?

L'activité nucléase de NucT n'étant étonnamment pas impliquée dans la transformation naturelle nous prévoyons de vérifier si l'activité nucléase de la protéine est,

elle, bien impliquée dans le recyclage des nucléotides (Liechti et al., 2013). Pour cela, nous allons réaliser des expériences de croissance sur milieu minimum avec une souche possédant uniquement la protéine NucT_H124N. Si l'activité nucléase de NucT est essentielle au recyclage des nucléotides alors la souche NucT_H124N sera incapable de croître tandis que la souche WT poussera.

Matériels et méthodes

Ce matériel et méthode est complémentaire à celui présenté dans l'article 1.

Souches utilisées

Lors de mon travail de thèse, j'ai principalement travaillé sur des souches dérivées de la souche 26695.

Tableau 6 : Liste des souches utilisées

Souche	Genotype	Origine
LR1	26695	
LR133	26695 str ^R	Marsin et al., 2008
LR3/LR6	SS1	
LR768/LR769	26695 <i>comB2::Cm</i>	This work
LR770/LR771	26695 <i>comB2::Km</i>	This work
LR711	26695 <i>comB6::Km</i>	This work
LR776/LR777	26695 <i>comEC::Km</i>	This work
LR303	26695 <i>addA::Cm</i>	Marsin et al., 2008
LR320	26695 <i>addA::Apra</i>	Marsin et al., 2008
LR394	26695 <i>recO::Km</i>	Marsin et al., 2008
LR320	26695 <i>recO::Cm</i>	Marsin et al., 2008
LR118	26695 <i>recN::Km</i>	This work
LR317	26695 <i>recN::Apra</i>	This work
LR552/LR553	26695 <i>mutY::Km</i>	This work
LR366	26695 <i>polA::Cm</i>	Garcia Ortiz et al., 2011
LR531	26695 <i>polA::Apra</i>	Garcia Ortiz et al., 2011
LR887	26695 <i>pUreA-GFPmut2-Km</i>	This work
LR936/LR937	26695 <i>NucT-Cherry</i>	This work
LR792/LR793	26695 <i>NucT::Km</i>	This work
LR914/LR915	26695 <i>NucT::Apra (total)</i>	This work
LR928/LR929	26695 <i>NucT_H124N</i>	This work
LR762/LR763	26695 <i>HP1473::Cm</i>	This work
LR817/LR818	26695 <i>HP1473::Cm (KDA)</i>	This work
LR782/LR783	26695 <i>DprB::Cm</i>	This work
LR312/LR313	26695 <i>RecA::Apra</i>	Marsin et al., 2008
LR922/LR923/LR924/LR925	26695 <i>pUreA-ComB6_B10</i>	This work
LR8	B128	
LR9	X47	
LR10	G27	
LR66	B38	
LR67	B25	
LR68	B49	

Oligonucléotides, enzymes, anticorps et produits

- Les oligonucléotides utilisés lors de ce travail ont tous, sauf indication contraire, été commandés chez Eurogentec.

- Les enzymes utilisés lors de ce travail ont tous, sauf indication contraire, été commandés New England Biolabs.

- Les anticorps utilisés dans ce travail ont tous été produits par Eurogentec
- Les antibiotiques et la plupart des produits ont tous, sauf indication contraire, été commandés chez Sigma.

Culture sur boîte

Les souches de *H. pylori* ont été cultivées à 37°C en conditions microaérophile (5% O₂, 10% CO₂ sur milieu Blood Agar Base n°2 complété avec du sang de cheval défibriné (Oxoid, Fisher) (10%) et un mix d'antibiotique/antifongique suivant : polymixine B (31 µg/mL), vancomycine (12.5 µg/mL), triméthoprime (6.2 µg/mL), fungizone (2.5 µg/mL). Différents antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture en fonction des cassettes de résistance possédées par les souches : kanamycine (Km) 20 µg/mL ; apramycine (Apra) 25 µg/mL ; Cloramphénicol (Cm) 8 µg/mL

Culture liquide

Les bactéries sont cultivées dans une flasque de culture stérile contenant du BHI (brain heart infusion media, Oxoid), 10% du sérum de veau fœtal et le mix d'antibiotique/antifongique. *H. pylori* est inoculé à une DO_{600 nm} de 0.025 pour une croissance optimale. La flasque est ensuite incubée à 37°C en condition microaérophile sous agitation.

Incubation de l'ADN fluorescent avec *H. pylori*

Approximativement 1.10^5 cellules de *H. pylori* en phase exponentielle sont resuspendues dans 20 µl de BHI. Après ajout de 200 ng d'ADN-ATTO, la suspension est incubée 10 min à 37°C. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont centrifugées, lavées avec 100 µl de BHI et finalement resuspendues dans 20 µL de BHI.

Visualisation de foci d'ADN sur cellules fixées

Des échantillons de bactéries ayant interagi avec de l'ADN-ATTO fluorescent ont été déposés sur une lamelle recouverte de gélatine et fixés 45min au formaldéhyde 4%. Les lamelles ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) 0.1% glycine et une fois avec du PBS seul. Les membranes cellulaires ont été marquées au FM-64-X (Invitrogen) à une dilution de 1:5000 dans du PBS pendant 10 min et l'ADN a été marqué avec du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) à 1 µg/ml. Les lamelles ont été montées sur lames avec du milieu de montage Dako. L'acquisition d'image a été réalisée sur un microscope confocal

SPE ou SP8 (LEICA, Wetzlar, Germany) à l'objectif ACS APO 63X (NA=1.3). L'analyse et le traitement des images a été réalisé sur les logiciels Leica et Image J.

Test de transformation

Environ 1.10⁵ cellules de *H. pylori* en phase exponentielle sont reprises dans 15 µl d'eau peptonée. Deux cents nanogrammes d'ADN génomique issus de la souche LR133 (Streptomycine résistante) sont ajoutés et trois spots de 15 µl sont déposés sur des boîtes de culture au sang. Après croissance 24h à 37°C, les spots de bactérie sont resuspendus, dilués et étalés sur des boîtes au sang avec et sans streptomycine (10 µg/ml). Après 3 à 5 jours de croissance à 37°C, le nombre de colonies résistantes par rapport au nombre de colonies viables est déterminé.

Analyse de l'expression de HPCoMB8 et HPCoMB10 par western blot

Les protéines issues d'extraits totaux de cellules de *H. pylori* en phase exponentielle sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Une coloration au rouge ponceau est réalisée afin de vérifier que la quantité de protéine totale présente dans chacun des extraits est identique. Les membranes sont par la suite incubées à 4°C sur la nuit dans un tampon de saturation (PBS 1X, 0.1% de Tween 20 et 5% de poudre de lait). L'incubation avec les anticorps primaire contre ComB8 ou ComB10 (tous deux fournies par R. Haas) et l'incubation avec les anticorps secondaires conjugués à la horseradish peroxidase (HRP) est réalisée pendant 1h à température ambiante. Les protéines sont révélées par ajout du réactif de détection ECL prime (GE Healthcare) et lecture sur le système G-BOX (Syngene).

Test de survie après irradiations Gamma ou UV

Les cellules de *H. pylori* sont reprises à partir de cultures sur boîte (une nuit de croissance) à une DO_{600nm} égale à 10. Ces dernières sont successivement diluées au 1/10^{ème} jusqu'à la dilution 10⁻⁶. Les différentes dilutions sont étalées sur milieu de culture non sélectif et les boîtes sont exposées aux agents ionisant aux doses souhaitées. Dans le cas de l'irradiation UV nous utilisons une lampe émettant une longueur d'onde de 264 nm à 1 J.m⁻².s⁻¹. Pour les irradiations gamma, nous avons utilisé un irradiateur IBL637 contenant une source de Cesium 137 qui délivre 20 Gy.min⁻¹. Une fois l'irradiation réalisée, nous incubons les bactéries à 37°C en conditions microaérophile pendant 3 à 4 jours. Le taux de survie est déterminé par le nombre de colonies ayant poussés par rapport à des bactéries non irradiées.

Test de recombinaison intrachromosomique

Des cellules de *H. pylori* possédant le système KDA (Marsin et al., 2008, figure 42) sont reprises à DO600 nm=10. Pour chaque souche, trois spots de 15 µl sont déposés sur des boîtes de culture non sélectives. Après 24 h de croissance, les spots sont repris dans de l'eau peptonée et des dilutions successives au 1/10^{ème} sont réalisées jusqu'à atteindre la dilution 10⁻⁶. Dix microlitres de chaque dilution sont déposés sur boîte au sang avec ou sans kanamycine. Après 3 à 5 jours de croissance à 37°C en atmosphère microaéroophile la fréquence de recombinaison est déterminée par la fréquence des colonies devenues résistantes à la Kanamycine.

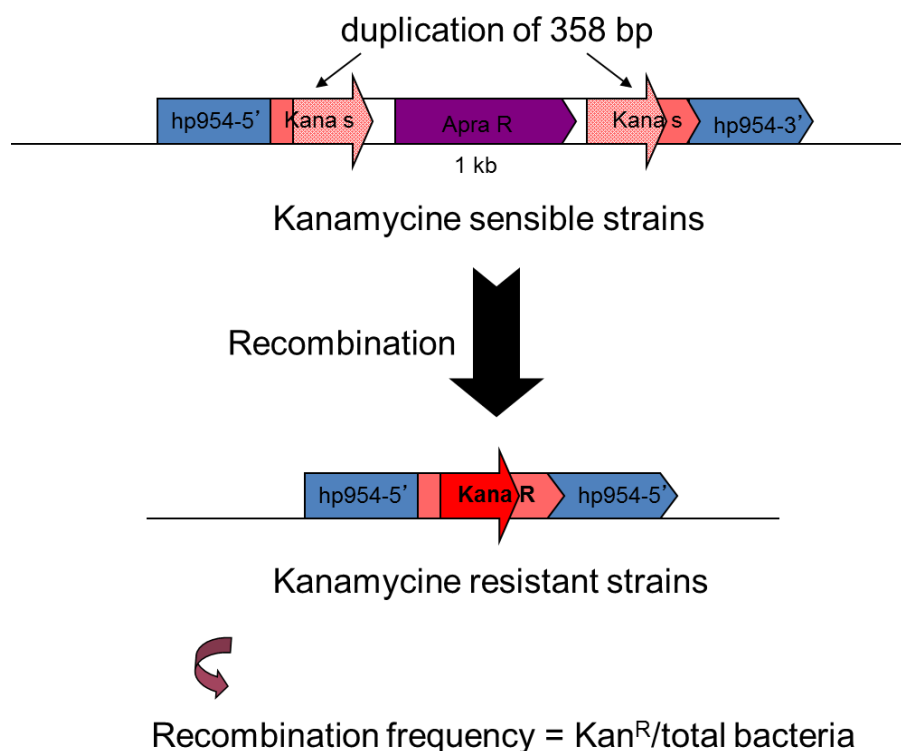


Figure 42 : Présentation du système KDA.

Marquage de l'ADN en 5' au phosphore P³²

Le marquage est réalisé dans un mix réactionnel de 20 µl composé de 1 µM d'ADN, 1 µl de T4 polynucléotide kinase (10 unités) (Biolabs), de T4PNK buffer 1X (Biolabs) et 0.4 µM d'ATP32 à 3000Ci/mmol a été incubé 1h à 37°C. Une fois la réaction de marquage terminée, l'ADN est purifié sur colonne d'exclusion Probquant G-50 micro columns (GE Healthcare) selon le protocole du fabricant. Le rendement estimé est supérieur à 80%.

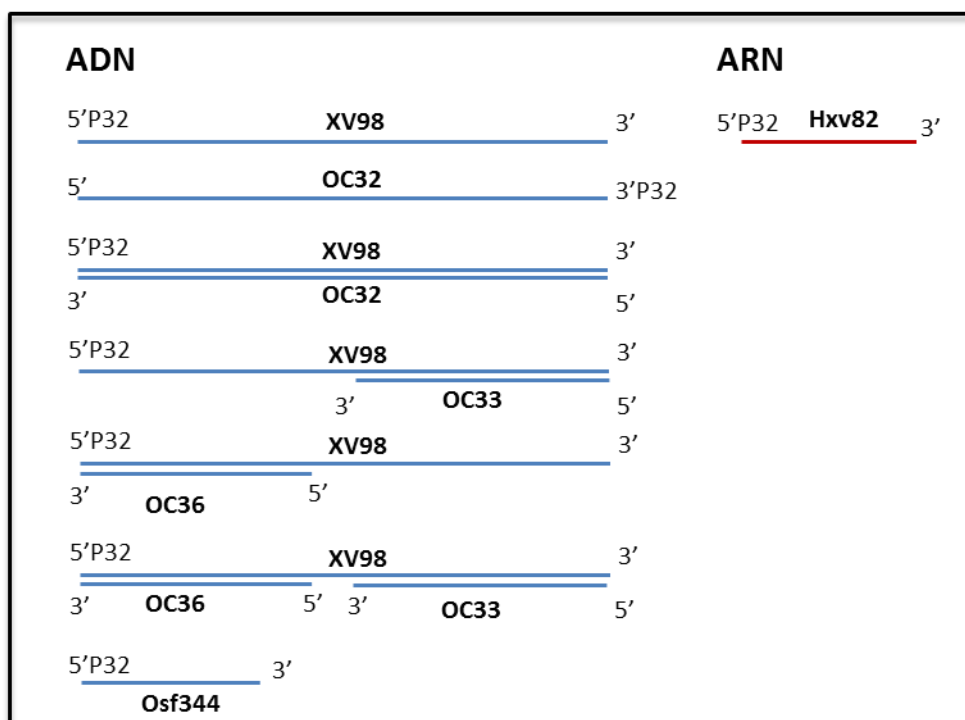
Marquage de l'ADN en 3' au phosphore P³²

Le marquage est réalisé dans un mix réactionnel de 50 µl composé de 0.4 µM d'ADN, 2 µl de Terminal Transférase (40 unités) (Biolabs), de Tampon 4 1X (Biolabs), 0.25 mM de CoCl₂ et 2 µl d'ATP-alpha-P³² à 5000Ci/mmol a été incubé 1 h à 37°C. Une fois la réaction de marquage terminée, l'ADN est purifié sur colonne d'exclusion Probquant G-50 micro columns (GE Healthcare) selon le protocole du fabricant. Le rendement estimé est supérieur à 80%.

Séquence des oligonucléotides utilisés comme substrats

Nom	Séquence
XV-98	5'- CAACGGCATAAAGCTTGACGATTACATTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC -3'
OC32	5'-GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGTTG-3'
OC33	5'-GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC-3'
OC36	5'-TAGCAATGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGTTG-3'
OSF344	5'-CGCAGCTCACTTTAAGGACTTTCC-3'
Hxv82	5'-CCAAUGUCCUUGACGCUGUCUAGAG-3'

Substrats utilisés



Hybridation des substrats d'ADN pour test d'activité

Notre substrat d'ADN simple brin marqué au P32 (ADN*) est dans certains cas hybridé avec une séquence complémentaire. Pour cela, nous avons réalisé un mix de 50 µl constitué de 1 µl d'ADN*, 4.0 µM d'ADN non marqué, 5 µM de séquence complémentaire et du tampon Tris EDTA 1X (TE). Ce mix a été chauffé 5 min à 95°C afin d'éliminer toutes les structures secondaires présentes sur l'ADN. Le tube est par la suite laissé à refroidir sur la nuit afin de permettre l'hybridation entre les séquences complémentaires.

Vérification des substrats d'ADN

Afin de vérifier l'efficacité des étapes de purification et d'hybridation, les substrats d'ADN sont mis à migrer sur gel non dénaturant 8% acrylamide/bis-acrylamide 29:1 en TBE 0.5X. Un mix composé de 2µL de glycérol 40% et 2µL d'ADN* (dilué au 1/50) est déposé en contrôle. La migration s'effectue pendant 40 min à 120 Volt.

Test d'activité sur la protéine NucT

Les tests d'activité sont tous, sauf précision, réalisés en tampon Tris HCl pH6 100 mM, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et en présence de BSA à 0.1 mg/ml final. La réaction de dégradation est réalisée à 37°C pendant 30 min. Une fois la réaction arrivée à son terme, l'activité enzymatique de NucT est stoppée par ajout de 5 µl de bleu de formamide (formamide 80%, bleu de bromophénol 0.1%, TBE 0.5X) et chauffage des échantillons à 95°C pendant 5 min.

Test d'activité : migration des échantillons sur gel dénaturant

A l'issue du chauffage, les différents échantillons sont mis à migrer sur gel dénaturant 20% Acrylamide/bis-acrylamide (19:1), 8M Urée, TBE 0.5X pendant 60 min à 400V. Le gel est ensuite recouvert d'un écran de stockage de phosphore (Amersham) et placé à 4°C pendant 12 à 16h.

Test de gel retard

Les tests de gel retard sont tous réalisés en tampon Tris HCl pH7, 50 mM NaCl, 12.5% glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et en présence de BSA à 0.1 mg/mL final. L'interaction ADN protéine est effectuée sur la glace pendant 10 min.

Gel retard : migration des échantillons sur gel non dénaturant

A l'issue des 10 min d'incubation, les différents échantillons sont mis à migrer sur gel non dénaturant 6% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 5% glycérol, TBE 0.25X pendant 60 min à 100V. Le gel est ensuite recouvert d'un écran de stockage de phosphore (Amersham) et placé à 4°C pendant 6h.

Révélation de la radioactivité

La révélation des écrans a été réalisée sur un phospho-imageur Typhoon 9400 (Amersham).

MBP-pulldown

Les tampons utilisés dans cette expérience sont tous des tampons à base de Tris HCL 100mM dont le pH a été ajusté à 7.

Fixation de NucT MBP sur la résine

Afin de réaliser la purification des protéines, 20 µl de résine d'amylose sont préalablement lavés avec 500µL d'eau puis équilibrés dans 500 µl de tampon Tris HCl pH7, 250 mM NaCl. La résine est ensuite transférée dans un tube à hémolyse où sont ajoutés 2.2 mg d'extraits protéiques contenant majoritairement la protéine NucT-MBP (extraits périsplasmiques). Le mélange est placé sous agitation 1h à 4°C. Une fois le temps d'incubation terminé, la résine est récupérée et lavée avec un tampon à 500 mM de NaCl puis un tampon à 100 mM NaCl.

Pulldown

Approximativement 500 µg d'extraits périsplasmiques de *H. pylori* sont mélangés à la résine d'amylose qui a fixé la protéine NucT-MBP. Le mélange est incubé sous agitation 2h à 4°C. Une fois l'incubation terminée, le surnageant est retiré et la résine est lavée 3 fois avec du tampon à 100 mM NaCl, 0.05% Nonidet NP40. Les protéines sont enfin éluées par ajout de 25 µl de tampon à 350 mM NaCl, 0.05% Nonidet NP40. Le mélange est incubé sous agitation 10min à 4°C et le surnageant est repris dans 12.5 µl de tampon Laemli 3X. Les échantillons sont conservés à -20°C.

Annexes

Tableau S1: Liste des bactéries compétentes. (Johnston et al., 2014)

Phylum	Nom d'espèce
Firmicutes (other)	<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50
Firmicutes (Bacilli)	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
	<i>Bacillus subtilis</i> 168
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42
Firmicutes (other)	<i>Lactobacillus sakei</i> 23K
	<i>Leuconostoc carnosum</i> JB16
Firmicutes (Streptococci)	<i>Streptococcus mutans</i> UA159
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i> JIM8777
	<i>Streptococcus infantarius</i> CJ18
	<i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198
	<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338
	<i>Streptococcus oralis</i> Uo5
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
	<i>Streptococcus mitis</i> B6
	<i>Streptococcus intermedius</i> JTH08
	<i>Streptococcus anginosus</i> SK1138
	<i>Streptococcus cristatus</i>
	<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36
	<i>Streptococcus gordonii</i> Challis
Chroococcales	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1
(Cyanobacteria)	<i>Synechocystis</i> spp. PCC6803
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301
Bacteroidia	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83
	<i>Chlorobium limicola</i> DSM 245
Chlorobi	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS
	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1
Deinococci	<i>Thermus thermophilus</i> HB27
Actinobacteria	<i>Streptomyces virginiae</i> (spp.) SirexAA-E
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>
Proteobacteria (b)	<i>Thiobacillus thioparus</i> DSM 505
	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
	<i>Achromobacter</i> spp. SY8
	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090
	<i>Kingella kingae</i> ATCC 23330
	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 3339

Proteobacteria (g)	<i>Xylella fastidiosa</i> M12
	<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1
	<i>Acinetobacter baylyi</i> TG19579
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; ATCC BAA-1303
	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp
	<i>Vibrio fischeri</i> ES114
	<i>Vibrio cholerae</i> N16961
	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6
	<i>Vibrio paraheamolyticus</i> O3:K6
	<i>Vibrio</i> spp. EX25
	<i>Escherichia colic</i> K-12
	<i>Gallibacterium anatis</i> UMN179
	<i>Actinobacillus suis</i> H91-0380
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20
	<i>Haemophilus parasuis</i> SH0165
	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1
	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	
Firmicutes (Bacilli)	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Firmicutes (other)	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
Firmicutes (Streptococci)	<i>Streptococcus constellatus</i> ATCC 51100
	<i>Streptococcus infantis</i>
Chroococcales	<i>Nostoc muscorum</i>
Deinococci	<i>Thermus aquaticus</i>
	<i>Thermus caldophilus</i>
	<i>Thermus flavus</i>
Proteobacteria (b)	<i>Eikenella corrodens</i>
	<i>Thiobacillus</i> spp. Strain Y
Proteobacteria (g)	<i>Cardiobacterium hominis</i>
	<i>Moraxella</i> spp.
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
Proteobacteria (e)	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Campylobacter coli</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i>
Proteobacteria (a)	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	<i>Methylobacterium organophilum</i>
Euryarchaeota	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
	<i>Methanococcus voltae</i>

Tableau S2: MBP pulldown contre NucT. Les candidats les plus intéressants sont surlignés en jaune

GI accession	GB accession	protéine	NucT-MBP	Contrôle MBP	Fold Change	pValue
2313422	AAD07391.1	membrane bound endonuclease (nuc)	41,018	1,142	31,88	0,000
2314302	AAD08191.1	ribosomal protein L19 (rpl19)	8,682	0,000	40,33	0,000
409894622	AFV42680.1	hypothetical protein C694_07555	7,953	0,000	79,67	0,000
2313524	AAD07486.1	arginine decarboxylase (speA)	7,057	0,185	31,19	0,000
2314472	AAD08349.1	ribosomal protein L14 (rpl14)	5,877	0,000	27,00	0,000
2314765	AAD08620.1	pyridoxal phosphate biosynthetic protein J (pdxJ)	5,791	0,808	6,48	0,000
2314481	AAD08358.1	ribosomal protein L3 (rpl3)	5,761	0,000	41,67	0,000
2314602	AAD08469.1	conserved hypothetical ATP-binding protein	5,366	0,569	8,89	0,000
409894510	AFV42568.1	protease	4,784	3,002	1,58	0,001
2313574	AAD07532.1	oligoendopeptidase F (pepF)	4,655	1,877	2,45	0,000
2314355	AAD08240.1	ribosomal protein S7 (rps7)	4,399	0,501	6,83	0,000
2314477	AAD08354.1	ribosomal protein S19 (rps19)	4,307	2,434	1,69	0,010
2313394	AAD07365.1	ribosomal protein L21 (rpl21)	3,644	2,288	1,53	0,004
2314460	AAD08337.1	ribosomal protein S4 (rps4)	3,424	1,837	1,81	0,021
2314589	AAD08457.1	conserved hypothetical protein	3,153	0,000	14,67	0,000
2314465	AAD08342.1	ribosomal protein L15 (rpl15)	3,021	1,745	1,66	0,002
2313283	AAD07263.1	UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl) glucosamine N-acyltransferase (lp	2,976	0,519	5,09	0,000
2314183	AAD08082.1	ribosomal protein S15 (rps15)	2,889	0,096	8,25	0,000
2314467	AAD08344.1	ribosomal protein L18 (rpl18)	2,576	0,662	3,17	0,000
2314412	AAD08292.1	ribosomal protein S6 (rps6)	2,417	1,297	1,76	0,001
2314476	AAD08353.1	ribosomal protein L22 (rpl22)	2,296	0,459	3,67	0,000
2313164	AAD07153.1	ribosomal protein S9 (rps9)	2,276	1,104	1,89	0,009
2313987	AAD07901.1	GMP reductase (guaC)	1,944	0,583	3,04	0,001
2314478	AAD08355.1	ribosomal protein L2 (rpl2)	1,917	0,264	5,55	0,000
2313621	AAD07575.1	glutamine synthetase (glnA)	1,909	0,422	4,12	0,005
2314675	AAD08537.1	general stress protein (ctc)	1,862	0,453	3,33	0,000
2314202	AAD08099.1	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase (panB)	1,672	0,736	2,12	0,000
2314229	AAD08125.1	predicted coding region HP1079	1,609	0,000	24,00	0,000
2314310	AAD08199.1	ribosomal protein S16 (rps16)	1,561	0,558	2,13	0,004
2314413	AAD08293.1	virulence associated protein homolog (vacB)	1,498	0,000	38,00	0,000
2314469	AAD08346.1	ribosomal protein S8 (rps8)	1,450	0,395	2,78	0,002
2313248	AAD07230.1	conserved hypothetical secreted protein, HP160	1,409	0,323	3,64	0,003
2313271	AAD07252.1	serine hydroxymethyltransferase (glyA)	1,313	0,744	1,70	0,007
2313209	AAD07194.1	ribosomal protein L20 (rpl20)	1,284	0,571	1,91	0,005
2313079	AAD07075.1	riboflavin synthase beta chain (ribE)	1,116	0,000	7,33	0,000
2313541	AAD07501.1	IS605 transposase (tnpB)	1,097	0,000	19,00	0,001
2313405	AAD07375.1	conserved hypothetical protein	1,012	0,399	2,25	0,021
2314197	AAD08095.1	homoserine kinase (thrB)	0,950	0,000	11,33	0,001
2314521	AAD08395.1	adenine specific DNA methyltransferase (HINFIM)	0,908	0,502	1,71	0,003
2313431	AAD07399.1	ketol-acid reductoisomerase (ilvC)	0,904	0,000	12,00	0,000
2313630	AAD07583.1	heat shock protein (hslV)	0,850	0,200	2,86	0,001
2313855	AAD07779.1	conserved hypothetical protein	0,805	0,000	11,67	0,003
2313995	AAD07909.1	lipid A disaccharide synthetase (lpxB)	0,795	0,241	2,77	0,002
2313624	AAD07578.1	predicted coding region HP0508	0,684	0,209	2,79	0,001
2313469	AAD07435.1	biotin carboxyl carrier protein (fabE)	0,584	0,000	4,33	0,003
2314356	AAD08241.1	ribosomal protein S12 (rps12)	0,464	0,066	2,50	0,016
2313340	AAD07315.1	ATP-dependent RNA helicase, DEAD-box family (deaD), HP0247	0,412	0,233	1,63	0,045
2313459	AAD07426.1	predicted coding region HP0356	0,403	0,067	3,00	0,025
2314449	AAD08327.1	conserved hypothetical protein, HP1284	0,333	0,000	5,33	0,018
2313132	AAD07124.1	adenine/cytosine DNA methyltransferase	0,231	0,000	8,33	0,004
2314295	AAD08185.1	SpoOJ regulator (soj)	0,172	0,034	2,00	0,049
2314538	AAD08411.1	type IIS restriction enzyme M1 protein (mod)	0,164	0,000	2,67	0,027
2313620	AAD07574.1	dihydrodipicolinate reductase (dapB)	0,144	0,000	2,33	0,049

Rôle potentiel: Biogénèse du peptidoglycane ou des membranes

Rôle potentiel: réplication, réparation, recombinaison.
Localisé dans une région du chromosome où la plupart des gènes sont sécrétés ou localisés dans les membranes

Rôle potentiel: transduction du signal

Bibliographie

- Alloway, J.L., 1932. THE TRANSFORMATION IN VITRO OF R PNEUMOCOCCI INTO S FORMS OF DIFFERENT SPECIFIC TYPES BY THE USE OF FILTERED PNEUMOCOCCUS EXTRACTS. *J Exp Med* 55, 91–99.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F., Trust, T.J., 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 176–180. doi:10.1038/16495
- Ando, T., Israel, D.A., Kusugami, K., Blaser, M.J., 1999. HP0333, a member of the *dprA* family, is involved in natural transformation in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 181, 5572–5580.
- Antonova, E.S., Hammer, B.K., 2011. Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 322, 68–76. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02328.x
- Aras, R.A., Small, A.J., Ando, T., Blaser, M.J., 2002. *Helicobacter pylori* interstrain restriction-modification diversity prevents genome subversion by chromosomal DNA from competing strains. *Nucleic Acids Res.* 30, 5391–5397.
- Aravind, L., Makarova, K.S., Koonin, E.V., 2000. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res* 28, 3417–3432.
- Asahi, A., Nishimoto, T., Okazaki, Y., Suzuki, H., Masaoka, T., Kawakami, Y., Ikeda, Y., Kuwana, M., 2008. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocyte FcγRIIB balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. *J. Clin. Invest.* 118, 2939–2949. doi:10.1172/JCI34496
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., 1944. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *J Exp Med* 79, 137–158.
- Baltrus, D.A., Guillemin, K., 2006. Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 148–155. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00066.x
- Baltrus, D.A., Guillemin, K., Phillips, P.C., 2008. Natural transformation increases the rate of adaptation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Evolution* 62, 39–49. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00271.x
- Barany, F., Kahn, M.E., Smith, H.O., 1983. Directional transport and integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 7274–7278.
- Bergé, M.J., Kamgoué, A., Martin, B., Polard, P., Campo, N., Claverys, J.-P., 2013. Midcell recruitment of the DNA uptake and virulence nuclease, *EndA*, for pneumococcal transformation. *PLoS Pathog.* 9, e1003596. doi:10.1371/journal.ppat.1003596

- Bergé, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B., Claverys, J.-P., 2003. Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Molecular Microbiology* 50, 527–536. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03702.x
- Bessa, L.J., Grande, R., Di Iorio, D., Di Giulio, M., Di Campli, E., Cellini, L., 2013. *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media. *APMIS* 121, 549–560. doi:10.1111/apm.12020
- Björkholm, B., Sjölund, M., Falk, P.G., Berg, O.G., Engstrand, L., Andersson, D.I., 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14607–14612. doi:10.1073/pnas.241517298
- Blokesch, M., Schoolnik, G.K., 2008. The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 190, 7232–7240. doi:10.1128/JB.00959-08
- Blokesch, M., Schoolnik, G.K., 2007. Serogroup Conversion of *Vibrio cholerae* in Aquatic Reservoirs. *PLoS Pathog* 3. doi:10.1371/journal.ppat.0030081
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., Blokesch, M., 2015. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* 347, 63–67. doi:10.1126/science.1260064
- Briley Jr, K., Prepiak, P., Dias, M.J., Hahn, J., Dubnau, D., 2011. Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Molecular Microbiology* 81, 23–39. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07695.x
- Cameron, A.D.S., Volar, M., Bannister, L.A., Redfield, R.J., 2008. RNA secondary structure regulates the translation of *sxy* and competence development in *Haemophilus influenzae*. *Nucleic Acids Res.* 36, 10–20. doi:10.1093/nar/gkm915
- Carlson, C.A., Pierson, L.S., Rosen, J.J., Ingraham, J.L., 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J Bacteriol* 153, 93–99.
- Cehovin, A., Simpson, P.J., McDowell, M.A., Brown, D.R., Noschese, R., Pallett, M., Brady, J., Baldwin, G.S., Lea, S.M., Matthews, S.J., Pelicic, V., 2013. Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3065–3070. doi:10.1073/pnas.1218832110
- Cellini, L., 2014. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life. *World J. Gastroenterol.* 20, 5575–5582. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5575
- Chandler, M.S., 1992. The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1626–1630.
- Chang, K.C., Yeh, Y.C., Lin, T.L., Wang, J.T., 2001. Identification of genes associated with natural competence in *Helicobacter pylori* by transposon shuttle random mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 961–968. doi:10.1006/bbrc.2001.5877

- Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., Shuman, H.A., 2011. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 193, 1114–1121. doi:10.1128/JB.01146-10
- Charpentier, X., Polard, P., Claverys, J.-P., 2012. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 570–576. doi:10.1016/j.mib.2012.08.001
- Chen, I., Dubnau, D., 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 241–249. doi:10.1038/nrmicro844
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., Martin, B., 2006. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 451–475. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142139
- Coticchia, J.M., Sugawa, C., Tran, V.R., Gurrola, J., Kowalski, E., Carron, M.A., 2006. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. *J. Gastrointest. Surg.* 10, 883–889. doi:10.1016/j.gassur.2005.12.009
- Croucher, N.J., Harris, S.R., Fraser, C., Quail, M.A., Burton, J., van der Linden, M., McGee, L., von Gottberg, A., Song, J.H., Ko, K.S., Pichon, B., Baker, S., Parry, C.M., Lambertsen, L.M., Shahinas, D., Pillai, D.R., Mitchell, T.J., Dougan, G., Tomasz, A., Klugman, K.P., Parkhill, J., Hanage, W.P., Bentley, S.D., 2011. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 331, 430–434. doi:10.1126/science.1198545
- C Stewart Goodwin, 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov as *Helicobacter pylori* comb . nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively p. 397–405.
- Damke, P.P., Dhanaraju, R., Marsin, S., Radicella, J.P., Rao, D.N., 2015. The nuclease activities of both the Smr domain and an additional LDLK motif are required for an efficient anti-recombination function of *Helicobacter pylori* MutS2. *Mol. Microbiol.* 96, 1240–1256. doi:10.1111/mmi.13003
- Danner, D.B., Deich, R.A., Sisco, K.L., Smith, H.O., 1980. An eleven-base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Gene* 11, 311–318.
- Danner, D.B., Smith, H.O., Narang, S.A., 1982. Construction of DNA recognition sites active in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2393–2397.
- Dillingham, M.S., Kowalczykowski, S.C., 2008. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 642–671. doi:10.1128/MMBR.00020-08
- Dore, M.P., Sepulveda, A.R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M.S., Mototsugu, K., Nieddu, A.M., Realdi, G., Graham, D.Y., 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1396–1401. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03772.x

- Dorer, M.S., Fero, J., Salama, N.R., 2010. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog.* 6, e1001026. doi:10.1371/journal.ppat.1001026
- Dubnau, D., 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 217–244. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.217
- Duffin, P.M., Seifert, H.S., 2010. DNA Uptake Sequence-Mediated Enhancement of Transformation in *Neisseria gonorrhoeae* Is Strain Dependent. *J Bacteriol* 192, 4436–4444. doi:10.1128/JB.00442-10
- Dwivedi, G.R., Sharma, E., Rao, D.N., 2013. *Helicobacter pylori* DprA alleviates restriction barrier for incoming DNA. *Nucleic Acids Res.* 41, 3274–3288. doi:10.1093/nar/gkt024
- Elkins, C., Thomas, C.E., Seifert, H.S., Sparling, P.F., 1991. Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol* 173, 3911–3913.
- Falush, D., Kraft, C., Taylor, N.S., Correa, P., Fox, J.G., Achtman, M., Suerbaum, S., 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15056–15061. doi:10.1073/pnas.251396098
- Foster, P.L., 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat. Res.* 569, 3–11. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.07.017
- Gagne, A.L., Stevens, K.E., Cassone, M., Pujari, A., Abiola, O.E., Chang, D.J., Seibert, M.E., 2013. Competence in *Streptococcus pneumoniae* is a response to an increasing mutational burden. *PLoS ONE* 8, e72613. doi:10.1371/journal.pone.0072613
- Gangel, H., Hepp, C., Müller, S., Oldewurtel, E.R., Aas, F.E., Koomey, M., Maier, B., 2014. Concerted Spatio-Temporal Dynamics of Imported DNA and ComE DNA Uptake Protein during Gonococcal Transformation. *PLoS Pathog* 10, e1004043. doi:10.1371/journal.ppat.1004043
- García-Ortíz, M.-V., Marsin, S., Arana, M.E., Gasparutto, D., Guérois, R., Kunkel, T.A., Radicella, J.P., 2011. Unexpected Role for *Helicobacter pylori* DNA Polymerase I As a Source of Genetic Variability. *PLoS Genet* 7. doi:10.1371/journal.pgen.1002152
- Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y., Musser, J.M., 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 178, 3934–3938.
- Goodgal, S.H., Mitchell, M., 1984. Uptake of heterologous DNA by *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 157, 785–788.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 1–13.
- Graham, D.Y., Opekun, A.R., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M.T., Lee, C.K., Yamaoka, Y., Qureshi, W.A., Cadoz, M., Monath, T.P., 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 53, 1235–1243. doi:10.1136/gut.2003.037499

- Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L.J., Di Campi, E., Baffoni, M., Guarnieri, S., Cellini, L., 2011. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *J. Appl. Microbiol.* 110, 490–498. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04911.x
- Graupner, S., Wackernagel, W., 2001. *Pseudomonas stutzeri* Has Two Closely Related pilA Genes (Type IV Pilus Structural Protein) with Opposite Influences on Natural Genetic Transformation. *J. Bacteriol.* 183, 2359–2366. doi:10.1128/JB.183.7.2359-2366.2001
- Griffith, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg (Lond)* 27, 113–159.
- Guerrini, F., Fox, M.S., 1968. Effects of DNA repair in transformation-heterozygotes of pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 1116–1123.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., Claverys, J.-P., 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8710–8715. doi:10.1073/pnas.0500879102
- Hahn, J., Maier, B., Haijema, B.J., Sheetz, M., Dubnau, D., 2005. Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* 122, 59–71. doi:10.1016/j.cell.2005.04.035
- Haijema, B.J., Hahn, J., Haynes, J., Dubnau, D., 2001. A ComGA-dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Mol. Microbiol.* 40, 52–64.
- Hamilton, H.L., Dillard, J.P., 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Molecular Microbiology* 59, 376–385. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04964.x
- Hamilton, H.L., Domínguez, N.M., Schwartz, K.J., Hackett, K.T., Dillard, J.P., 2005. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology* 55, 1704–1721. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x
- Hammer, B.K., Bassler, B.L., 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 50, 101–104.
- Handt, L.K., Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Paster, B.J., Yan, L.L., Rozmiarek, H., Rufo, R., Stalis, I.H., 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect. Immun.* 62, 2367–2374.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., Claverys, J.-P., 2006. New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* 59, 1297–1307. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05021.x
- Hoelzer, M.A., Michod, R.E., 1991. DNA Repair and the Evolution of Transformation in *Bacillus Subtilis*. III. Sex with Damaged DNA. *Genetics* 128, 215–223.

- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Haas, R., 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 41, 379–391.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G., Haas, R., 1998. Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol. Microbiol.* 28, 1027–1038.
- Huang, X., Qu, X., Yan, W., Huang, Y., Cai, M., Hu, B., Wu, L., Lin, H., Chen, Z., Zhu, C., Lu, L., Sun, X., Rong, L., Jiang, Y., Sun, D., Zhong, L., Xiong, P., 2010. Iron deficiency anaemia can be improved after eradication of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J* 86, 272–278. doi:10.1136/pgmj.2009.089987
- Humbert, O., Dorer, M.S., Salama, N.R., 2011. Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination. *Mol. Microbiol.* 79, 387–401. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07456.x
- Ipsaro, J.J., Haase, A.D., Knott, S.R., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2012. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 279–283. doi:10.1038/nature11502
- Johnsborg, O., Håvarstein, L.S., 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 627–642.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J.-P., 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Micro* 12, 181–196. doi:10.1038/nrmicro3199
- Johnston, C., Martin, B., Polard, P., Claverys, J.-P., 2013. Postreplication targeting of transformants by bacterial immune systems? *Trends Microbiol.* 21, 516–521. doi:10.1016/j.tim.2013.08.002
- Kahn, M.E., Barany, F., Smith, H.O., 1983. Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6927–6931.
- Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D., Haas, R., 2006. Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 188, 882–893. doi:10.1128/JB.188.3.882-893.2006
- Kidane, D., Ayora, S., Sweasy, J.B., Graumann, P.L., Alonso, J.C., 2012. The cell pole: the site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 531–555. doi:10.3109/10409238.2012.729562
- Kidane, D., Carrasco, B., Manfredi, C., Rothmaier, K., Ayora, S., Tadesse, S., Alonso, J.C., Graumann, P.L., 2009. Evidence for Different Pathways during Horizontal Gene Transfer in Competent *Bacillus subtilis* Cells. *PLoS Genet* 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000630

- Kuipers, E.J., Israel, D.A., Kusters, J.G., Blaser, M.J., 1998. Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 180, 2901–2905.
- Kulick, S., Moccia, C., Didelot, X., Falush, D., Kraft, C., Suerbaum, S., 2008. Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE* 3, e3797. doi:10.1371/journal.pone.0003797
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* 19, 449–490. doi:10.1128/CMR.00054-05
- Lai, E.M., Kado, C.I., 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* 8, 361–369.
- Liechti, G.W., Goldberg, J.B., 2013. *Helicobacter pylori* salvages purines from extracellular host cell DNA utilizing the outer membrane-associated nuclease NucT. *J. Bacteriol.* 195, 4387–4398. doi:10.1128/JB.00388-13
- Lin, E.A., Zhang, X.-S., Levine, S.M., Gill, S.R., Falush, D., Blaser, M.J., 2009. Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog.* 5, e1000337. doi:10.1371/journal.ppat.1000337
- Lin, L.-F., Posfai, J., Roberts, R.J., Kong, H., 2001. Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2740–2745. doi:10.1073/pnas.051612298
- Linz, B., Schuster, S.C., 2007. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. *Research in Microbiology, Microbial genomics* 158, 737–744. doi:10.1016/j.resmic.2007.09.006
- Lopez, P., Espinosa, M., Stassi, D.L., Lacks, S.A., 1982. Facilitation of plasmid transfer in *Streptococcus pneumoniae* by chromosomal homology. *J. Bacteriol.* 150, 692–701.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563–602.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1991. High Frequency of Natural Genetic Transformation of *Pseudomonas stutzeri* in Soil Extract Supplemented with a Carbon/Energy and Phosphorus Source. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1246–1251.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1990. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch. Microbiol.* 154, 380–385.
- Luo, C.-H., Chiou, P.-Y., Yang, C.-Y., Lin, N.-T., 2012. Genome, integration, and transduction of a novel temperate phage of *Helicobacter pylori*. *J. Virol.* 86, 8781–8792. doi:10.1128/JVI.00446-12
- Maamar, H., Dubnau, D., 2005. Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol. Microbiol.* 56, 615–624. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04592.x

- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D., Sheetz, M.P., 2004. DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 643–649. doi:10.1038/nsmb783
- Malaty, H.M., Graham, D.Y., 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35, 742–745.
- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., Glancy, R.J., 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142, 436–439.
- Marshall, B.J., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311–1315.
- Marsin, S., Lopes, A., Mathieu, A., Dizet, E., Orillard, E., Guérois, R., Radicella, J.P., 2010. Genetic dissection of *Helicobacter pylori* AddAB role in homologous recombination. *FEMS Microbiol. Lett.* 311, 44–50. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02077.x
- Marsin, S., Mathieu, A., Kortulewski, T., Guérois, R., Radicella, J.P., 2008. Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS Genet.* 4, e1000146. doi:10.1371/journal.pgen.1000146
- Martin, B., Soulet, A.-L., Mirouze, N., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., Claverys, J.-P., 2013. ComE/ComE~P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence). *Mol. Microbiol.* 87, 394–411. doi:10.1111/mmi.12104
- Mathieu, A., O'Rourke, E.J., Radicella, J.P., 2006. *Helicobacter pylori* genes involved in avoidance of mutations induced by 8-oxoguanine. *J. Bacteriol.* 188, 7464–7469. doi:10.1128/JB.00851-06
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y., Schoolnik, G.K., 2005. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824–1827. doi:10.1126/science.1120096
- Meier, P., Berndt, C., Weger, N., Wackernagel, W., 2002. Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* by single-stranded DNA requires type IV pili, competence state and comA. *FEMS Microbiology Letters* 207, 75–80. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11031.x
- Méjean, V., Claverys, J.P., 1993. DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 268, 5594–5599.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., Lestini, R., 2007. Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst.)* 6, 967–980. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.016
- Michod, R.E., Wojciechowski, M.F., Hoelzer, M.A., 1988. DNA Repair and the Evolution of Transformation in the Bacterium *Bacillus Subtilis*. *Genetics* 118, 31–39.
- Mirouze, N., Bergé, M.A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., Martin, B., Claverys, J.-P., 2013. Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the

- shut-off of pneumococcal competence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1035–1044. doi:10.1073/pnas.1219868110
- Mirouze, N., Desai, Y., Raj, A., Dubnau, D., 2012. Spo0A~P imposes a temporal gate for the bimodal expression of competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 8, e1002586. doi:10.1371/journal.pgen.1002586
- Mirouze, N., Ferret, C., Yao, Z., Chastanet, A., Carballido-López, R., 2015. MreB-Dependent Inhibition of Cell Elongation during the Escape from Competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 11, e1005299. doi:10.1371/journal.pgen.1005299
- Mongold, J.A., 1992. DNA repair and the evolution of transformation in *Haemophilus influenzae*. *Genetics* 132, 893–898.
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., Le Cam, E., Polard, P., Claverys, J.-P., 2007. A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* 130, 824–836. doi:10.1016/j.cell.2007.07.038
- Nedenskov-Sørensen, P., Bukholm, G., Bøvre, K., 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 161, 365–366.
- Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M.C., Nureki, O., 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 284–287. doi:10.1038/nature11509
- Orillard, E., Radicella, J.P., Marsin, S., 2011. Biochemical and cellular characterization of *Helicobacter pylori* RecA, a protein with high-level constitutive expression. *J. Bacteriol.* 193, 6490–6497. doi:10.1128/JB.05646-11
- O'Rourke, E.J., Pinto, A.V., Petroni, E.A., Tolmasky, M.E., Ielpi, L., 2004. Evidence for the active role of a novel nuclease from *Helicobacter pylori* in the horizontal transfer of genetic information. *J. Bacteriol.* 186, 2586–2593.
- Oyarzabal, O.A., Rad, R., Backert, S., 2007. Conjugative Transfer of Chromosomally Encoded Antibiotic Resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 45, 402–408. doi:10.1128/JCM.01456-06
- Papastergiou, V., Georgopoulos, S.D., Karatapanis, S., 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5, 392–399. doi:10.4291/wjgp.v5.i4.392
- Parrish, J.R., Yu, J., Liu, G., Hines, J.A., Chan, J.E., Mangiola, B.A., Zhang, H., Pacifico, S., Fotouhi, F., DiRita, V.J., Ideker, T., Andrews, P., Finley, R.L., 2007. A proteome-wide protein interaction map for *Campylobacter jejuni*. *Genome Biol* 8, R130. doi:10.1186/gb-2007-8-7-r130
- Perron, G.G., Lee, A.E.G., Wang, Y., Huang, W.E., Barraclough, T.G., 2012. Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug-resistance in functionally diverse populations. *Proc. Biol. Sci.* 279, 1477–1484. doi:10.1098/rspb.2011.1933

- Pinto, A.V., Mathieu, A., Marsin, S., Veaute, X., Ielpi, L., Labigne, A., Radicella, J.P., 2005. Suppression of homologous and homeologous recombination by the bacterial MutS2 protein. *Mol. Cell* 17, 113–120. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.035
- Provvedi, R., Chen, I., Dubnau, D., 2001. NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 40, 634–644.
- Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barrière, I., Brooks, M.A., Boudes, M., Durand, D., Soulet, A.-L., Lisboa, J., Noirot, P., Martin, B., van Tilbeurgh, H., Noirot-Gros, M.-F., Claverys, J.-P., Polard, P., 2012. Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2466–2475. doi:10.1073/pnas.1205638109
- Redfield, R.J., 2001. Do bacteria have sex? *Nat. Rev. Genet.* 2, 634–639. doi:10.1038/35084593
- Redfield, R.J., Cameron, A.D.S., Qian, Q., Hinds, J., Ali, T.R., Kroll, J.S., Langford, P.R., 2005. A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* 347, 735–747. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.012
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D., 2015. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43, D298–299. doi:10.1093/nar/gku1046
- Rohrer, S., Holsten, L., Weiss, E., Benghezal, M., Fischer, W., Haas, R., 2012. Multiple Pathways of Plasmid DNA Transfer in *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0045623
- Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., Asaka, M., 2003. Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J. Infect.* 46, 49–55.
- Scrudato, M. Lo, Blokesch, M., 2012. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 8, e1002778. doi:10.1371/journal.pgen.1002778
- Seitz, P., Blokesch, M., 2014. DNA Transport across the Outer and Inner Membranes of Naturally Transformable *Vibrio cholerae* Is Spatially but Not Temporally Coupled. *mBio* 5. doi:10.1128/mBio.01409-14
- Seitz, P., Blokesch, M., 2013. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 336–363. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x
- Sia, R.H.P., Dawson, M.H., 1931. IN VITRO TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *J Exp Med* 54, 701–710.
- Sinha, S., Mell, J.C., Redfield, R.J., 2012. Seventeen Sxy-Dependent Cyclic AMP Receptor Protein Site-Regulated Genes Are Needed for Natural Transformation in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 194, 5245–5254. doi:10.1128/JB.00671-12

- Sinha, S., Mell, J., Redfield, R., 2013. The availability of purine nucleotides regulates natural competence by controlling translation of the competence activator Sxy. *Mol. Microbiol.* 88, 1106–1119. doi:10.1111/mmi.12245
- Slager, J., Kjos, M., Attaiech, L., Veening, J.-W., 2014. Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell* 157, 395–406. doi:10.1016/j.cell.2014.01.068
- Smeets, L.C., Kusters, J.G., 2002. Natural transformation in *Helicobacter pylori*: DNA transport in an unexpected way. *Trends in Microbiology* 10, 159–162. doi:10.1016/S0966-842X(02)02314-4
- Specht, M., Dempwolff, F., Schätzle, S., Thomann, R., Waidner, B., 2013. Localization of FtsZ in *Helicobacter pylori* and Consequences for Cell Division. *J Bacteriol* 195, 1411–1420. doi:10.1128/JB.01490-12
- Stingl, K., Müller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., Maier, B., 2010. Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1184–1189. doi:10.1073/pnas.0909955107
- Suckow, G., Seitz, P., Blokesch, M., 2011. Quorum Sensing Contributes to Natural Transformation of *Vibrio cholerae* in a Species-Specific Manner[∇]. *J Bacteriol* 193, 4914–4924. doi:10.1128/JB.05396-11
- Suerbaum, S., Josenhans, C., 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Micro* 5, 441–452. doi:10.1038/nrmicro1658
- Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I., Achtman, M., 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12619–12624.
- Takeuchi, N., Kaneko, K., Koonin, E.V., 2013. Horizontal Gene Transfer Can Rescue Prokaryotes from Muller’s Ratchet: Benefit of DNA from Dead Cells and Population Subdivision. *G3 (Bethesda)* 4, 325–339. doi:10.1534/g3.113.009845
- Testerman, T.L., Morris, J., 2014. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* 20, 12781–12808. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12781
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., Sachs, G., 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287, 482–485.
- Wise, E.M., Alexander, S.P., Powers, M., 1973. Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate as a Regulator of Bacterial Transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 471–474.
- Yamamoto, S., Izumiya, H., Mitobe, J., Morita, M., Arakawa, E., Ohnishi, M., Watanabe, H., 2011. Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the

- tfoX gene, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 193, 1953–1965. doi:10.1128/JB.01340-10
- Yeh, Y.-C., Lin, T.-L., Chang, K.-C., Wang, J.-T., 2003. Characterization of a ComE3 homologue essential for DNA transformation in *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 71, 5427–5431.
- Zhang, X.-S., Blaser, M.J., 2012. DprB facilitates inter- and intragenomic recombination in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 194, 3891–3903. doi:10.1128/JB.00346-12
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L., Mekalanos, J.J., 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3129–3134. doi:10.1073/pnas.052694299
- Zullo, A., Hassan, C., Cristofari, F., Andriani, A., De Francesco, V., Ierardi, E., Tomao, S., Stolte, M., Morini, S., Vaira, D., 2010. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on early stage gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 105–110. doi:10.1016/j.cgh.2009.07.017