



HAL
open science

Etude de la méthylation de l'ADN chez la bactérie pathogène d'insectes *Photorhabdus luminescens*

Amaury Payelleville

► **To cite this version:**

Amaury Payelleville. Etude de la méthylation de l'ADN chez la bactérie pathogène d'insectes *Photorhabdus luminescens*. Bactériologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG063 . tel-02045899

HAL Id: tel-02045899

<https://theses.hal.science/tel-02045899>

Submitted on 22 Feb 2019

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.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie des Interactions - Mécanismes des Interactions Parasitaires Symbiotiques et Pathogènes

École doctorale GAIA

Unité de recherche 1333, DGIMI

Titre de la thèse

**Étude de la méthylation de l'ADN chez
Photorhabdus luminescens TT01**

Présentée par Amaury PAYELLEVILLE

Le 16 Novembre 2018

**Sous la direction de Julien BRILLARD
et Alain GIVAUDAN**

Devant le jury composé de

**Didier LERECLUS, DR, INRA
Eric CASCALES, DR, CNRS
Alice GUIDOT, CR, INRA
Mathieu SICARD, PR, UM
Julien BRILLARD, CR, INRA
Alain GIVAUDAN, DR, INRA**

**Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse**



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

À mes chers parents,

Monique VINOT et

Alain PAYELLEVILLE

Résumé :

Photorhabdus luminescens est une entérobactérie retrouvée en symbiose avec les nématodes du genre *Heterorhabditis*. Dans les sols, ce complexe némato-bactérien est pathogène d'insectes ravageurs et est utilisé en contrôle biologique. Le nématode pénètre dans l'insecte et libère la bactérie dans l'hémolymphe. *Photorhabdus* va ensuite se multiplier et sécréter divers facteurs de virulence comme des toxines. L'insecte meurt de septicémie puis le nématode et la bactérie vont se nourrir du cadavre. Une fois les ressources épuisées, le complexe némato-bactérien va se reformer et sortir du cadavre à la recherche d'une nouvelle cible. Plusieurs exemples d'hétérogénéité phénotypique ont été décrits chez cette bactérie amenant chacun à la présence de sous-populations dans une culture bactérienne. Cette hétérogénéité phénotypique peut-être causée par des mécanismes épigénétiques et plus précisément par la méthylation de l'ADN. Chez les entérobactéries, la méthyltransférase Dam est très conservée. Elle méthyle les adénines des sites GATC et est impliquée dans la réparation des erreurs lors de la réplication de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire mais aussi la régulation de divers gènes. Cette méthyltransférase est en compétition avec certain régulateurs transcriptionnel. Selon qui de la méthyltransférase ou du régulateur se fixera en premier, le gène sera ou non exprimé donnant naissance à deux sous-populations. Cette thèse a pour objectif de mettre en évidence les rôles de la méthyltransférase Dam chez *Photorhabdus luminescens*. Dans un premier temps, j'ai montré que la surexpression de Dam (Dam+) amène une diminution de la mobilité et du pouvoir pathogène de la bactérie mais à l'inverse augmente sa capacité à former des biofilms. Une analyse transcriptomique (RNAseq) a montré des différentiels d'expression de certains gènes impliqués dans les phénotypes observés. En recombinant la souche de *Photorhabdus* Dam+ avec les nématodes hôtes, l'effet sur la pathogénicité a été augmenté en comparaison des résultats après injection de la bactérie seule. L'établissement de la symbiose némato-bactérienne avec cette souche Dam+ n'est pas significativement impacté par rapport à la souche sauvage. Enfin l'analyse du méthylome (détection de tous les sites méthylés sur le génome grâce à la technique SMRT) de *Photorhabdus* dans diverses phases de croissance nous a permis de déterminer que la méthylation par Dam semble être stable aux différents temps de la croissance bactérienne testés chez *Photorhabdus*. Le méthylome de la souche Dam+ a confirmé l'hypothèse que cette surexpression augmentait le taux de méthylation des sites GATC sur le génome. La comparaison combinée entre le RNAseq et les sites GATC différentiellement méthylés entre la souche contrôle et Dam+ a mis en évidence certains gènes candidats ressortant de ces deux analyses. En effet, certains gènes sont différentiellement exprimés dans les deux souches et ont un différentiel de méthylation au niveau de sites GATC dans leur région promotrice, l'étude détaillée de leur régulation par la méthylation fait maintenant partie des perspectives et permettront peut-être d'expliquer une partie des phénotypes observés chez *Photorhabdus luminescens*.

Mots-clefs : Méthyltransférase, Virulence, Régulation de la transcription, Méthylome, RNAseq

Abstract :

Photorhabdus luminescens is an *Enterobacteriaceae* found in soils in symbiosis with a nematode from the genus *Heterorhabditis*. This nemato-bacterial complex is highly pathogenic against insect pest crops and so used in biocontrol. The nematode enters into the insect and releases *Photorhabdus* in the hemolymph of the insect. *Photorhabdus* multiplies and produces diverse virulence factors as toxins. Insect die from septicemia and both nematodes and bacteria feed on the nutrients in the cadaver. Once nutrients are lacking, the nematodes and the bacteria reassociate and exit from the cadaver to find new insects to infect. *Photorhabdus* is switching between pathogenic and symbiotic state. This bacterium displays phenotypic heterogeneity as we observe subpopulations coexisting in a same bacterial culture. Phenotypic heterogeneity can be explained by epigenetic mechanisms such as DNA methylation. In *Enterobacteriaceae*, Dam methyltransferase is broadly distributed. It methylates the adenine of GATC sites. Dam is involved in post-replicative mismatch repair, cell-cycle regulation and also gene transcription regulation. This methyltransferase can be in competition with some transcriptional regulators. Depending on which will bind first on the promoter region, gene will be expressed or not, leading to the rise of two subpopulations. This thesis aims to understand roles of Dam in *Photorhabdus luminescens*. Overexpression of the methyltransferase leads to a decrease in motility and pathogenicity of *Photorhabdus* Dam⁺ strain whereas it increases biofilms formation. A transcriptomic analysis (RNAseq) revealed differential expression of genes involved in the observed phenotypes. Symbiosis establishment does not seem to be strongly impacted in Dam⁺ strain as the only difference observed when compared to the nematode associated with the control strain is the same as with bacteria alone (a delayed virulence). A methylome analysis was also done (screening of all methylated sites in the genome using SMRT sequencing) in several growth conditions which revealed that DNA methylation is stable over growth kinetics. Dam⁺ strain methylome analysis confirmed the hypothesis that Dam overexpression increases GATC methylation over the genome. Comparative analysis of methylome and RNAseq experiments between control and Dam⁺ strains highlighted several common genes. In fact, some genes are differentially expressed between both strains and also have GATC sites differentially methylated in their promoter region. Their transcription regulation by methylation is a future aim and may give some explanation for a part of the phenotypes observed in *Photorhabdus luminescens*.

Keywords: Methyltransferase, Virulence, Gene transcription regulation, Methylome, RNAseq

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Didier LERECLUS et Eric CASCALES pour avoir accepté d'être membres rapporteurs du jury de cette thèse. Je tiens tout autant à remercier les deux membres examinateurs de ce jury : Alice GUIDOT et Mathieu SICARD.

Je tiens aussi à remercier l'école doctorale GAIA pour m'avoir financé et permis de réaliser ces trois ans de thèse ainsi que l'Université de Montpellier pour la formation m'ayant été fournie. J'aimerais aussi remercier l'INRA et plus particulièrement le département SPE m'ayant permis l'aboutissement de cette thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Josep CASADESUS, Anne-Blanc POTARD et Guillaume CHARRIERE pour leur aide lors des choix difficile et leur point de vue sur l'avancée de mes travaux.

J'ai forcément envie d'adresser un énorme remerciement à mes encadrants, Julien BRILLARD et Alain GIVAUDAN. Tout d'abord Julien pour le temps que tu as pris pour me former et la patience dont tu as fait preuve. Tu m'as permis de m'épanouir dans une thèse ou tout n'a pas toujours été facile. Ta confiance en moi et les libertés que tu m'as laissé prendre m'ont poussé à avancer et donner le meilleur au travers de cette épopée. Alain pour ta disponibilité malgré tes responsabilités et la qualité de tes réflexions sur mon travail. Vous m'avez tout deux permis d'arriver au bout de cette thèse et à me donner une envie de continuer dans la recherche encore plus grande qu'à mon arrivée dans ce laboratoire. Je n'oublierais pas non plus les nombreuses discussions œnologiques nous ayant rassemblé et permis de s'éclipser du cadre du travail. Encore un immense merci à vous deux !

J'ai une grande pensée pour Anne LANOIS qui m'a accompagné et guidé dans mes diverses péripéties de biologie moléculaire sans perdre espoir et en m'en redonnant quand je n'en avais plus ! Cette thèse n'aurait pas été la même sans ton expérience et ton investissement.

Je tiens aussi grandement à remercier Sylvie PAGES pour ton aide durant les suivis de pathogénèse et ta gentillesse. Jean-Claude OGIER pour ta bonne humeur et ton aide précieuse sur la phylogénie. Bernard DUVIC pour ta précieuse aide en informatique quand rien ne marchait ainsi que Sophie GAUDRIAULT pour ton point de vue et tes opinions originales si importantes en science.

Comment ne pas remercier la « Dream team » du labo Magalie EYCHENNE, Marie FRAYSSINET et Pierre-Alain GIRARD vous avez apporté votre bonne humeur dans ce travail et en dehors. Votre présence a été un bonus et un soutien essentiel à la réussite de cette thèse et je me souviendrais d'une journée en particulier pour illustrer ces propos 😊. Dans cette team je tiens aussi à citer Nicolas NEGRE avec qui j'aurais beaucoup discuté tant d'épigénétique que de la vie (scientifique ou non) et Guillaume CAMBRAY pour sa vision de la vie. Rien de tel qu'une IPA à vos côtés !

Mes remerciements vont aussi à l'inégalable équipe enseignante, Marie-Hélène BOYER-LAVERGNE, Anne-Sophie GOSSSELIN, Jean-Luc AYMERIC et Robert ZUMBHIL qui m'ont donné le goût initial de me lancer dans la science alors que lors de ma première année d'université c'était loin d'être gagné... Merci de votre investissement année après année. Merci aux deux marseillais de cette équipe pour leurs bons conseils à la découverte de cette ville et un merci tout particulier à toi Marie-Hélène pour ton investissement auprès des moniteurs et la découverte des TP de microbiologie.

Merci à toi Anne-Sophie pour la découverte des TD de virologie, grâce à vous j'ai pu voir ce qu'était l'enseignement et savoir que j'appréciais de transmettre la science autant que la découvrir. Je n'oublie pas Olivier THALER qui amène son lot de bonne humeur et de passion dans ce laboratoire.

Je tiens à remercier particulièrement les « travailleuses de l'ombre », ayant accompagné cette thèse Nadège GINIBRE et Wendy LEVRAT. Vous êtes de celles qui font tourner ce laboratoire sans répit en permettant aux personnes comme moi qui ne prévoient pas grand-chose à l'avance de s'en sortir malgré tout. Une équipe a toujours besoin de personnes avec vos compétences et ne pourrait pas fonctionner sans vous. Merci aussi à Gaëtan CLABOT et Clothilde GIBARD pour leur gestion de l'insectarium essentielle aux diverses expériences du laboratoire. Je n'oublierais pas Raphael BOUSQUET, nouveau venu dans l'équipe mais reprenant fièrement le flambeau.

Un grand merci aux stagiaires m'ayant accompagné et ayant participé activement à l'avancée de cette thèse. Je pense à Roger Jr ELOIFLIN et Boris TAILLEFER dont le stage n'a pas été de tout repos mais qui ont persévéré et m'ont permis d'avancer sur des sujets compliqués.

De manière plus générale je tiens à remercier l'équipe BIBINE et l'unité DGIMI dans laquelle j'ai pu évoluer et découvrir des personnalités variées et plus intéressantes les unes que les autres. J'ai, grâce à vous tous, découvert une science où convivialité et recherche se mêlent pour que chacun puisse donner le meilleur de lui-même afin d'apporter sa pierre à l'immense édifice de la découverte scientifique.

Je tiens aussi à remercier David CLARKE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en Irlande ainsi que Dana BLACKBURN pour son aide et ce Thanksgiving ! Je remercie par la même occasion l'équipe de ce labo irlandais qui m'ont accueilli chaleureusement à Cork.

J'entends râler d'ici Laetitia PIGEYRE sur le fait que je ne la cite pas, en tant que première camarade doctorante de ce laboratoire, je serais sûrement docteur avant toi pour le coup, ces trois années côte à côte n'auront pas été de tout repos mais resteront des souvenirs mémorables^^. J'ai bien sûr une pensée bien particulière pour vous tous, membres du terrier, Ange LORENZI pour les discussions qu'on a eu en tant que minorité de ce bureau et nos thèses avançant pas à pas, courage à toi ! Je pense forcément à mon « Bro » Djibril ABOUBAKAR-SOUNA avec qui j'ai eu la chance de partager de nombreux moments de complicité et des discussions plus qu'intéressantes ! Je pense aussi à Louise HUOT et les discussions scientifiques lors des pauses café, Marine CAMBON pour tous ces moments partagés à Montpellier et ton talent inné pour l'orientation et Sandra NIHM pour son originalité et ses discussions sur l'épigénétique. Merci à vous tous, le terrier a été un lieu de travail mais aussi de discussions alternatives si on peut dire et c'est ce qui permet la réussite de mon avis.

Merci enfin à Anne-Nathalie VOLKHOFF, responsable de cette UMR DGIMI sans qui cette unité ne serait pas ce qu'elle est. Merci particulièrement d'avoir mis en place le Terrier qui m'a tant apporté.

Que serait la science sans les amis, pas grand-chose pour ma part car mes amis en font partie intégrante. Je remercierais en premier Matthias RICHARD pour une amitié qui commence à dater et ces nombreux départs tardifs du laboratoire pour aller manger ensemble en discutant de tous nos déboires ainsi que ces soirées sciences. Un merci tout particulier à Simon GEORGE, m'ayant accompagné durant toutes mes études et ayant même fait partie du labo, ainsi que Yann WONG-MAN-KAN pour cette coloc à trois qui restera gravée, même sans tatouage !

Merci à tous les amis et collègues qui m'ont accompagné et soutenu durant cette thèse de près ou de loin ! Merci à mes poulets Mickael et Yannick, pour ces soirées poker (bientôt la perf), on se connaît depuis la crèche (où on se tapait dessus) et ça ne va pas s'arrêter là ! Merci à Colin (fais ce que tu peux), Yano (Boom Boom Boom Boom), Romane (et la grande pinte), Arnaud (et la découverte du rhum), Laetitia (Princesse Lala), Lil' (la Réunion), Aurélie (et le gout du vin), Lydia (la Mama !), Romain (c'est un mouchnard), Quentin (plus chaud que le soleil), Tristan (mon potiron en guimauve), Nico (Hanouna, mon camarade moniteur et notre meilleur coiffeur), Ju (Notre sommelier préféré), Juan (et tes snaps...), Guigui (ou Pascalou), Clément (et les retours à pieds du lab) ainsi que la team CNRS pour les sorties en ville, Toinou (notre cycliste pro), Ana-Victoria (notre venezuelienne), Sylvain (ou Beber), Thibault (la coloco à l'ancienne), Christian (mon Nuts), Soulit (et son manque d'enzymes), Suzie (notre gardoise préférée) et tous ceux que j'oublie, désolé...

Bien sûr je ne peux que remercier ma chérie, Sixtine FAURE (et Bibou^^), qui a su m'accompagner et me supporter durant cette épopée. Ça n'a pas été une période facile mais je serais là pour t'accompagner jusqu'à la fin de ta thèse ! Je ne te remercierais jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi.

Je tiens aussi à remercier toute ma famille, oncles, tantes, cousins et cousines qui m'ont permis d'avoir des moments de pause dans ce marathon. Un merci tout particulier à Daniel et Françoise sans qui toutes ces études n'auraient pas eu la même saveur ! Ces réunions familiales de l'été ont toujours été trop courtes.

Enfin pour terminer j'aimerais adresser mes plus tendres pensées à mes parents, vous m'avez toujours poussé à aller dans la voie qui me plaisait depuis mes 6 ans. Avoir des parents comme vous n'a pas de prix. Votre fierté m'a rendu plus fort que je n'aurais cru pouvoir l'être et c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui.

Abréviations

LPS – Lipopolysaccharide

MTase – Méthyltransférase

Dam – DNA Adénine Méthyltransférase

Dcm – DNA Cytosine Méthyltransférase

CcrM – Méthyltransférase Régulée durant le Cycle Cellulaire

IJ – Infective Juvenile (stade de développement du nématode retrouvé dans les sols)

ST – Stilbènes

SST – Système de Sécrétion de Type

PO – PhénolOxydase

PAM – Peptides Anti-Microbiens

SI – Système Immunitaire

UPEC – Escherichia coli UroPathogènes

STEC – Escherichia coli produisant des Shiga Toxines

WT – Wild Type (souche sauvage)

IPTG - β -D-1-thiogalactopyranoside (analogue synthétique du lactose)

m6A – Méthylation sur le carbone n°6 d'une adénine

m4C – Méthylation sur le carbone n°4 d'une cytosine

m5C – Méthylation sur le carbone n°5 d'une cytosine

RM – Restriction-Modification

ER – Enzyme de Restriction

Pb – paire de base

TRD – Target Recognition Domain (sites cibles de la reconnaissance)

SAM - S-Adénosyl-Méthionine

Kb -Kilo-base (mille paires de bases)

ATP – Adénosine TriPhosphate

ADP – Adénosine DiPhosphate

MMR – MisMatch Repair (Réparation des mésappariements)

Dam+ - Souche surexprimant la méthyltransférase Dam grâce à un plasmide

Chr_Dam – Souche surexprimant Dam par une insertion chromosomique

Chr_GFP – Contrôle de la souche Chr_Dam, ayant le gène de la GFP inséré sur le chromosome

COG – Cluster of Ortholog Groups (ensemble de gènes orthologues)

PCR – Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne de polymérisation)

qRT-PCR – PCR permettant de quantifier l'ARN

IPD – Inter Pulse Duration (temps séparant deux émissions de fluorescence)

Prologue vulgarisé :

En 1953 Watson et Crick décrivent pour la première fois la structure en double hélice de l'ADN (Watson and Crick, 1953) ce qui leur vaudra le prix Nobel en 1962. Cette découverte a ouvert de nouveaux horizons à la recherche et nombreux ont été les scientifiques pensant à l'époque que toute la biologie ne reposait que sur ce code. Les résultats ont montrés au cours des années que l'ADN contenait en effet les informations nécessaires à la vie mais que de nombreux mécanismes jouaient dans l'interprétation de ce code. L'épigénétique est l'un de ces mécanismes.

La notion d'épigénétique dans le sens où l'environnement aurait un impact sur l'expression des gènes n'est pas récente et est déjà décrite en 1942 par Conrad Waddington qui remarque qu'un choc thermique sur des mouches cause des malformations qui sont transmises aux générations filles (Waddington, 1942). Il ne pouvait à cette époque déterminer si cela relevait du domaine de la génétique (mutations) ou de l'épigénétique mais mettait en évidence la transmission d'un caractère phénotypique lié à un choc environnemental et non au code génétique initial. En 1972 le premier gène est séquencé (Jou et al., 1972) et il faudra attendre 1976 pour voir le premier génome séquencé (Fiers et al., 1976). La course au séquençage est lancée et durant une dizaine d'années on séquence pour trouver des réponses à toutes les questions qu'on se pose. Dans les années 1990 on commence à se rendre compte que connaître le code génétique d'un organisme ne répond pas à toutes les questions et que d'autres facteurs sont à prendre en compte. Les premières équipes se lancent alors sur l'épigénétique et commencent à étudier non plus le code en lui-même mais les modifications qui l'entourent (méthylations, acétylations...) et sa configuration spatiale. En 2001, le génome humain est séquencé (Venter et al., 2001) et l'explication de nombreuses maladies, telles que le cancer, n'est pas trouvée. L'épigénétique devient alors une des hypothèses très en vogue dans de nombreuses maladies et autre mécanismes non expliqués. En 2000 on trouvait 250 publications sur l'épigénétique, 15 ans plus tard on compte près de 20 000 publications sur le sujet et 45 nouvelles publications par jour (Deans and Maggert, 2015).

Bien que ce domaine soit en pleine extension, la définition du mot épigénétique varie selon les scientifiques et il est donc important de définir ce dont on parle quand on parle d'épigénétique. Durant toute cette thèse la définition que j'emploierai est la suivante : « L'épigénétique correspond à l'ensemble des modifications dans l'expression des gènes qui soient transmissibles à la descendance sans que la séquence nucléotidique ne soit altérée ». Elle comporte de nombreux mécanismes complexes comme la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones. Pour simplifier, si on prend comme image une partition de musique, l'ADN correspondrait aux notes écrites sur cette partition et l'épigénétique pourrait correspondre à l'interprétation de cette partition par les musiciens. La

partition reste la même mais la musique écoutée variera selon le musicien qui la joue⁽¹⁾. Chaque cellule d'un organisme a le même ADN mais pourtant elle ne va pas avoir le même rôle dans l'organisme. De même deux jumeaux monozygotes (vrais jumeaux) ont exactement le même patrimoine génétique mais vont avoir des différences dans leur comportement et parfois seul l'un des deux contractera une maladie auto-immune. L'épigénétique peut être l'explication à ces phénomènes. C'est aussi une voie active de recherche actuelle sur le cancer où une cellule va se mettre à proliférer provoquant une tumeur alors qu'elle est supposée avoir la même séquence d'ADN que ses consœurs (Sharna et al., 2010).

Chez les eucaryotes on a donc de nombreux domaines d'études de l'épigénétique mais qu'en est-il chez les bactéries ?

Il est connu depuis longtemps qu'en se divisant, une bactérie donne naissance à deux bactéries qui ont le même génome (la même séquence d'ADN) que la bactérie mère et ainsi de suite. A partir d'une seule cellule bactérienne on obtient donc une colonie de bactéries (~10⁹ bactéries) ayant (théoriquement) toutes le même génome. Même si cette multiplication n'est pas remise en question, l'avancée de la science a permis de mettre en évidence qu'au sein d'une colonie il n'y a pas uniquement des bactéries identiques. Cette différenciation peut être liée à de nombreux phénomènes comme des mutations mais peut aussi être due à des mécanismes épigénétiques.

Chez les bactéries, j'utiliserai la même définition de l'épigénétique : Le caractère doit être transmissible aux bactéries filles, ne pas modifier la séquence nucléotidique tout en modifiant l'expression des gènes et être réversible (Casadesús and Low, 2006). Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à la méthylation de l'ADN. Dans ce mécanisme, une protéine nommée Methyltransférase (il en existe de nombreuses différentes) va ajouter un groupement méthyle (CH₃) sur une base de l'ADN. Cette méthylation peut interférer avec la fixation d'autres protéines, jouant un rôle sur l'expression des gènes nommés des régulateurs, et donc participer à l'expression ou non d'un gène (Casadesús and Low, 2006). Ce mécanisme commence à être de plus en plus décrit chez les bactéries et est notamment connu pour jouer un rôle dans la capacité à infecter l'hôte chez des bactéries comme *Salmonella* (Heithoff et al., 1999) ou *Escherichia coli* (Blyn et al., 1990). Le but de cette thèse sera d'essayer de comprendre les rôles de la méthylation de l'ADN chez la bactérie pathogène d'insecte *Photorhabdus luminescens*. Cette bactérie est retrouvée en symbiose avec un nématode et le complexe némato-bactérien est utilisé en lutte biologique contre des insectes ravageurs, il est donc important de mieux comprendre le fonctionnement de ce complexe.

⁽¹⁾ Science&Santé n°11 - Épigénétique -Comment Se Joue La Partition Du Génome ?” calameo.com. Accessed September 14, 2018. <https://www.calameo.com/read/005154450735fdcb3e0ce>.

Bibliographie prologue vulgarisé :

- Blyn, L B, B A Braaten, and D A Low. "Regulation of Pap Pilin Phase Variation by a Mechanism Involving Differential Dam Methylation States." *The EMBO Journal* 9, no. 12 (December 1990): 4045–54.
- Deans, Carrie, and Keith A. Maggert. "What Do You Mean, 'Epigenetic'?" *Genetics* 199, no. 4 (April 2015): 887–96. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- Fiers, W., R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, et al. "Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene." *Nature* 260, no. 5551 (April 1976): 500–507. <https://doi.org/10.1038/260500a0>.
- Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan. "An Essential Role for DNA Adenine Methylation in Bacterial Virulence." *Science (New York, N.Y.)* 284, no. 5416 (May 7, 1999): 967–70.
- Jou, W. Min, G. Haegeman, M. Ysebaert, and W. Fiers. "Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the Bacteriophage MS2 Coat Protein." *Nature* 237, no. 5350 (May 1972): 82–88. <https://doi.org/10.1038/237082a0>.
- Sharma, Shikhar, Theresa K. Kelly, and Peter A. Jones. "Epigenetics in Cancer." *Carcinogenesis* 31, no. 1 (January 2010): 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
- Venter, J. Craig, Mark D. Adams, Eugene W. Myers, Peter W. Li, Richard J. Mural, Granger G. Sutton, Hamilton O. Smith, et al. "The Sequence of the Human Genome." *Science* 291, no. 5507 (February 16, 2001): 1304–51. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>.
- Waddington, C. H. "Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters." *Nature* 150, no. 3811 (November 1942): 563–65. <https://doi.org/10.1038/150563a0>.
- Watson, J. D., and F. H. C. Crick. "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171, no. 4356 (April 1953): 737–38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.

SOMMAIRE

Chapitre I] Introduction -----	1
<u>1) Le cycle <i>P. luminescens</i>/H. bacteriophora/Insecte cible</u> -----	2
<u>2) Pathogénicité et Photorhabdus</u> -----	3
2.1 Toxines insecticides-----	4
2.2 Contournement du système immunitaire de l'insecte-----	6
2.3 Pili et flagelles-----	7
<u>3) Etablissement de la symbiose némato-bactérienne</u> -----	8
<u>4) Hétérogénéité bactérienne</u> -----	10
4.1 Hétérogénéité et Photorhabdus-----	11
4.2 Hétérogénéité phénotypique de façon générale-----	13
<u>5) L'épigénétique bactérienne</u> -----	14
<u>6) Généralités sur la méthylation de l'ADN</u> -----	16
6.1 Les systèmes de restriction-modification-----	16
6.2 Les méthyltransférases orphelines -----	19
6.2.1 Implication dans les systèmes de réparation de l'ADN post-réplication-----	20
6.2.2 Réplication du chromosome et méthylation de l'ADN-----	21
<u>7) La méthylation de l'ADN et la régulation des gènes</u> -----	23
7.1 Implication des MTases dans les phénotypes globaux-----	24
7.2 L'opéron pap chez <i>E. coli</i> -----	26
7.3 Le SST de type VI chez <i>E. coli</i> -----	27
7.4 Le LPS chez <i>S. enterica</i> -----	27
<u>8) Objectifs de la thèse</u> -----	28
Chapitre II] Rôles de Dam dans le cycle de <i>P. luminescens</i> -----	30
1) <u>La virulence et la mobilité de <i>P. luminescens</i> sont impactées par la surexpression de Dam</u> -----	30
2) <u>Article 1 ; <i>Frontiers in Microbiology</i> : DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression Impairs Photorhabdus luminescens Motility and Virulence</u> ---	34
3) <u>La surexpression de la méthyltransférase Dam de <i>P. luminescens</i> cause une diminution de la virulence du complexe némato-bactérien</u> -----	35
4) <u>Article 2 ; En préparation: Photorhabdus Dam MTase is necessary for full virulence of the nemato-bacterial complex in the insects <i>G. mellonella</i> and <i>S. littoralis</i></u> -----	38

Chapitre III] Analyse du méthylome de <i>P. luminescens</i> -----	39
<u>1) Techniques permettant l'analyse de méthylomes</u> -----	39
1.1 Détection des méthylations par enzymes de restriction-----	39
1.2 L'immunoprécipitation de l'ADN méthylé-----	40
1.3 Le séquençage au bisulfite-----	40
1.4 Le SMRT-----	41
<u>2) Le méthylome complet de la bactérie pathogène d'insecte <i>P. luminescens</i> révèle l'existence d'adénines non méthylées</u> -----	44
<u>3) Article 3 ; Scientific Reports :</u>	
<u>The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines</u> -----	47
<u>4) Résultats complémentaires</u> -----	48
4.1 <i>nhaA</i> et la méthylation par <i>Dam</i> -----	48
4.2 <i>ogrK</i> et la méthylation par <i>Dam</i> -----	50
4.3 Détection des sites GATC méthylés par une approche de digestion-----	51
Chapitre IV] Discussion et perspectives -----	53
<u>1) <i>Dam</i> et le cycle de vie de <i>P. luminescens</i></u> -----	53
<u>2) Méthylomes et transcriptomes de <i>P. luminescens</i></u> -----	56
<u>3) Conclusion</u> -----	57

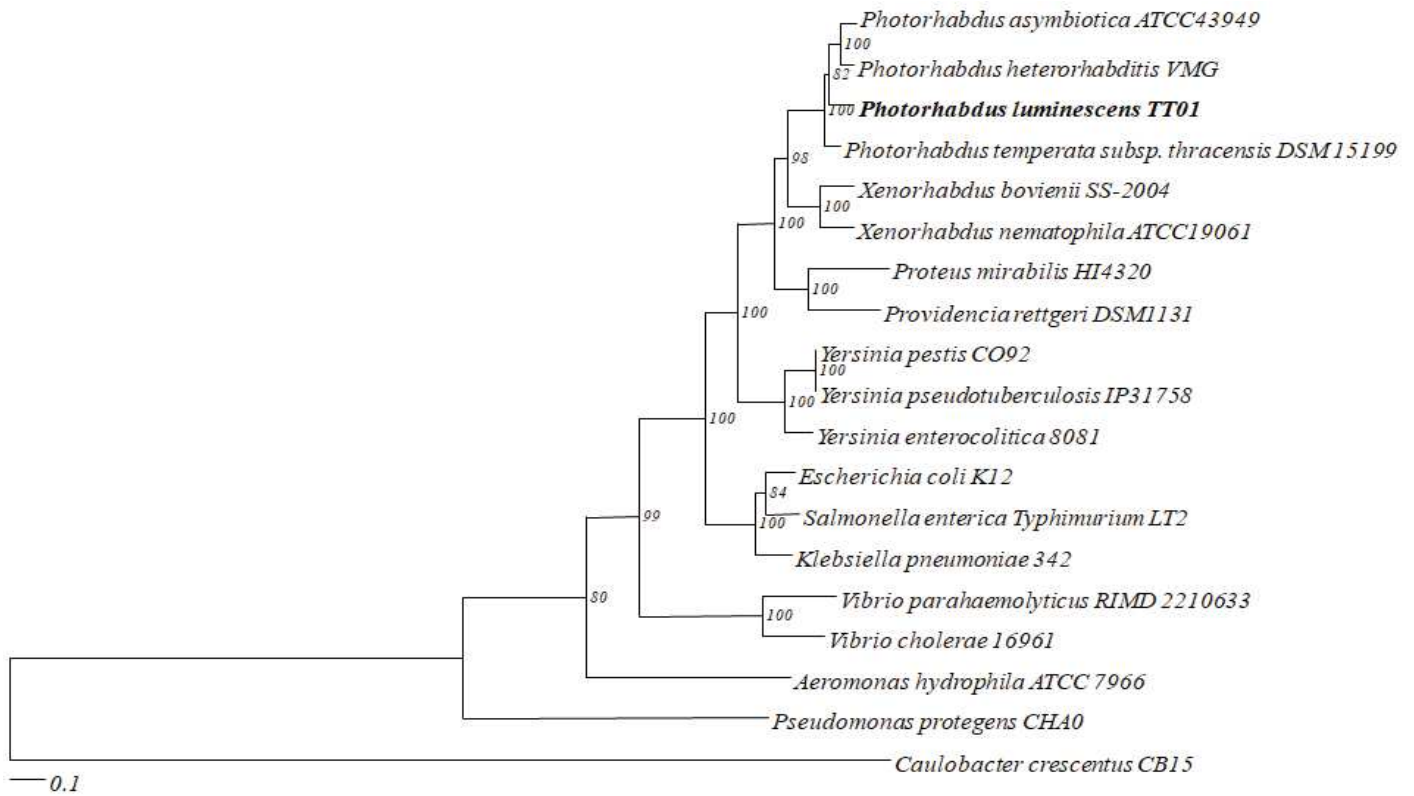


Figure 1 : Arbre phylogénétique de probabilité maximum montrant les positions des espèces de *Photorhabdus* dans un panel représentatif de *Gamma Proteobacteria*.

Cette analyse est basée sur 12 gènes codant pour des protéines du core-génome (*infB*, *nusA*, *polA*, *pyrD*, *rpoB*, *valS*, *cysS*, *metK*, *purA*, *tpiA*, *smpB* et *secY*). L'alignement des séquences (ClustalW) a été réalisé en utilisant Guidance 2 Server (Sela et al., 2015). L'arbre phylogénétique a été réalisé par Jean-Claude Ogier en suivant un modèle GTR de substitution suivant le taux d'hétérogénéité de distribution gamma et la proportion de sites invariants. La séquence de *Caulobacter crescentus* a été utilisée comme groupe extérieur. Les valeurs de bootstrap (Felsenstein, 1988) de plus de 80% (sur 100 répliqués) sont indiquées sur les nœuds.

Tableau 1 : Principaux complexes némato-bactériens utilisés et commercialisés en contrôle biologique (Lacey et al., 2015)

Efficacy and commercialization of entomopathogenic nematodes for suppression of some major insect pests.

Pest common name	Pest scientific name	Key crop(s) targeted	≥ 75% Efficacy observed ^a	Targeted commercially ^c
Artichoke plume moth	<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Artichoke	Yes (Sc)	Yes
Armyworms	Lepidoptera: Noctuidae ^b	Vegetables	Yes (Sc, Sf, Sr)	Yes
Banana moth	<i>Opogona schari</i>	Ornamentals	Yes (Hb, Sc)	Yes
Banana root borer	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Banana	Yes (Sc, Sf, Sg)	Yes
Billbug	<i>Sphenophorus</i> spp. (Coleoptera: Curculionidae)	Turf	Yes (Hb, Sc)	Yes
Black cutworm	<i>Agrotis ipsilon</i>	Turf, vegetables	Yes (Sc)	Yes
Black vine weevil	<i>Otiorynchus sulcatus</i>	Berries, ornamentals	Yes (Hb, Hd, Hm, Hmeg, Sc, Sg)	Yes
Borers	<i>Synanthedon</i> spp. and other sesiid	Fruit trees & ornamentals	Yes (Hb, Sc, Sf)	Yes
Cat flea	<i>Ctenocephalides felis</i>	Home yard, turf	No	Yes
Chinch bugs	Hemiptera: Blissidae	Turf	No	Yes
Citrus root weevil	<i>Pachnaeus</i> spp. (Coleoptera: Curculionidae)	Citrus, ornamentals	Yes (Sr, Hb)	Yes
Codling moth	<i>Cydia pomonella</i>	Pome fruit	Yes (Sc, Sf)	Yes
Corn earworm	<i>Helicoverpa zea</i>	Vegetables	Yes (Sc, Sf, Sr)	Yes
Corn rootworm	<i>Diabrotica</i> spp.	Vegetables	Yes (Hb, Sc)	Yes
Cranberry girdler	<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	Cranberries	Yes (Sc)	Yes
Crane fly	Diptera: Tipulidae	Turf	Yes (Sc)	Yes
Diamondback moth	<i>Plutella xylostella</i>	Vegetables	No	Yes
Diaprepes root weevil	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Citrus, ornamentals	Yes (Hb, Sr)	Yes
Fungus gnats	Diptera: Sciaridae	Mushrooms, greenhouse	Yes (Sf, Hb)	Yes
German cockroach	<i>Blattella germanica</i>	Household	No	Yes
Grape root borer	<i>Vitacea polistiformis</i>	Grapes	Yes (Hz)	No
Iris borer	<i>Macronoctua onusta</i>	Iris	Yes (Hb, Sc)	Yes
Large pine weevil	<i>Hyllobius albitis</i>	Forest plantings	Yes (Hd, Sc)	Yes
Leafminers	<i>Liriomyza</i> spp. (Diptera: Agromyzidae)	Vegetables, ornamentals	Yes (Sc, Sf)	Yes
Mint flea beetle	<i>Longitarsus waterhousei</i>	Mint	No	Yes
Mint root borer	<i>Fumibotys fumalis</i>	Mint	No	Yes
Mole crickets	<i>Scapteriscus</i> spp.	Turf	Yes (Sc, Sr, Scap)	Yes
Navel orangeworm	<i>Amyelois transitella</i>	Nut and fruit trees	Yes (Sc)	Yes
Oriental fruit moth	<i>Grapholita molesta</i>	Fruit trees	Yes (Sf)	No
Pecan weevil	<i>Curculio caryae</i>	Pecan	Yes (Sc)	Yes
Plum curculio	<i>Conotrachelus nenuphar</i>	Fruit trees	Yes (Sr)	Yes
Scarab grubs	Coleoptera: Scarabaeidae	Turf, ornamentals	Yes (Hb, Sc, Sg, Ss, Hz) ^b	Yes
Shore flies	<i>Scatella</i> spp.	Ornamentals	Yes (Sc, Sf)	Yes
Sod webworms	Lepidoptera: Pyralidae	Turf	No	Yes
Strawberry root weevil	<i>Otiorynchus ovatus</i>	Berries	Yes (Hm)	Yes
Sugarbeet weevil	<i>Temnorhinus mendicatus</i>	Sugar beets	Yes (Hb, Sc)	No
Sweetpotato weevil	<i>Cylas formicarius</i>	Sweet potato	Yes (Hb, Sc, Sf)	Yes
Wireworms	Coleoptera: Elateridae	Vegetables	No	Yes

^a At least one scientific paper reported ≥ 75% suppression of these pests in the field or greenhouse. Hb = *Heterorhabditis bacteriophora*, Hd = *H. downsi*, Hm = *H. marelatus*, Hmeg = *H. megidis*, Hz = *H. zealandica*, Sc = *Steinemema carpocapsae*, Sf = *S. feltiae*, Sg = *S. glaseri*, Sk = *S. kushidai*, Sr = *S. riobrave*, Sscap = *S. scapterisci*, Ss = *S. scarabaei*.

^b Efficacy against various pest species within this group varies among nematode species.

^c <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.php>.

Chapitre I] Introduction

Les bactéries du genre *Photorhabdus* sont des bacilles Gram négatifs appartenant aux Enterobactéries. Phylogénétiquement très proche des *Xenorhabdus* (*Photorhabdus luminescens* était d'ailleurs appelé *Xenorhabdus luminescens* jusqu'en 1993 (Boemare et al., 1993), elles forment avec elles un clade à part dans les entérobactéries (Fig. 1). Il existe 4 espèces dans le genre *Photorhabdus* qui sont : *P. luminescens*, *P. temperata*, *P. Heterorhabditis* et enfin *P. asymbiotica* (qui est la seule espèce de *Photorhabdus* pathogène humain opportuniste)¹. Malgré le nom d'espèce de cette dernière, elles sont toutes retrouvées en symbiose avec un nématode du genre *Heterorhabditis* et ces complexes sont pathogènes d'insectes (Poinar, 1990 ; Forst and Neilson, 1996). Chaque espèce de nématode est associée spécifiquement avec une espèce bactérienne comme *Photorhabdus luminescens* avec *Heterorhabditis bacteriophora* (modèles étudiés durant cette thèse). Les complexes némato-bactériens sont notamment utilisés en biocontrôle pour lutter contre *Opogona sachari* (la teigne du bananier, lépidoptère), *Sphenophorus* spp. (coléoptère ravageur de gazon), *Othiorhynchus sulcatus* (Othiorhynque de la vigne, coléoptère), *Synanthedon* spp. (lépidoptère), *Pachnaeus* spp. (charançon ravageur d'agrumes, coléoptère), *Diabrotica* spp. (chrysomèle des racines du maïs, coléoptère) et autres insectes ravageurs de divers genres (Tableau 1) (Lacey et al., 2015).

Au laboratoire, il est possible de réaliser une infestation en mettant en contact le complexe némato-bactérien et l'insecte cible. La mort intervient 48 à 72h après contact. L'infection peut aussi être réalisée par injection directe de cultures bactériennes dans l'hémolymphe de l'insecte, équivalent du sang chez les mammifères. La mort de l'insecte intervient alors 30 à 40h post-inoculation. L'insecte modèle le plus utilisé lors d'études de bactéries pathogènes animales ou humaines se nomme *Galleria mellonella*. C'est un lépidoptère ravageur de ruches qui est utilisé à cause de sa facilité d'élevage, de la taille des larves ainsi que des gradients de température pouvant être utilisés durant son élevage et le suivi de pathogénèse (Cook and McArthur, 2013). Le second insecte utilisé durant cette thèse est également un lépidoptère. Nommé *Spodoptera littoralis* ou ver du cotonnier, c'est un ravageur de cultures polyphage qui peut s'attaquer aux cotonniers comme à la tomate ou

¹ Une étude publiée en juin 2018 propose une nouvelle nomenclature pour le genre *Photorhabdus* en montant au rang d'espèces la plupart des sous-espèces actuelles (Machado et al., 2018). Cette nouvelle taxonomie n'étant pas encore intégrée par la communauté scientifique et n'étant pas celle que j'ai utilisé dans mes publications, je me permettrai d'utiliser l'ancienne.

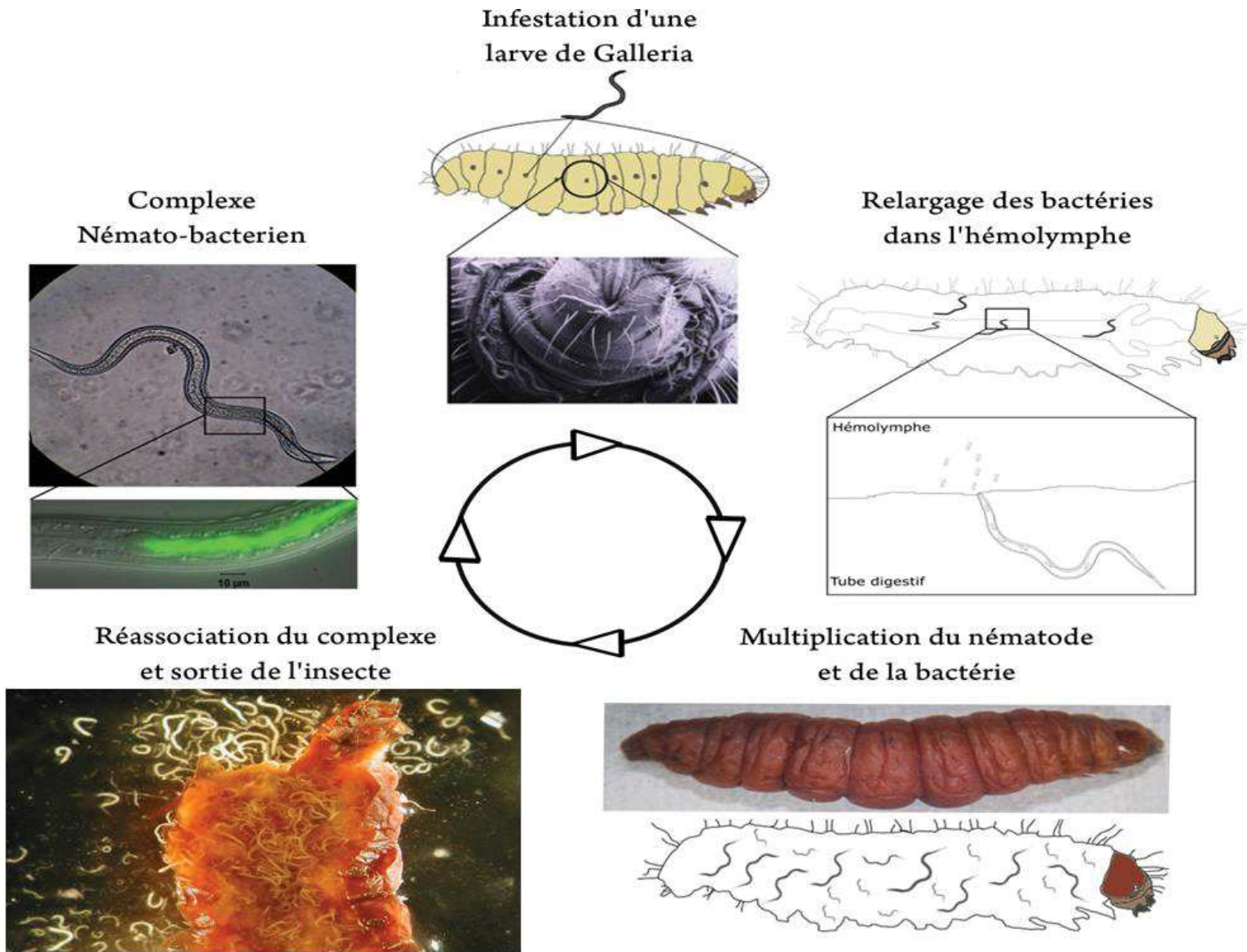


Figure 2 : Schéma du cycle du complexe nématode-bactérien *Photorhabdus luminescens/Heterorhabditis bacteriophora*

La bactérie est retrouvée en complexe avec le nématode dans son tube digestif. Ce complexe entre dans un insecte cible par les voies naturelles ou en perçant la cuticule et relargue les bactéries symbiotiques dans l'hémolymphe. Les bactéries tuent l'insecte par septicémie et secrètent de nombreux facteurs de virulence, le nématode démarre ensuite son développement en se nourrissant des bactéries. Lorsque les nutriments s'épuisent, le complexe nématode-bactérien se réassocie et sort de l'insecte à la recherche d'un nouvel hôte.

autres *Solanaceae*. Il est principalement retrouvé en Afrique et au Proche-Orient mais aussi, plus récemment, en Espagne, en Italie et en France ^{1,2}.

Les nématodes du genre *Heterorhabditis* sont fortement pathogènes pour cet insecte le désignant comme second modèle de choix pour se rapprocher des conditions d'utilisation en environnement naturel pour la lutte biologique (Glazer et al., 1991). De par son cycle de vie à trois partenaires, *Photorhabdus luminescens* doit s'adapter à son hôte et alterner entre une phase symbiotique avec le nématode et une phase pathogénique chez l'insecte (Fig. 2).

1) Le cycle *P. luminescens*/*H. bacteriophora*/Insecte cible

La relation némato-bactérienne est dite mutualiste car elle est bénéfique aux deux partenaires. *Photorhabdus* n'est pas viable seul dans l'environnement et *Heterorhabditis* a un pouvoir infectieux et un succès reproducteur nul sans sa bactérie symbiotique (Han and Ehlers, 2000). Le complexe est retrouvé dans les sols au stade « Infestant Juvénile » (IJ) et les bactéries sont situées dans le tube digestif à ce stade de développement (Boemare et al., 1993) avec environ 10³ CFU par IJ (Somvanshi et al., 2010). Durant cette phase symbiotique, *P. luminescens* est en phase M (pour mutualiste) (Ciche et al., 2008, Somvanshi et al., 2010). Le nématode peut rester dans le sol plusieurs mois sans se nourrir en puisant dans ses réserves de lipides (Grewal et al., 2011). Lors d'un contact avec un insecte, le nématode va alors avoir la capacité de pénétrer dans ce dernier. Si les voies naturelles, orale, anale ou encore les stigmates, sont des voies d'entrées chez des nématodes proches phylogénétiquement comme les *Steinernatidae* (Marcek et al., 1988), *Heterorhabditis* semble lui entrer en perçant la cuticule et plus précisément au niveau des jonctions entre les différents segments de la cuticule de l'insecte (Bedding and Molineux, 1982 ; Wang and Gaugler, 1998). Une fois dans l'hémocoèle de l'insecte, le nématode régurgite ses symbiotes qui vont alors passer de la phase M à la phase P (pour pathogène) (Somvanshi et al., 2010). Ensuite, *P. luminescens* se multiplie et tue l'insecte par septicémie 48 à 72h après infestation par le complexe (Clarke and Dowds, 1995). L'ensemble des mécanismes aboutissants à la mort de l'insecte ne sont pas encore totalement compris mais nous savons que *Photorhabdus* contourne par exemple l'immunité humorale de l'insecte en modifiant son LPS et inhibe l'immunité cellulaire et plus précisément la phagocytose grâce à la sécrétion

¹ <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19413/VigiHorti-Spodoptera-littoralis>

² <http://www.draaf.paca.agriculture.gouv.fr>

de diverses toxines (Nielsen-Leroux et al., 2012). Lors de la mort de l'insecte, la population de *Photorhabdus* se situe aux alentours de 10^9 bactéries par insecte.

De son côté, le nématode va aussi se développer après avoir relargué *Photorhabdus* dans l'hémolymphe. La première étape de son développement appelée « recovery » en anglais est de sortir de son stade de quiescence (IJ) pour passer à un stade adulte nommé J3 initiant le cycle du nématode (Ciche et al., 2008). Plusieurs facteurs sont impliqués dans le signal amenant ce changement de stades (quiescent à métaboliquement actif) comme des facteurs présents dans l'hémolymphe (Ciche and Ensign, 2003). Le principal facteur identifié est la production de stilbènes⁽¹⁾ (ST) par *Photorhabdus* qui activent ce changement.

Une fois au stade adulte hermaphrodite, *Heterorhabditis* va relarguer environ 300 œufs qui vont éclore pour donner des nématodes au stade J1 sexués. Certains de ces nématodes vont se différencier à nouveau en IJs alors que d'autres vont se développer en se nourrissant de la biomasse de *Photorhabdus* présente dans l'insecte et vont passer par 4 stades de développement juvéniles (J1-4) avant de redonner des adultes (Ciche et al., 2006). Les nématodes adultes hermaphrodites ne vont pas relarguer tous leurs œufs dans le milieu et vont en conserver certains qui se développeront à l'intérieur du nématode par un processus appelé *endotokia matricida*. Les nématodes s'étant développés à l'intérieur des nématodes adultes donneront uniquement des nématodes au stade IJ qui seront colonisés par *Photorhabdus*. Ces IJs sortiront ensuite du cadavre de l'insecte à la recherche d'une nouvelle cible. Chaque cycle prend généralement de 10 à 20 jours et plus de 100 000 IJs sortent du cadavre de l'insecte pour un nématode infestant (Joyce et al., 2006).

2) Pathogénicité et *Photorhabdus*

P. luminescens est capable d'inhiber ou d'éviter l'immunité humorale et l'immunité cellulaire de l'insecte ainsi que d'inhiber la croissance d'éventuelles bactéries compétitrices dans le cadavre de l'insecte en produisant des toxines insecticides, des enzymes extracellulaires ou encore en sécrétant des molécules antimicrobiennes.

⁽¹⁾ Les stilbènes sont des composés phénoliques habituellement produits par les plantes à l'exception de *P. luminescens* qui est la seule bactérie connue en produisant. Ces molécules sont impliquées dans la réponse immunitaire de la plante notamment face aux champignons comme le mildiou (Malacarne et al., 2011).

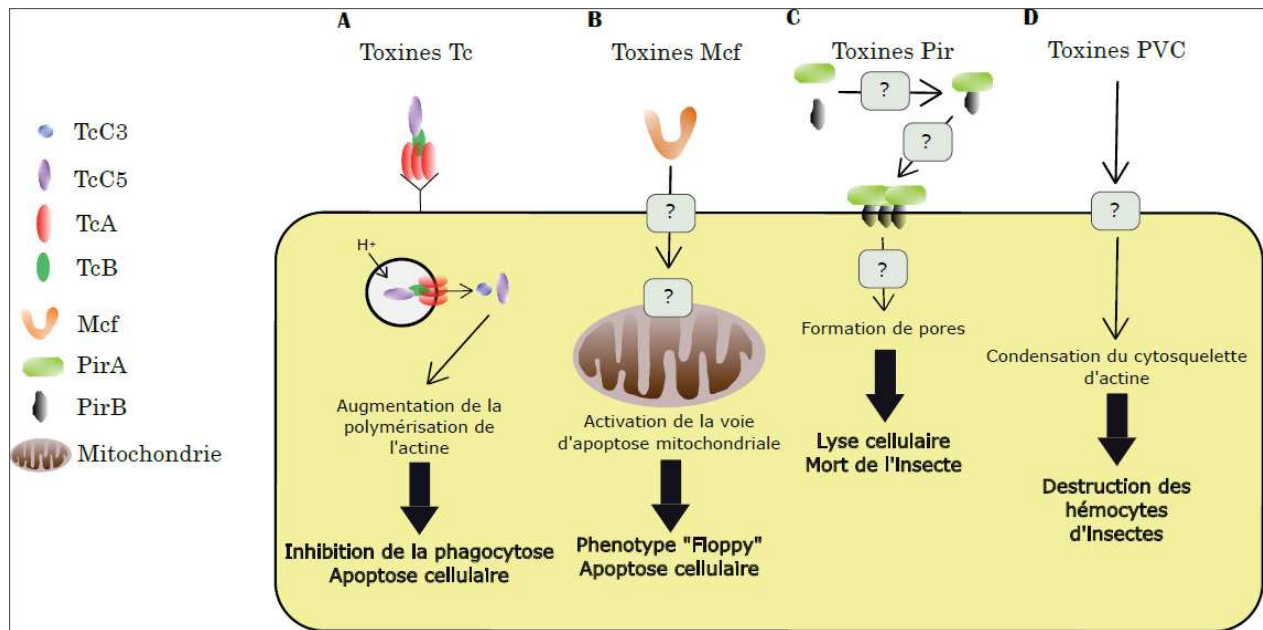


Figure 3 : Modes d'action connus pour les toxines décrites chez *Photorhabdus*.

Tableau 2 : Ensemble des loci et gènes détectés comme de potentielles toxines Tc chez *Photorhabdus luminescens* TT01 (Duchaud et al., 2003)

Locus similar to the toxin complex a (<i>tca</i>) locus from strain W14 (GenBank accession n°AF046867)			
Gene name	Region of similarity (Amino acid position)	% identity	Note
<i>plu0516</i>	2-76 77-127	89% with TcaA of strain W14 92% with TcaB of strain W14	Pseudogene, possibly resulting of a fusion/deletion of <i>tcaA</i> and <i>tcaB</i> homologs of strain W14
<i>tcaC</i>	Entire length	94% with TcaC of strain W14	
<i>tcaZ</i>	Entire length	94% with TcaZ of strain W14	

Locus similar to the toxin complex c (<i>tcc</i>) locus from strain W14 (GenBank accession n°AF047028)			
Gene name	Region of similarity (Amino acid position)	% identity	Note
<i>tccA1</i>	Entire length	93% with TccA of strain W14	
<i>tccB1</i>	Entire length	94% with TccB of strain W14	
<i>tccC1</i>	Entire length	93% with TccC of strain W14	
<i>plu4166</i> <i>plu4162</i>	Entire length	94% with TccZ of strain W14	Pseudogene

Loci weakly similar to the toxin complex loci c (<i>tcc</i>) locus from strain W14 (GenBank accession n°AF047028)			
Gene name	Region of similarity (Amino acid position)	% identity	Note
<i>tccA2</i>	Entire length	28% with TccA of strain W14	
<i>tccB2</i>	Entire length	49% with XptD1 of <i>Xenorhabdus nematophila</i>	
<i>tccA3</i>	Entire length	30% with TccA of strain W14	
<i>tccB3</i>	Entire length	37% with TccB of strain W14	

Locus similar to the toxin complex d (<i>tcd</i>) island from strain W14 (GenBank accession n°AY144119)			
Gene name	Region of similarity (Amino acid position)	% identity	Note
<i>tcdC4</i>	1-581	89% with TccC4 of strain W14	C-terminal end (682-959) is unknown
<i>tcdA5</i>	Entire length	36% with TcdA2 of strain W14	
<i>tcdA2</i>	Entire length	72% with TcdA2 of strain W14	
<i>tcdB2</i>	Entire length	91% with TcdB2 of strain W14	
<i>tcdC3</i>	1-689	90% with TccC3 of strain W14	C-terminal end (690-970) is unknown
<i>tcdA4</i>	Entire length	90% with TcdA4 of strain W14	
<i>tcdC5</i>	Entire length	89% with TccC5 of strain W14	
<i>tcdA1</i>	Entire length	87% with TcdA1 of strain W14	
<i>tcdB1</i>	Entire length	92% with TcdB1 of strain W14	
<i>tcdC2</i>	Entire length	93% with TccC2 of strain W14	

Other loci			
Gene name	Region of similarity (Amino acid position)	% identity	Note
<i>plu2333</i> <i>plu2334</i> <i>plu2335</i>	Entire length	43% with TccB of strain W14	Pseudogene
<i>tccC6</i>	1-682	75% with TccC3 of strain W14	C-terminal end (683-965) is unknown
<i>tccC7</i>	1-669	74% with TccC2 of strain W14	C-terminal end (670-936) is unknown

2.1 Toxines insecticides

De nombreuses toxines sont décrites chez *Photorhabdus*. On peut notamment citer les toxines Tc (Toxin complex), les MCF (Makes Caterpillar Floppy), les Pir (*Photorhabdus* insect related), les Pit (*Photorhabdus* insecticidal toxins) et enfin les PVC (*Photorhabdus* Virulence Cassettes) (Fig. 3) (Rodou et al., 2010 ; Nielsen-LeRoux et al., 2012).

Les toxines Tc sont retrouvées chez d'autres *Enterobacteriaceae* proches phylogénétiquement comme *Yersinia* ou *Xenorhabdus* (Fig. 1). Elles sont composées de 3 sous-unités A, B et C nécessaires à l'activité du complexe. La sous-unité A permet la reconnaissance de la membrane et la translocation de la toxine, la sous-unité B permet de lier la sous-unité A avec la sous-unité C qui correspond à la partie active de la toxine. Cette sous-unité C est une ADP-ribosyltransférase ciblant l'actine et causant une diminution de la phagocytose ainsi qu'une apoptose des cellules cibles (Sheets and Aktories, 2017). Chez *P. luminescens* TT01, 27 gènes localisés dans 5 différents loci, sont identifiés comme codant des protéines très similaires à ces diverses sous-unités (Duchaud et al., 2003)(Tableau 2). Si certains de ces gènes ont été précisément caractérisés (Lang et al., 2016), d'autres n'ont pas encore été étudiés mais une telle diversité de sous-unités pourrait permettre une variabilité des toxines en fonction de quelles sous-unités se lient ensemble (Waterfield et al., 2005). En effet, une étude a créé une protéine chimère formée d'une sous-unité A provenant de *Xenorhabdus* (XptA2) et de sous-unités B et C (TccB2 et TccC3 respectivement) provenant de *Photorhabdus*. Cette protéine a conservé la spécificité pour l'insecte cible de la sous-unité A mais son mécanisme moléculaire était celui déterminé par les sous-unités B et C (Sheets et al., 2011). Ces toxines chimères peuvent être d'un grand intérêt en lutte biologique en permettant d'élargir le nombre de cibles sensibles à ces toxines Tc. Par exemple, si un insecte est résistant à une sous-unité C provenant de *Xenorhabdus*, la création d'une toxine chimère comme celle décrite ci-dessus permettra de rétablir un phénotype sensible (Sheets et al., 2011).

Les toxines MCF sont au nombre de deux, Mcf1 et Mcf2. Ces deux toxines vont causer l'apoptose cellulaire. La toxine Mcf1 contient un domaine BH3-like qui est essentiel à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Dowling et al., 2004 ; Dowling et al., 2007). La toxine Mcf2 est moins décrite mais elle est elle aussi capable de causer l'apoptose

de cellules et le phénotype « floppy » (flasque). L'expression hétérologue de Mcf1 ou Mcf2 chez *E. coli* permet à la bactérie de devenir pathogène pour l'insecte *Manduca sexta* (Daborn et al., 2002 ; Waterfield et al., 2003).

Il existe aussi deux toxines Pir A et B dont les gènes sont situés à des loci différents sur le génome. Ces protéines ont des similarités en acides aminés avec la toxine Cry2A de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Duchaud et al., 2003 ; Constant et al., 2007) et sont retrouvées chez d'autres bactéries proches comme *Vibrio parahaemolyticus* (Lin et al., 2017). Le mode d'action de ces toxines n'est toujours pas décrit mais elles causent la mort des chenilles *Galleria mellonella* après injection dans la larve (Waterfield et al., 2005). Une étude récente montre une expression différente de ces toxines en fonction de l'insecte infecté ainsi que du mode d'entrée du complexe némato-bactérien (Castagnola et al., 2016).

Une autre toxine nommée Pit a une activité insecticide chez les insectes *Galleria* et *Spodoptera*. Elle a été étudiée en 2007 car la séquence en acides aminés du gène plu1537 avait une forte similarité avec une toxine de *Bacillus thuringiensis*. Elle cause la mort de l'insecte après injection mais non par ingestion (Li et al., 2007).

Enfin, les PVC sont des gènes retrouvés dans des loci phagiques codant des toxines potentielles. Les toxines Cif en font partie, elles sont décrites chez plusieurs espèces bactériennes comme impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire chez l'hôte (Jubelin et al., 2009). Chez *Photorhabdus*, leur caractérisation a permis de mettre en évidence la même activité ainsi qu'une activation de l'apoptose des cellules de l'hôte mais ne semble pas nécessiter le système de sécrétion de type III (SSTIII)⁽¹⁾ codé par des gènes localisés en amont sur le chromosome (Chavez et al., 2010). Certaines autres toxines PVC ont de fortes similarités de séquences avec les toxines MCF de *P. luminescens* (Daborn et al., 2002) ou d'autres toxines décrites chez d'autres espèces bactériennes comme la toxine YopT d'*Y. pseudotuberculosis* (Zumbihl et al., 1999) appelée LopT (Brugirard-Ricaud et al., 2005). Chaque cassette code pour 15 à 20 protéines et elles sont répétées dans le génome. L'activité de ces toxines est peu décrite mais elles semblent impliquées dans la destruction des hémocytes d'insectes (Yang et al., 2006).

⁽¹⁾ Les systèmes de sécrétion de type III ont une fonction d'exportation de protéines effectrices cytoplasmiques. Ces « injectisomes » sont très conservés chez les bactéries à Gram négatifs mais peuvent avoir des fonctions dans la symbiose ou dans la pathogénicité des bactéries. Ils sont notamment impliqués dans la création du flagelle de par leur capacité à exporter les protéines de structure à l'extérieur de la cellule pour former le flagelle (Diepold and Armitage, 2015 ; Notti and Stebbins, 2016).

La production de toutes ces toxines fait de *Photorhabdus* un pathogène d'insecte efficace mais l'ensemble des cibles de ces toxines et leur fonctionnement restent peu connus et la redondance de certains de ces gènes ne rendent pas leur étude facile. En plus de cette production de toxines, *Photorhabdus* peut aussi inhiber certaines composantes du système immunitaire de l'insecte afin de se protéger de ce dernier.

2.2 Contournement du système immunitaire de l'insecte

Une des composantes majeures de ce système immunitaire est la phénol-oxydase (PO). Retrouvée dans une pro-forme inactive dans l'hémolymphe de l'insecte, le liquide circulatoire des arthropodes, elle va causer *in fine* la mélanisation des corps étrangers (Cerenius et al., 2008). Afin de contourner ce système de défense, *Photorhabdus* dispose de gènes codant pour une molécule appelée rhabduscine. Cette molécule est capable (chez *Xenorhabdus*) d'inhiber l'activité de la PO (Crawford et al., 2012) et une étude démontre même une activité de cette rhabduscine sur l'immunité des mammifères (Mulley et al., 2015). *Photorhabdus* est aussi capable de produire le 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene (ST) qui a été décrit comme ayant une activité inhibitrice sur la PO de l'insecte ainsi qu'une activité antibiotique (Eleftherianos et al., 2007).

Les peptides antimicrobiens cationiques (PAMc) sont aussi une part importante du SI humoral de l'insecte. Ils vont cibler la membrane des bactéries grâce à la polarité anionique de cette dernière et y former des pores. Pour contrer ces PAMc, *Photorhabdus* peut modifier son lipopolysaccharide (LPS)⁽¹⁾. L'opéron *pbgPE* de *Photorhabdus* est impliqué dans l'ajout d'un groupement aminoarabinose sur le lipide A du LPS (Derzelle et al., 2004) ce qui amène une réduction de la charge négative globale du LPS et ainsi une résistance aux PAMc de l'insecte (Bennett and Clarke, 2005).

Le SI de l'insecte comporte aussi des cellules capables de phagocyter les agents étrangers. Cette phagocytose peut être inhibée par certaines des toxines précédemment décrites mais est spécialement ciblée par le système de sécrétion de type III et son effecteur, la protéine LopT. Cette protéine est une cytotoxine modifiant une GTPases empêchant ainsi la phagocytose de la bactérie (Brugirard-Ricaud et al., 2005). Une autre toxine nommée PhIA joue potentiellement un rôle dans la lyse des hémocytes de l'insecte. En effet, il existe chez *Photorhabdus* un opéron identifié comme codant des toxines hémolytiques. PhIB servirait de

⁽¹⁾ Le LPS est une molécule retrouvée chez la plupart des bactéries à Gram négatif. Il est composé d'une partie nommée lipide A ancrée dans la membrane, une partie centrale ou « core » suivi d'une chaîne latérale O qui correspond à l'antigène. Le LPS est connu pour se lier aux récepteurs (notamment TLR4 chez l'homme) des cellules et provoquer la réponse inflammatoire (Whitefield and Trent, 2014 pour revue).

système de sécrétion et d'activation de PhIA comme décrit pour les toxines ShIB/A de *Serratia marcescens* (Brillard et al., 2002).

En dehors de la production de toxines et de l'inhibition du SI de l'insecte certains phénotypes plus généraux sont associés à la virulence de *Photorhabdus*. De manière générale la formation de biofilms, et plus spécifiquement l'expression de pili, ainsi que la mobilité sont des phénotypes associés à la virulence chez de nombreuses bactéries.

2.3 Pili et flagelles

Les pili sont considérés depuis longtemps comme des facteurs de virulence de par leur capacité à permettre une adhésion de la bactérie à un type cellulaire donné (Jonson et al., 2004). Il est par exemple connu chez *E. coli* que l'expression du pili Pap est le principal facteur de virulence des *E. coli* uropathogènes (UPEC) (Båga et al., 1987). Chez *P. luminescens* 11 clusters codant pour des pili potentiels sont présents (Duchaud et al., 2003). Le pilus Mad de *P. luminescens* est sans aucun doute le plus étudié et il a été démontré, comme détaillé plus bas, qu'il joue un rôle durant l'établissement de la symbiose avec le nématode mais n'est pas exprimé durant l'infection de l'insecte (Somvanshi et al., 2010).

Il existe chez *Photorhabdus* un opéron codant pour un pilus proche du pilus Pap, décrit ci-dessus, nommé Mrf. L'expression de ce pilus, bien que son rôle n'ait pas encore été découvert, est inhibé chez l'insecte au début de l'infection ($t < 20h$). A l'inverse à partir de 25h post-infection les ARNm du gène *mrfA* (codant pour la protéine effectrice du pilus) sont fortement détectés indiquant une régulation de ce gène durant les phases infectieuses de *Photorhabdus temperata* (Meslet-Cladière et al., 2004). Il semble donc potentiellement jouer un rôle dans la pathogénicité de cette bactérie ainsi que chez *P. luminescens* où il est également présent. On retrouve aussi chez *P. luminescens*, un pilus proche des pili Pil retrouvé chez les *E. coli* produisant des Shiga-toxines (STEC). Ces pili sont fortement reliés à la capacité d'induire la maladie chez ces espèces (Srimanote et al., 2002). La présence de gènes *pil* homologues à ceux d'*E. coli* chez *Photorhabdus* amène à l'hypothèse de leur implication dans la pathogénicité de *Photorhabdus*. Une remarque importante est que pour les deux types de pili décrits précédemment (Mrf et Pil) il existe des groupes de gènes codant pour un second pili du même type nommé respectivement Mrf-like et Pil-like (Duchaud et al., 2003).

Cette duplication est un autre indice de leur importance majeure dans le cycle de vie de *Photorhabdus*.

Un dernier cluster décrit est celui codant un potentiel pilus nommé Phf. Ce dernier est juxtaposé au gène *ngrA* qui code pour une entérobactine aidant à la croissance du nématode (Ciche et al., 2001). Ce pilus jouerait un rôle dans la symbiose nématobactérienne (Waterfield et al., 2002).

Chez de nombreuses bactéries pathogènes la mobilité et plus particulièrement les flagelles, sont associés à la virulence (Ottemann and Miller, 1997 ; Givaudan and Lanois, 2000 ; Josenhans and Suerbaum, 2002 pour détails). Chez *Xenorhabdus*, la mobilité flagelle-dépendante est sous le contrôle des régulateurs FlhDC, FliA et FliZ et est liée à la pathogénicité de la bactérie de manière indirecte (Jubelin et al., 2013 ; Givaudan and Lanois, 2017). Chez *Photorhabdus* peu d'études ont été menées sur cette thématique mais il a été démontré qu'un mutant *flgG*, bloqué dans la synthèse flagellaire, ou un mutant *motAB*, bloqué dans la rotation du flagelle, bien que toujours pathogènes n'étaient plus compétitifs face au WT dans l'insecte ce qui démontre un rôle important de la mobilité dans le fitness de la bactérie durant sa phase pathogène (Easom and Clarke, 2008). Un mutant *astR* est affecté dans de nombreux phénotypes et voit notamment sa mobilité augmenter en comparaison de la bactérie WT mais la pathogénicité n'est pas touchée chez ce mutant (Derzelle et al., 2004). La mobilité chez *Photorhabdus* semble avoir un lien indirect mais non négligeable avec la pathogénicité et il ne semble pas y avoir de lien particulier entre la mobilité et l'association avec le nématode (Easom and Clarke, 2008).

3) Etablissement de la symbiose nématobactérienne

Lors de la phase de croissance du nématode *Heterorhabditis*, les stades adultes hermaphrodites se nourrissent spécifiquement de l'espèce bactérienne avec laquelle ils sont capables de symbiose, *Photorhabdus* (Clarke, 2008). Cette nutrition est une étape importante dans l'établissement de la symbiose puisqu'elle correspond à la phase où la colonisation des nématodes se réalise. Un point important pour permettre un établissement de la symbiose entre la bactérie et le nématode est la diminution de l'expression de facteurs de virulence conjointement à l'activation des voies du métabolisme secondaire. En effet, lors de l'activation de la croissance du nématode, la bactérie est en phase de croissance post-

exponentielle ou stationnaire ce qui signifie que la bactérie ne se multiplie quasiment plus et a une activité métabolique très différente de celle trouvée durant la phase de croissance exponentielle (Johnigk et al., 2004). Les stilbènes (ST) et plus précisément le 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene sont les seules molécules clairement décrites comme ayant un rôle important dans le phénomène de récupération du nématode (passage du stade IJ au stade adulte) (Joyce et al., 2008). Une accumulation de cette molécule a été décrite *in vitro* et *in vivo* en phase stationnaire (Hu and Webster, 2000). Plus précisément, lorsque les nutriments commencent à manquer dans le cadavre de l'insecte on observe une accumulation de l'alarmone (p)ppGpp dans le milieu qui est synthétisée par *Photorhabdus*. L'accumulation de cette alarmone active alors la synthèse des ST (Bager et al., 2016). Des études ont démontré qu'un mutant ne produisant pas cette molécule va causer une baisse drastique de 50 à 5% du passage au stade adulte hermaphrodite chez le nématode associé et l'ajout de cette molécule va rétablir un développement normal (Joyce et al., 2008).

Une fois cette phase de récupération terminée, les nématodes adultes se nourrissent donc des bactéries. Certaines molécules ont été identifiées comme importantes dans la nutrition du nématode comme les protéines Cips (Crystalline Inclusion Protein) qui jouent aussi un rôle potentiel dans la spécificité de cette interaction sans que l'on connaisse le mécanisme sous-jacent (Bintrim and Ensign, 1998; Bowen and Ensign, 2001). Une autre molécule décrite dans le support de la nutrition du nématode est la protéine codée par le gène *mdh* qui est une malate deshydrogénase. Elle est impliquée dans le cycle de Krebs et un mutant Δmdh ne produit plus le pigment anthraquinone, n'est plus bioluminescent et ne produit plus de stilbènes. Ce mutant est de plus incapable de servir de ressources nutritives pour le nématode (Lango and Clarke, 2010). Lors de cette nutrition certaines bactéries arrivent intactes jusqu'au conduit intestinal du nématode où elles adhèrent aux deux cellules les plus postérieures de l'intestin du nématode, nommées INT9R et INT9L, grâce à un pilus nommé Mad (Somvanshi et al., 2010). Les bactéries exprimant ce pilus sont nommées M pour « Mutualistes » et sont uniquement retrouvées en symbiose avec le nématode. A l'inverse, les bactéries retrouvées durant la phase de croissance dans le cadavre de l'insecte sont nommées P pour « Pathogènes » et n'expriment pas ce pilus (Somvanshi et al., 2012 ; Somvanshi et al., 2010 ; Ciche et al., 2008). Une fois les cellules en phase M attachées aux cellules INT9 de l'intestin des adultes hermaphrodites,

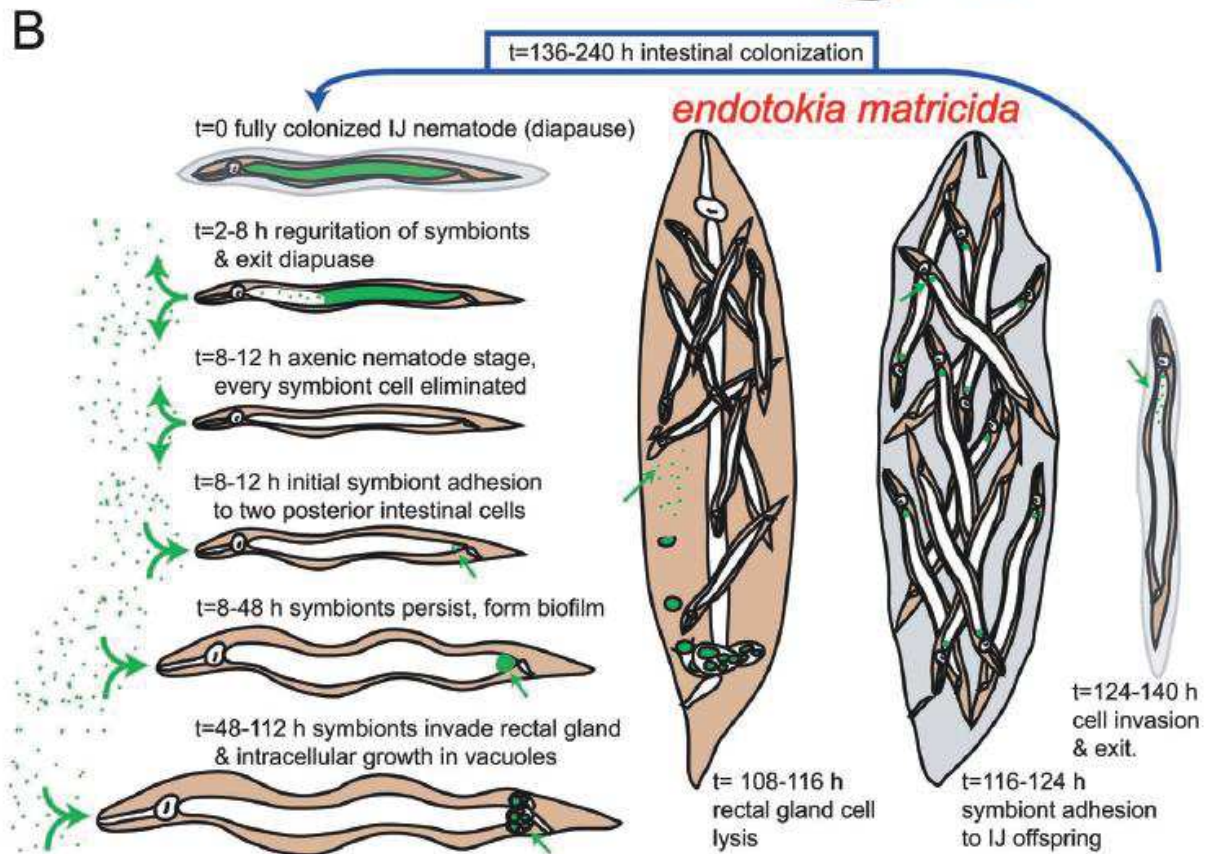
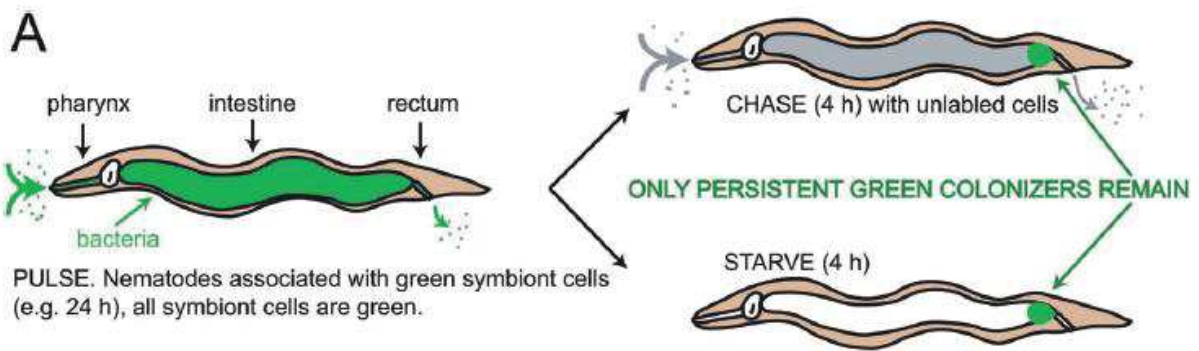


Figure 4 : Transmission des symbiotes par *Heterorhabditis* (Somvanshi et al., 2010)

- A- Détection de la présence et localisation des symbiotes grâce à la GFP.
- B- Transmission du symbiote au cours du cycle du nématode dans l'insecte. Les mécanismes sous-jacents à cette transmission ne sont pas encore clairement décrits.

elles colonisent les cellules des glandes rectales où elles vont se multiplier dans des vacuoles. Lors du processus d'*endotokia matricida*⁽¹⁾, les nématodes au stade IJ n'ayant pas été relargués vont se nourrir des tissus maternels et vont amener la rupture des cellules des glandes rectales. *Photorhabdus* se retrouve alors en contact avec les IJs et chaque nématode se verra colonisé par une bactérie (Clarke, 2008 ; Ciche et al., 2008). La colonisation débute au niveau des cellules de la valve pré-intestinale de l'IJ puis la bactérie va se multiplier dans le lumen intestinal jusqu'à une population finale d'environ 1000 bactéries par IJ (Somvanshi et al., 2010) (Fig. 4). Ces IJs pourront alors sortir du cadavre pour infecter de nouveaux insectes. L'interaction nécessaire à l'établissement de la symbiose entre nématode et bactérie fait donc intervenir le métabolisme secondaire de la bactérie (Clarke, 2014 ; Clarke, 2017 pour détail) ainsi que l'expression du pilus Mad (Somvanshi et al., 2012). L'expression de ce pilus semble être stochastique et est donc source d'hétérogénéité pour la population bactérienne. Chez de nombreuses bactéries, l'hétérogénéité phénotypique est un mécanisme permettant l'adaptation à un nouvel environnement et peut donc être l'explication à un changement de mode de vie comme le passage d'un état pathogène à symbiotique.

4) Hétérogénéité bactérienne

Je définis ici l'hétérogénéité bactérienne comme étant toute différence au sein d'une même population bactérienne amenant à la présence d'au minimum deux populations ayant au moins un caractère phénotypique différent. Cette hétérogénéité phénotypique peut donc être causée par une mutation, un réarrangement génétique, l'épigénétique, une modification post-traductionnelle etc... Dans un modèle comme le nôtre, l'intérêt de cette hétérogénéité phénotypique est sa réversibilité, lui permettant de s'adapter en fonction de l'étape du cycle où la bactérie se trouve. Je ne parlerai donc pas durant cette thèse des phénomènes de mutation qui sont obligatoirement transmis à la génération fille. Je présenterai aussi uniquement des exemples concernant des bactéries à Gram négatif afin de garder un lien avec *Photorhabdus* même si l'hétérogénéité phénotypique n'est pas restreinte aux Gram négatif mais présente dans toute forme de vie.

⁽¹⁾ L'*endotokia matricida* est un processus par lequel les nématodes vont se développer à l'intérieur du corps de la mère amenant in fine à sa mort et au relargage de la descendance dans le milieu.

Phenotype	TT01α	VAR*
Colony morphology	Convex, mucoid	Flat, nonmucoid
Pigmentation	+ (orange)	–
Coloration on TreGNO medium ^b	Green	Yellow
Bioluminescence	+	–
Crystal	+	–
Antibiotic production ^c	+	–
Sheep blood hemolysis ^d	T	–
Lipase activity on:		
Tween 20-60 ^e	++	+
Tween 80-85	++	+ ^v
Protease activity	++	w
Motility	+	+
Hemagglutination titer ^f		
Rabbit hemagglutination titer	<1	<1
Sheep hemagglutination titer	<1	8

^a Unless noted otherwise, the results are scored as follows: +, positive; –, negative; v, variable; and w, weak.

^b On TreGNO medium, phenotypic variant colonies undergoing trehalose fermentation acidify the medium, turning the bromothymol blue yellow, whereas wild-type colonies do not undergo trehalose fermentation and remain green (31).

^c +, Zone of growth inhibition for *Micrococcus luteus* (laboratory collection); –, no growth inhibition.

^d T, total hemolysis; –, no hemolysis.

^e Halo of precipitation (diameter): ++, >20 mm; +, >10 mm.

^f Agglutination assays were assessed on *Photorhabdus* bacterial suspensions (10⁸ cells/ml) prepared from exponential growth or stationary-phase cultures in LB broth.

Tableau 3 : Liste des caractères phénotypiques permettant de différencier les variants phénotypiques I et II de *Photorhabdus* (Lanois et al., 2011).

L'étude de l'hétérogénéité au sein d'une population bactérienne que l'on considérait comme clonale remonte en 1945 où Delbrück remarque qu'au sein d'une population de cellules d'*Escherichia coli* génétiquement identiques, il y a des différences de production du bactériophage T1 pour chaque cellule bactérienne (Delbrück, 1945). Depuis, de nombreuses études se sont penchées sur ce phénomène en utilisant diverses approches comme les gènes rapporteurs fluorescents.

Chez *Photorhabdus*, l'hétérogénéité phénotypique est décrite depuis les années 1980 (Akhurst, 1980). Plusieurs caractères phénotypiques sont sujets à l'hétérogénéité chez *Photorhabdus* mais les mécanismes sous-jacents restent pour la plupart à découvrir.

4.1 Hétérogénéité et *Photorhabdus*

Photorhabdus est connu pour former des variants phénotypiques lors d'une culture prolongée (phase stationnaire avancée) (Akhurst, 1980). Ces variants nommés variants phénotypiques II (VP II) diffèrent pour de nombreux phénotypes du variant phénotypique I correspondant au phénotype WT retrouvé en symbiose avec le nématode (Boemare and Akhurst, 1988 ; Boemare et al., 1997). Les VP II sont incapables de s'associer avec le nématode ce qui pose de gros problèmes lors de leur apparition dans les fermenteurs où sont préparés les complexes nématobactériens commercialisés en lutte biologique (Akhurst, 1980 ; Gerritsen and Smits, 1997). Ce résultat semble surtout lié au fait que le nématode est incapable d'utiliser des VP II comme source de nourriture et ne peut donc pas réaliser son cycle (Clarke, 2014). Les VP II perdent ou sont atténués pour certains autres phénotypes présents chez le WT comme la bioluminescence, les corps d'inclusions cytoplasmiques ou la production d'antibiotiques et de stilbènes, entre autres (Tableau 3) (Smigielski et al., 1994 ; Han and Elhers, 2001 ; Lanois et al., 2011 ; Clarke, 2014). Malgré ces changements les variants I et II sont aussi virulents pour l'insecte (Forst and Clarke, 2002). Du fait de l'intérêt économique et scientifique en jeu, de nombreuses études visent à comprendre ce changement phénotypique mais le mécanisme sous-jacent mis en jeu reste à découvrir. Il a néanmoins été décrit qu'aucun réarrangement génomique majeur n'est en cause (Lanois et al., 2010) et que plusieurs facteurs de régulation semblent impliqués dans cette variation phénotypique (Joyce and Clarke, 2003 ; Derzelle et al., 2004 ; Turlin et al., 2006). Les derniers travaux publiés mettent en avant un régulateur de type LysR nommé HexA qui joue un rôle

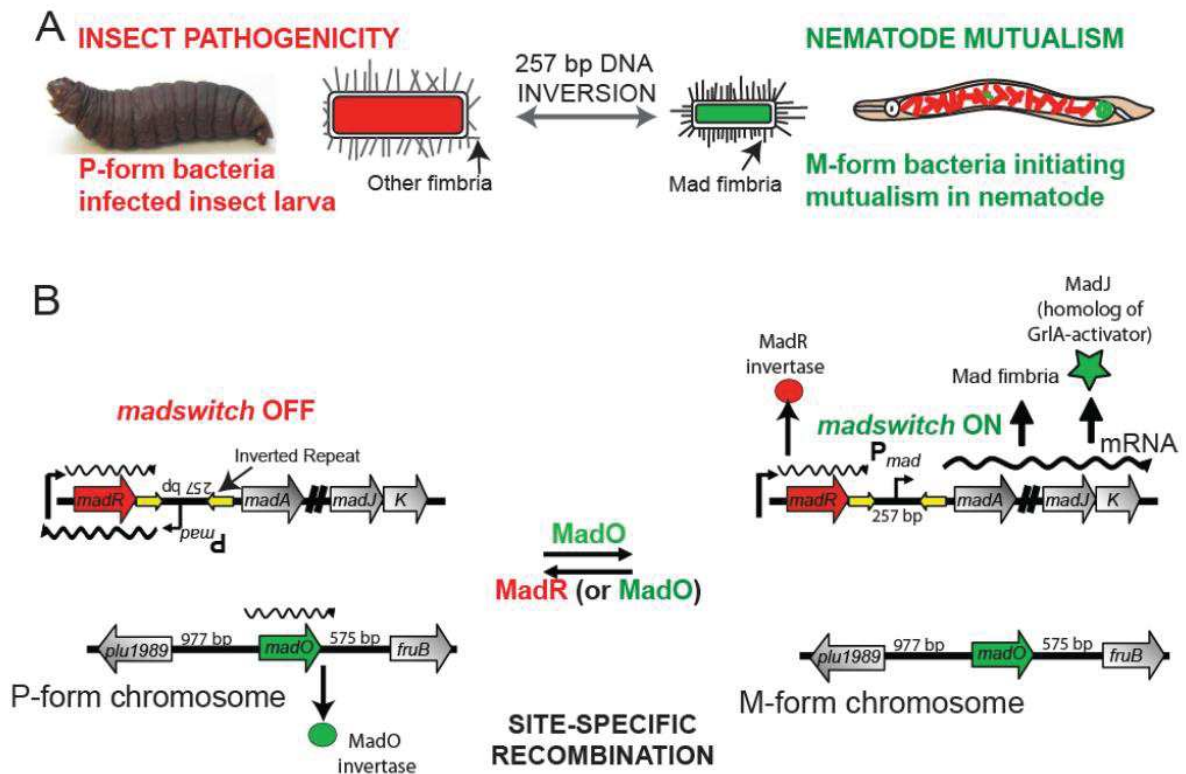


Figure 5 : Mécanisme de switch pour le pilus Mad (Somvanshi et al., 2012)

A - La forme P de *Photobacterium* croit de façon exponentielle et produit divers facteurs de virulence comme des toxines insecticides conférant à la bactérie son pouvoir pathogène. Les cellules sont de grande taille, produisent des antibiotiques ainsi qu'un pigment anthraquinone qui donne au cadavre de l'insecte cette couleur rouge brique caractéristique. Les cellules M adhèrent à la partie postérieure de l'intestin du nématode, initiant ainsi le mutualisme, et sont de plus petite taille. Elles diffèrent des formes P sur l'expression de nombreux gènes de virulence et de caractères phénotypiques.

B - Mécanisme régulant le switch de la forme P à la forme M et inversement. A gauche le promoteur P_{mad} est orienté OFF et les gènes *mad* ne sont pas exprimés. L'expression de l'invertase MadO est requise pour l'inversion du promoteur P_{mad} en orientation ON. A droite, le promoteur P_{mad} est en orientation ON et les gènes *mad* sont exprimés amenant la production du pilus Mad. La production de l'invertase MadR est nécessaire à un switch ON vers OFF efficace.

important de façon directe ou indirecte dans la plupart des phénotypes perdus chez le variant de type II (Langer et al., 2017 ; Tobias, Heinrich et al., 2016).

Photorhabdus est une bactérie décrite dans d'autres phénomènes d'hétérogénéité. Le plus documenté est sans aucun doute le phénomène de switch du pilus Mad cité précédemment. Les gènes codant pour ce pilus sont les gènes *mad* et sont situés en opéron (Duchaud et al., 2003). Lorsque le pilus est exprimé les cellules sont en phase M (Mutualiste) et à l'inverse lorsqu'il n'est plus exprimé elles sont en phase P (Pathogène) et n'adhèrent plus au nématode (Somvanshi et al., 2010). Les P-formes expriment de nombreux facteurs de virulence dont ceux décrits précédemment et sont les cellules retrouvées dans le cadavre de l'insecte. L'expression de ces gènes est sous contrôle du promoteur P_{mad}. Ce promoteur est flanqué de deux séquences répétées cibles de l'invertase MadO et potentiellement de l'invertase MadR (qui joue uniquement un rôle potentiel dans le switch « ON vers OFF »). Lorsque la partie promotrice est dans le sens ON (permettant la transcription des gènes *mad*) le pilus Mad est exprimé. A l'inverse lorsque l'invertase retourne le promoteur P_{mad}, le pilus n'est plus exprimé (Fig. 5) (Somvanshi et al., 2012).

L'opéron *mrf* de *Photorhabdus temperata* est un autre exemple de pili mettant en jeu un mécanisme similaire. Cet opéron code pour un pilus proche des pili de type Pap chez *E. coli* et fortement similaire au pilus Mrp de *Proteus mirabilis* (Soto and Hultgren, 1999 ; Meslet-Cladiere et al., 2004). Le pilus Mrf, comme le pilus Mrp, est régulé par une inversion de promoteur due à la recombinase Mri (Meslet-Cladiere et al., 2004). Il a aussi été démontré que cet opéron *mrf* avait la même configuration chez *Photorhabdus luminescens* que celle trouvée chez *P. temperata*, on peut donc supposer un même mécanisme permettant la régulation de cet opéron (Clarke, 2014, Unpublished Data).

Un dernier type d'hétérogénéité décrit plus récemment chez *Photorhabdus* est lié à la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (AMPc). Chez *Salmonella*, la résistance aux peptides antimicrobiens a été très documentée et implique notamment le système à deux composantes PhoPQ et les gènes de l'opéron *arn* (Band and Weiss, 2015 ; Raetz et al., 2007 ; Dalebroux and Miller, 2014). Chez *Photorhabdus*, on retrouve le système à deux composantes PhoPQ et il a été démontré comme essentiel à la résistance aux AMPc (Derzelle et al., 2004).

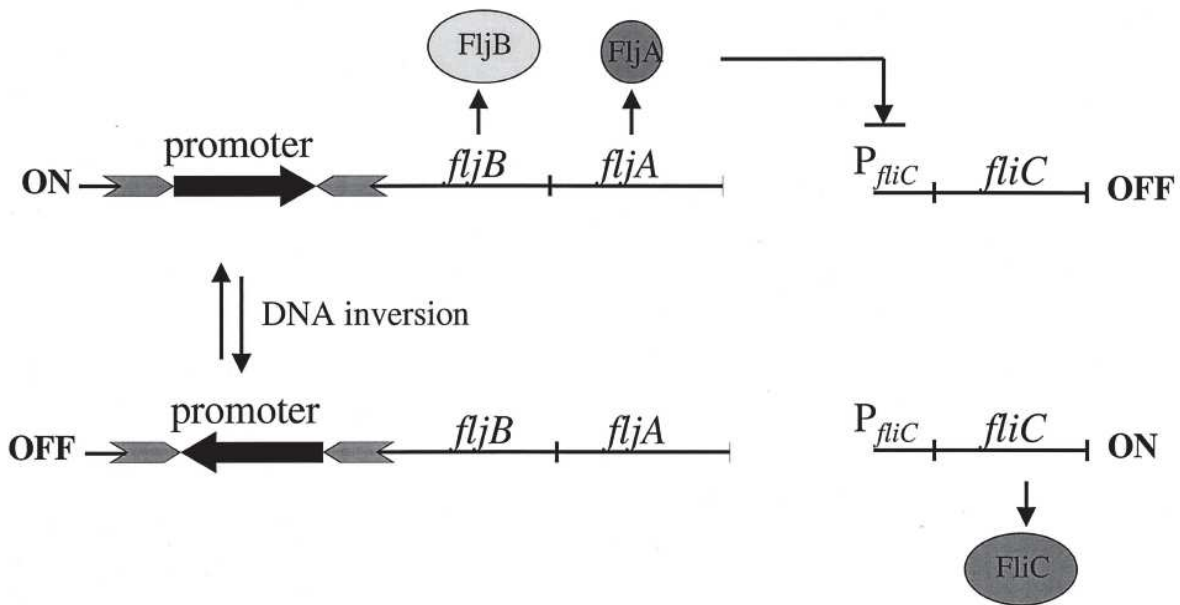


Figure 6 : Régulation flagellaire par inversion de promoteur chez *S. enterica* (Bonifield and Hughes, 2003)

Le promoteur de l'opéron *fljBA* est flanqué de deux séquences d'ADN cibles de la recombinase Hin. Dans une orientation FljB et FljA sont exprimées et la transcription du gène *fliC* est bloquée par FljA. Dans l'orientation inverse, l'expression de l'opéron *fljBA* est bloquée, *fliC* est donc transcrit et le flagelle est synthétisé.

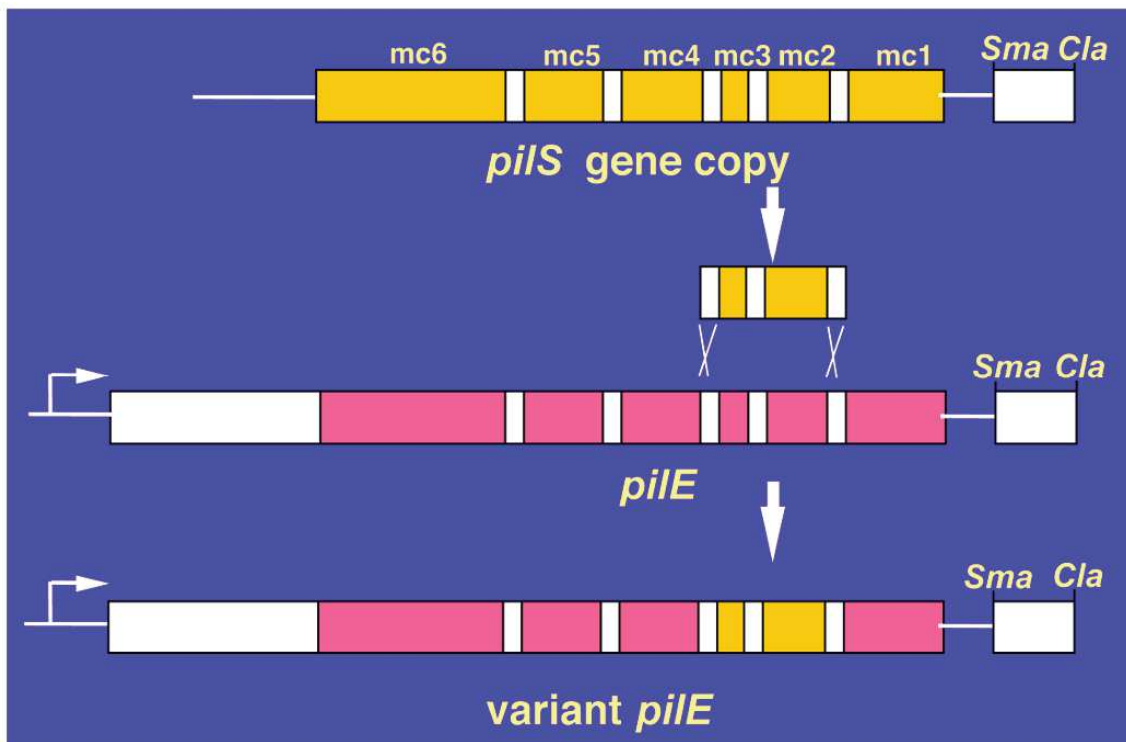


Figure 7 : Variation antigénique du pilus chez *N. gonorrhoeae* (Hill and Davies, 2009)

La variation antigénique de *pilE* intervient uniquement lorsque certaines "minicassettes" (mc) sont transférées du locus *pilS* pour remplacer les mc correspondantes sur le locus *pilE* amenant la formation d'un variant *pilE*.

Les séquences variables (en couleur sur le schéma) sont intercalées avec des séquences conservées (rectangles blancs). Le locus *pilE* contient aussi une grande séquence conservée en 5' ainsi qu'une région promotrice schématisée par une flèche.

Sma et *Cla* sont des séquences répétées de 65 pb.

Il existe au sein du régulon PhoP, l'opéron *pbgPE* dont les gènes présentent une forte similarité de séquence avec ceux de l'opéron *arn* et étant essentiels à la virulence de *Photobacterium* chez *G. mellonella* (Bennett and Clarke, 2005). Il a été démontré que seule une sous-population équivalente à 0.5% de la population totale de *Photobacterium* était résistante aux AMPc. Si cette sous-population est sélectionnée (par culture en présence d'AMPc et donc 100% de bactéries résistantes) puis que cette pression est enlevée, la population redevient hétérogène avec uniquement 0.5% de bactéries résistantes (Mouammine et al., 2017). Cette réversibilité ainsi que l'absence de mutation sur le génome amène à penser à une régulation épigénétique de cette hétérogénéité. Si l'absence de PhoP empêche cette résistance il a aussi été démontré qu'une surexpression de *pbgPE* amenait une résistance aux AMPc de toute la population. Il a été démontré que la protéine PhoP phosphorylée était capable de se lier à la région promotrice de *pbgPE* mais malgré ces résultats l'absence de sites consensus de fixation de PhoP en amont de *pbgPE* laisse à découvrir les mécanismes régulant l'expression hétérogène de *pbgPE* (Mouammine et al., 2017).

4.2 L'hétérogénéité phénotypique de façon générale

L'hétérogénéité phénotypique a été décrite chez de nombreuses bactéries, on peut notamment citer la régulation flagellaire chez *Salmonella* ou la variation antigénique d'un pilus chez *Neisseria gonorrhoeae*. Chez *S. enterica*, la synthèse de la flagelline FliC codée par le gène *fliC* est sous contrôle du répresseur FljA. Le gène *fliA* est situé dans un opéron en 3' du gène *fliB* (codant une flagelline) (Fig. 6). La région promotrice de cet opéron est flanquée de deux séquences répétées reconnues par la recombinase Hin causant l'inversion de cette région promotrice et ainsi l'expression ou non du régulateur FljA (et FljB) et par conséquent l'expression ou non du gène *fliC* (Bonifield and Hughes, 2003). Chez *Neisseria gonorrhoeae*, la variation antigénique du lui permet d'échapper au système immunitaire. Elle est due à des recombinaisons entre un gène « silence » nommé *PilS* (présent en plusieurs copies différentes) avec le gène « exprimé » *PilE* (Fig. 7). Les gènes des pili contiennent une région constante, une région semi-variable et une région hypervariable. Ces séquences hypervariables sont toutes flanquées de séquences *cys1* et *cys2* codant des acides aminés cystéines et étant des zones d'interaction et/ou recombinaison potentielles. Les différentes recombinaisons pouvant opérer amènent une hétérogénéité au niveau de la population permettant l'échappement immunitaire et l'évolution constante de la population (Howell-Adams and Seifert, 2000).

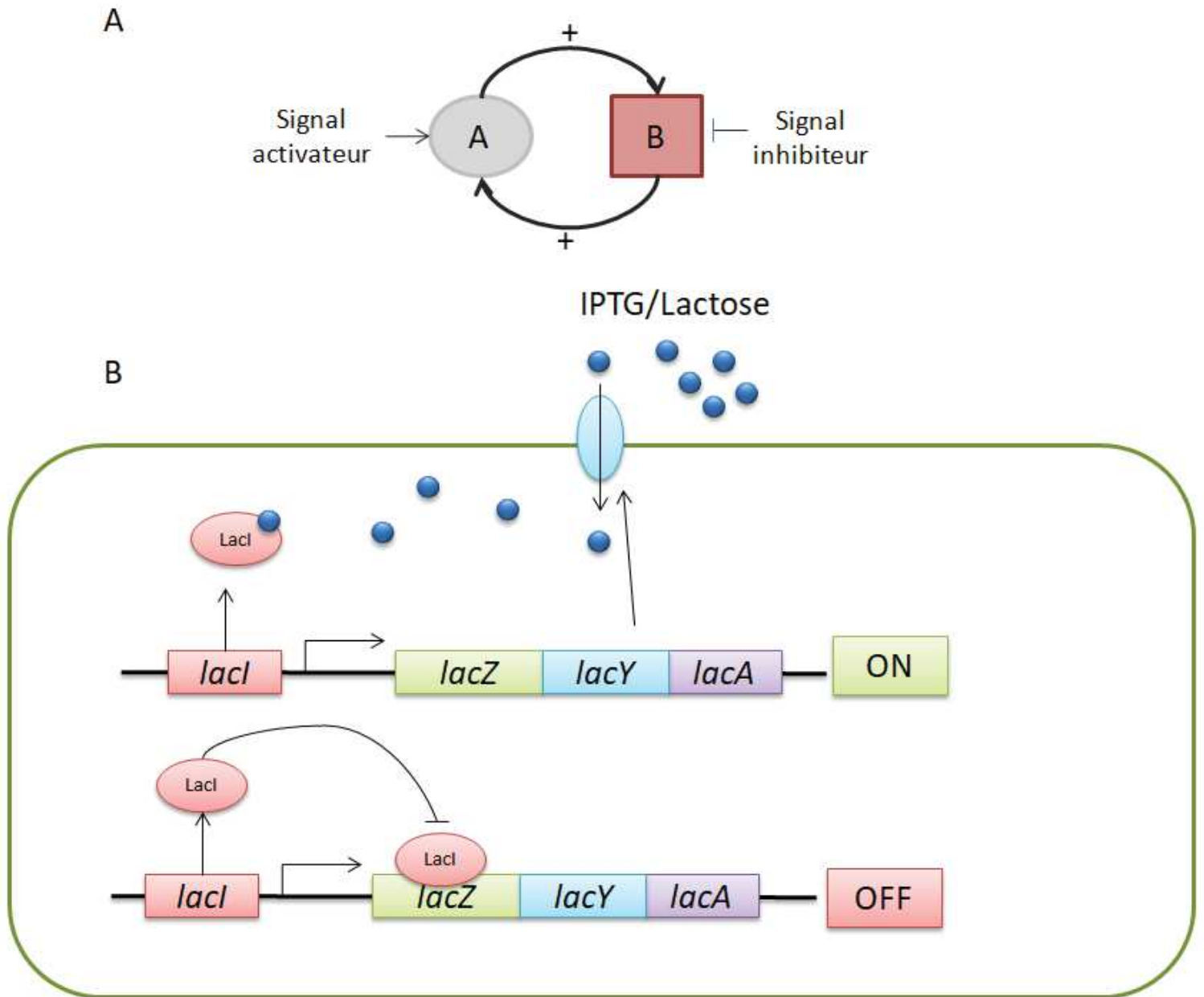


Figure 8 : Simple boucle de rétroaction positive, exemple de l'opéron lactose

- A- Suite à un signal activateur comme un changement d'environnement, la molécule A va être produite. Elle active la production d'une molécule B qui elle-même active la production de la molécule A permettant un maintien de la stimulation même si l'influx initial disparaît. Dans ces systèmes, il y a la plupart du temps une possibilité d'inhibition d'une des deux molécules (A ou B) qui causera le passage en mode OFF des deux productions.
- B- En absence de lactose ou d'IPTG, le répresseur LacI est produit et se lie à la séquence opératrice en amont de l'opéron qui n'est donc pas transcrit. Si une forte concentration de lactose est présente dans le milieu, il va pénétrer dans la cellule et se lier (après modification) au répresseur LacI empêchant son interaction avec l'ADN cible. L'opéron lactose est alors transcrit et traduit. La perméase LacY va être produite en quantité suffisante pour permettre une entrée du lactose permettant le maintien du signal ON même si la concentration en lactose dans le milieu diminue.

Ces deux exemples d'hétérogénéité phénotypique font intervenir des réarrangements génétiques. Ces mécanismes sont connus depuis longtemps et assez bien décrits (Dybvig, 1993 ; Hallet, 2001 pour revues). Ils interviennent généralement de façon stochastique et sont réversibles ce qui peut permettre une pré-adaptation de certaines bactéries de la population totale à un changement d'environnement.

L'hétérogénéité phénotypique peut aussi être expliquée par une régulation différentielle des gènes au niveau transcriptionnel sans qu'il n'y ait modification de la séquence nucléotidique initiale, tout en maintenant une transmission possible du phénotype aux cellules filles. Ces mécanismes sont dits épigénétiques.

5) L'épigénétique bactérienne

J'utiliserai durant cette thèse la définition de l'épigénétique suivante : Tout changement dans l'expression de gènes qui soit transmissible à la génération fille tout en étant réversible et n'étant pas lié à un changement dans la séquence nucléotidique. Chez les bactéries, les mécanismes impliqués sont au nombre de 2 ou 3 selon les points de vue. La multistationarité (simples boucles de rétroaction positives ou doubles boucles de rétroaction négatives dans les réseaux de régulation génétiques), la méthylation de l'ADN et enfin, selon les avis, les petits ARN. Ces derniers peuvent faire partie des mécanismes épigénétiques car la résultante finale de la liaison de ces ARN va être une expression différentielle de la protéine codée par le gène. Malgré le fait que ces ARN puissent être transmis aux bactéries filles lors de la division cellulaire, je classerais plutôt ce mécanisme comme un mécanisme régulateur de l'expression des gènes sans parler d'épigénétique. Plusieurs revues débattent sur l'appartenance ou non de ce mécanisme à l'épigénétique actuellement mais ce n'est pas le sujet de cette thèse (Waters et al., 2009 ; Deans and Maggert, 2015 pour détail).

Un premier mécanisme épigénétique décrit est la simple boucle de rétroaction positive. Dans ce système, une protéine A peut être soit capable de se lier à la partie promotrice de son gène et d'activer ainsi sa propre transcription (autoactivation), soit être activatrice de la synthèse d'une autre protéine B qui active la transcription du gène codant la protéine A (Fig. 8A) (Ferrell, 2002). Ce mécanisme peut être élargi à la présence de molécules activatrices dans le milieu amenant cette rétroaction positive. L'exemple le plus décrit est celui de l'opéron lactose chez *E. coli*. Cet opéron est inhibé par le répresseur LacI lorsqu'il n'y

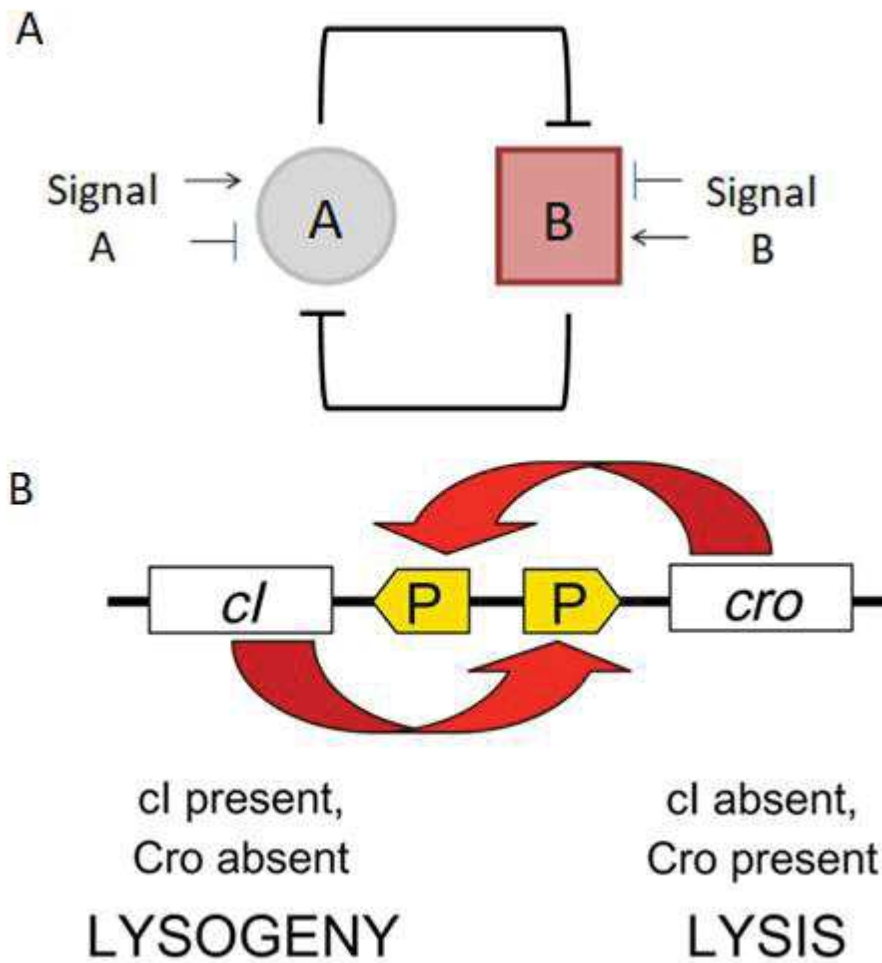


Figure 9 : Double boucle de rétroaction négative, exemple du phage λ

- A- La molécule A inhibe la production de la molécule B. La molécule B inhibe la production de la molécule A. Les signaux extérieurs (activateurs ou inhibiteurs) détermineront quelle molécule sera produite. Une fois l'une des deux produite, l'autre sera inhibée et un état stable obtenu. Dans ce cas on peut avoir uniquement un état ON pour A/ OFF pour B ou l'inverse.
- B- Dans le cycle du phage λ , si le gène *cl* est transcrit en premier, la protéine produite inhibera *cro* et le cycle sera lysogénique. Inversement, si Cro est produite en premier elle inhibera la transcription de *cl* et le cycle sera lytique (Casadesús and Low, 2013)

a pas ou peu de lactose ou d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu. Une augmentation de la concentration d'IPTG dans le milieu amène l'inactivation de LacI et donc l'expression de l'opéron lactose. Les 3 gènes *lacZ*, *Y* et *A* de cet opéron codent respectivement pour la β -galactosidase, une lactoperméase et une transacétylase. LacZ sert à l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose (Lederberg, 1950 ; Kalnins et al., 1983) et LacA à l'élimination des composés toxiques produits dans ce processus (Andrews and Lin, 1976). Seuls LacZ et Y sont essentiels au catabolisme du lactose. La perméase LacY permet l'entrée de l'IPTG dans la cellule, ainsi lorsqu'une cellule a été stimulée elle va pouvoir rester activée même si la concentration en IPTG chute puisqu'elle fait rentrer plus d'IPTG grâce à ses perméases (Figure 8B) (Laurent et al., 2005 ; Chang et al., 2010). Dans ce système, les cellules filles se partagent les récepteurs présents sur la membrane de la cellule mère et vont ainsi conserver ce phénotype (Chang et al., 2010).

Un second système est celui de la double boucle de rétroaction négative. Dans ce cas, une protéine A va inhiber la production d'une protéine B qui, si elle est produite, inhibe la protéine A (Figure 9A) (Ferrell, 2002). L'exemple le plus connu de ce mécanisme est l'alternance du cycle lysogénique/lytique du phage λ . Si le passage du cycle lytique à lysogénique peut aussi être influencé par divers événements comme le cycle cellulaire, ou les conditions du milieu environnant, il est connu que ce cycle est régulé par deux régulateurs nommés CI et Cro qui sont respectivement répresseurs l'un de l'autre. Lors d'une infection, les deux répresseurs sont produits et une compétition est lancée. Selon lequel des deux se fixera en premier, le second sera inhibé. Si CI se fixe en premier le cycle sera lysogénique et à l'inverse si Cro se fixe en premier il sera lytique (Figure 9B) (Johnson et al., 1981 ; Schubert et al., 2007 ; Casadesús and Low, 2013).

Dans les deux mécanismes décrits ci-dessus, on observe un phénomène appelé bistabilité. Pour la boucle de rétroaction positive soit le/les gènes ON se maintiennent en cet état ou alors l'ensemble est OFF. Pour la double boucle de rétroaction négative soit le gène A est ON et donc B est OFF, soit l'inverse, mais jamais les deux ON ou les deux OFF (Ferrell, 2002). Néanmoins ces deux mécanismes vont aboutir à un état phénotypique stable mais réversible sans qu'il n'y ait de modification dans la séquence génétique.

Un dernier mécanisme épigénétique est la régulation génétique par la méthylation de l'ADN. Avant d'expliquer en quoi la méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique, il me semble important d'expliquer son rôle chez les bactéries de manière plus générale.

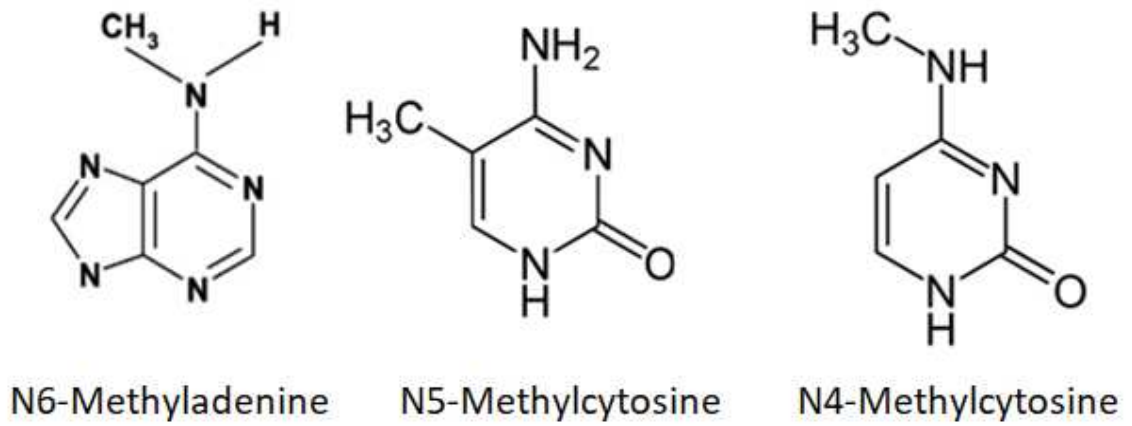


Figure 10 : Les trois différentes bases retrouvées méthylées chez les procaryotes.

De gauche à droite, m6A, m5C et m4C.

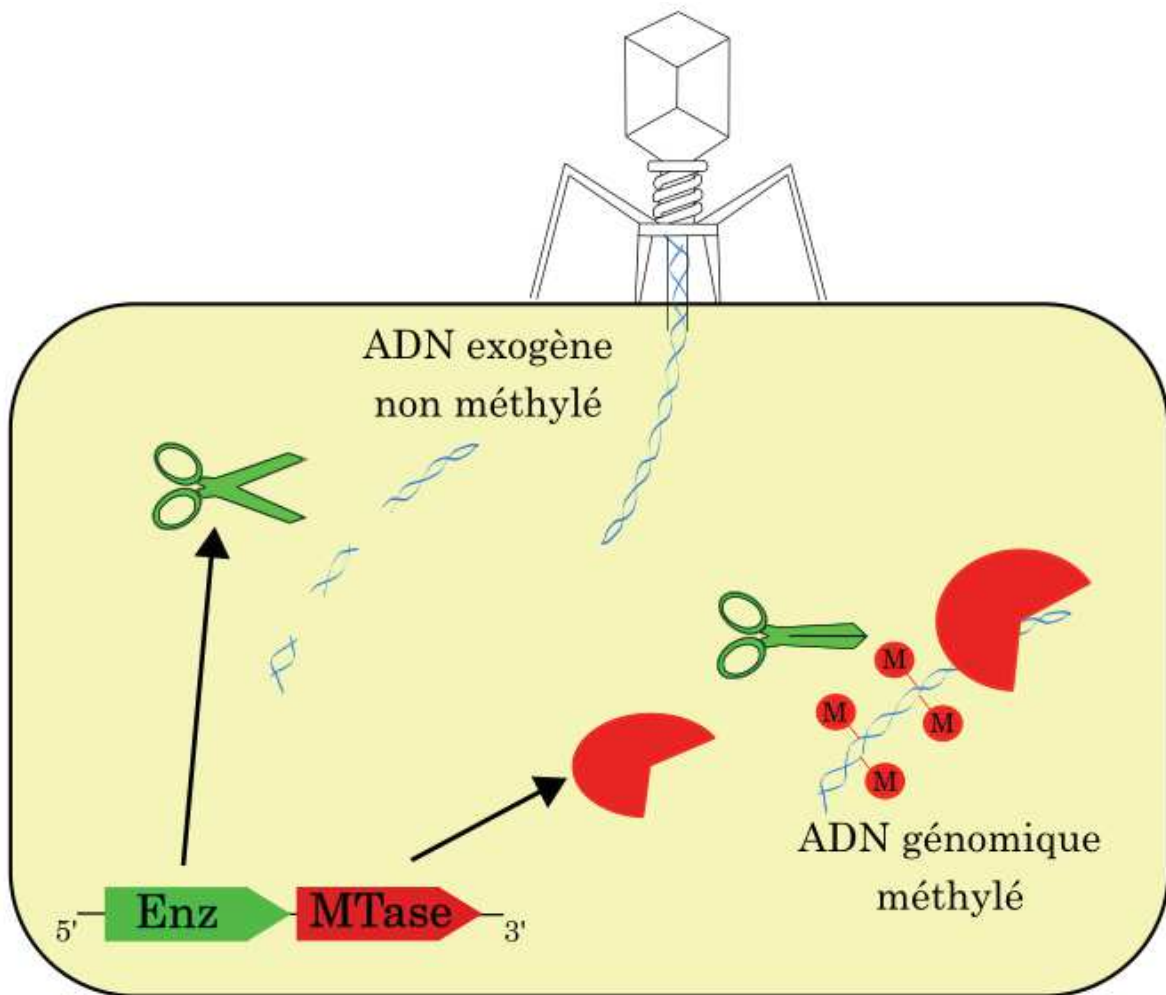


Figure 11 : Système de restriction-modification, exemple d'un ADN exogène de bactériophage (D'après Furuta and Kobayashi, 2013).

Dans les systèmes RM une enzyme de restriction et la MTase qui lui est associée vont reconnaître les mêmes sites sur l'ADN. L'ADN génomique est méthylé par la MTase immédiatement après la réplication du génome ce qui empêche sa dégradation par l'enzyme de restriction. A l'inverse un ADN exogène comme celui d'un bactériophage n'aura pas le même profil de méthylation et sera digéré par cette enzyme.

6) Généralités sur la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN chez les bactéries est décrite depuis de nombreuses années comme jouant un rôle dans plusieurs mécanismes cellulaires. Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) sur une base adénine ou cytosine de la molécule d'ADN. Il existe chez les bactéries trois types de méthylation : 6-méthyladenine (m6A), 4-méthylcytosine (m4C) et 5-méthylcytosine (m5C). Ces groupements méthyles sont ajoutés par des méthyltransférases (MTases) (Fig. 10). Ces MTases peuvent être associées à une enzyme de restriction dans le cas des systèmes de restriction modification (R-M) ou être « orphelines » (Casadesús, 2016). Une liste des MTases décrites ou prédites, qu'elles soient orphelines ou non, d'origine eucaryote ou procaryote, est disponible en ligne dans la base de données REBASE (Roberts et al., 2015 ; REBASE.neb.com).

6.1 Les systèmes de restriction-modification

Dans le cas des systèmes R-M, une MTase est associée à une enzyme de restriction (ER) (les protéines agissent sous la forme d'un complexe (Cf. type I)) ou non (la MTase et l'enzyme de restriction ciblent aussi le même site sur l'ADN mais agissent indépendamment). Certains cas à part présentent aussi un seul gène contenant à la fois les sites actifs de méthylation et de coupure, ces enzymes sont nommées hybrides et majoritairement reliées aux RM de type II. De manière générale, ces systèmes sont utilisés principalement dans la reconnaissance de l'ADN du « soi ». En effet l'ADN bactérien va être méthylé dans la cellule directement après la réplication de l'ADN et cette méthylation va bloquer l'action des enzymes de restriction. Un ADN étranger (phagique par exemple) n'aura pas le même profil de méthylation et pourra donc être clivé par les ER. Ces enzymes de restriction sont devenues au cours du temps un outil clef en biologie moléculaire où elles servent à digérer l'ADN (Fig. 11) (Furuta and Kobayashi, 2013). Il existe 4 principaux types de systèmes R-M numérotés de I à IV. Ces types sont notamment définis par 3 caractères : leur composition (sous-unités et association ou non entre ER et MTase) ; les cofacteurs nécessaires et enfin le site de coupure sur l'ADN (Bickle and Krüger, 1993 ; Casadesús, 2016).

Les R-M système de type I

Le mode de fonctionnement de ce système est certainement le plus complexe. Les types I sont composés habituellement de trois sous-unités différentes dont deux en dimères

composant au total un complexe actif de cinq sous-unités (Dryden et al., 1997). Les trois sous-unités différentes sont nommées HsdR, HsdM et HsdS pour « Host specificity for DNA » (Murray, 2000).

Les systèmes R-M de type I comptent à ce jour 5 familles d'enzymes classées de A à E sur la base de séquences nucléotidiques ou d'acides aminés ainsi que sur la réactivité croisée d'anticorps sur les différentes enzymes, mais il y a de grandes chances que d'autres groupes se forment au cours des avancées scientifiques (Murray, 2000 ; Loenen et al., 2014).

HsdS: Cette sous-unité permet la spécificité de reconnaissance de la séquence cible. Les autres sous-unités vont venir se fixer sur HsdS pour se lier ensuite à la bonne séquence sur l'ADN. Les Types I reconnaissent des sites de type « AACNNNNNNGTGC » où on retrouve quasiment toujours 3 à 4 paires de bases définies en 5' et 3 à 5 paires de bases définies en 3'. Ces deux séquences sont séparées par 5 à 8 paires de bases non spécifiques (Loenen et al., 2013 ; Loenen et al., 2014). La sous-unité HsdS contient deux séquences nommées TRDs pour « Target Recognition Domains » d'environ 150 acides aminés. La séquence TRD en N-ter reconnaît la séquence en 5' alors que la séquence TRD en C-ter reconnaît celle en 3'. Les séquences TRDs ne sont que très peu conservées entre les différentes enzymes mais l'ensemble de HsdS est assez conservé (30-90% d'identité) au sein d'une même famille d'enzyme (Murray, 2000 ; Titheradge et al., 2001).

HsdM: La sous-unité HsdM est la sous-unité dite de modification. Elle contient un site de liaison au cofacteur S-Adénosyl-Méthionine (SAM) qui est le donneur universel de groupement méthyle et un site actif de méthylation. Cette sous-unité M est souvent retrouvée sous forme de dimères au niveau du complexe protéique (Kennaway et al., 2012). Cette sous-unité est responsable de la modification de la base à méthyler par un phénomène de « retournement » qui rend possible la méthylation de la base adénine ou cytosine (Kennaway et al., 2012). Au sein des systèmes R-M de type I, c'est la sous-unité la plus conservée entre les familles avec une similarité allant jusqu'à 90% (Titheradge et al., 2001). Il est important de noter que le complexe protéique formé par HsdS et HsdM suffit à l'activité MTase du complexe total (Murray, 2000 ; Loenen et al., 2014). De plus, ces deux sous-unités sont sous le contrôle du même promoteur contrairement à HsdR qui a son propre promoteur (Murray, 2000).

Tableau 4 : Listes des caractéristiques des sous-types pour les enzymes de restriction de type II (d'après Roberts et al., 2003)

Subtype ^a	Defining feature	Examples	Recognition sequence
A	Asymmetric recognition sequence	FokI	GGATG (9/13)
B	Cleaves both sides of target on both strands	AclI	CCGC (-3/-1)
C	Symmetric or asymmetric target. R and M functions in one polypeptide	BclI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
		GsuI	CTGGAG (16/14)
		HaeIV	(7/13) GAYNNNNNRTC (14/9)
		BclI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
E	Two targets; one cleaved, one an effector	EcoRII	↓CCWGG
		NaeI	GCC↓GGC
F	Two targets, both cleaved coordinately	SfiI	GGCCNNNN↓NNGCC
		SgrAI	CR↓CCGGYG
G	Symmetric or asymmetric target. Affected by AdoMet	BsgI	GTGCAG (16/14)
		Eco57I	CTGAAG (16/14)
H	Symmetric or asymmetric target. Similar to Type I gene structure	BclI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
		AhdI	GACNNN↓NNGTC
M	Subtype IIP or IIA. Require methylated target	DpnI	Gm6 A↓TC
P	Symmetric target and cleavage sites	EcoRI	G↓AATTC
		PpuMI	RG↓GWCCY
		BslI	CCNNNNN↓NNGG
S	Asymmetric target and cleavage sites	FokI	GGATG (9/13)
		MmeI	TCCRAC (20/18)
T	Symmetric or asymmetric target. R genes are heterodimers	Bpu10I	CCTNAGC (-5/-2) ^b
		BslI	CCNNNNN↓NNGG

^aNote that not all subtypes are mutually exclusive. E.g. BslI is of subtype P and T.

^bThe abbreviation indicates double strand cleavage as shown below:

5' C C ↓ T N A G C
3' G G A N T ↑ C G

HsdR: La dernière sous-unité a une fonction de restriction. Malgré un faible taux de conservation au sein des 5 familles, certains domaines sont retrouvés chez toutes ces enzymes notamment un domaine de liaison à l'ATP souvent apparenté à un domaine hélicase et un domaine nucléase (Kennaway et al., 2012 ; Murray, 2000). Cette sous unité est non active la majeure partie du temps et deviendra active uniquement après la formation du complexe final au niveau du site non méthylé (Kennaway et al., 2012).

Les enzymes de type I ont longtemps été peu décrites à cause des problèmes liés à leur détection par les méthodes anciennes. En effet ces enzymes coupent sur des sites éloignés (jusqu'à 1kb) du site qu'elles reconnaissent (Davies et al., 1999). Les nouvelles techniques comme le séquençage SMRT ont permis d'associer des motifs régulièrement méthylés à des gènes codant pour les méthyltransférases ainsi que les éventuelles enzymes de restriction partenaires.

R-M de type II

Les R-M de type II sont les premiers à avoir été décrits et utilisés dans le domaine de la biologie moléculaire cela étant dû au fait que l'enzyme de restriction coupe l'ADN au niveau ou très proche du site reconnu ce qui a facilité la compréhension du mécanisme (Pingoud et al., 2014). Une autre caractéristique de ces enzymes est qu'elles agissent majoritairement indépendamment de leur méthyltransférase et ne requièrent ni ATP ni GTP sauf cas particuliers (Roberts et al., 2003). Du fait de leur étude depuis de nombreuses années on compte plusieurs milliers d'enzymes de type II référencées (REBASE.neb.com pour détail). Elles sont classifiées en de nombreux sous-groupes étant A, B, C, E, F, G, H, M, P, S et T (Tableau 4) (Roberts et al., 2003). Ces sous-groupes permettent de séparer les enzymes de type II ayant un caractère particulier. De manière habituelle une enzyme de type II agit en homodimère, reconnaît une séquence palindromique de 4 à 8 paires de bases, clive l'ADN sur les deux brins produisant une extrémité 3'-Hydroxyle et une autre 5'-Phosphate (Pingoud et al., 2005). Du fait de l'intérêt majeur des enzymes de ce type en biologie moléculaire, de nombreuses revues sont disponibles pour comprendre en détail leur fonctionnement (Pingoud et al., 1997 ; Perrona, 2002 ; Pingoud et al., 2005 ; Pingoud et al., 2014).

Tableau 5 : Modifications de l'ADN^a suscitant la coupure par des enzymes de type IV (Loenen et al., 2014).

Protein	m5C	hm5C	ghm5C	m4C	m6A	PT	References
EcoKMcrA	(+)	(+)	(-)	NT	(-)	NT	(3,36)
ScoA3McrA	+	NT	NT	NT	(+)	+	(37,38); Sco4631
EcoKMcrBC	+	+	-	(+)	-	NT	(3,39,40)
BanUMcrB	(+)						(41)
BanUMcrB3	(+)						(41)
EcoKMrr	(+)	(-)	(-)	(-?)	(+)	NT	(42,43)
BanUMrr	(+)				(+?)		(41)
ScoA3Mrr	(-)				(+)		(37); Sco4213
ZmoMrr	(+?)				(+?)		(44); ZMO1932; Zmrr
SauUSI	+	+	-	-	-?	NT	(45)
SauNewI	(+)						(46); NWMN_2386
SepRPMcrR	(+)						(46); SERP2052
ScoA3I	(+)						(37); Sco2863
PvuRts1I family	+/-	+	+	NT	-	NT	(47,48)
GmrSD	-	-	+	NT	-	NT	(49)
ScoA3II+III	(+)				(-)		(37); Sco3261-62

^aModifications: m5C: 5-methylcytosine; hm5C: 5-hydroxymethylcytosine; ghm5C: glucosylated hydroxymethylcytosine; m4C: *N*4-methylcytosine; m6A: *N*6-methyladenine; PT: phosphorothioation of non-bridging oxygen in DNA linkages, also called S-DNA.

+/-: at least 100-fold less activity on this substrate than on substrates with + entry.

(-), (+), based on *in vivo* restriction of phage infection or plasmid transformation with appropriate host mutant configurations; *in vitro* cleavage results have not been reported.

(+?) either m5C or m6A is recognized; these were not distinguished in the reported experiments.

-?: m6A sites tested were not cleaved, but few modified sequences were tested.

NT: not tested.

Where the name found in REBASE (and listed at the left) is not the same as that used in the cited report, the genomic locus_ID is given in the References column, or the name used in the publication.

R-M de type III

Beaucoup moins décrit que le groupe précédent, les systèmes de type III semblent pourtant être présents chez de nombreuses bactéries puisqu'on dénombre à ce jour 447 enzymes de type III caractérisées mais 16345 enzymes putatives de ce type (REBASE.neb.com). Il semble de façon générale que ces enzymes soient composées d'un tétramère comportant deux sous-unité de restriction (Res) et deux sous-unité de modification (Mod) et qu'elles nécessitent du Mg²⁺ ainsi que de l'ATP (Rao et al., 2014). Les gènes *res* et *mod* ont jusqu'à maintenant toujours été retrouvés adjacents et la protéine Mod semble ne méthyler que les adénines (Roberts et al., 2003 ; Rao et al., 2014). Un dernier point semblant être commun aux systèmes de type III est la nécessité de reconnaissance de deux sites (Piekarowicz and Brzezinski, 1980).

R-M de type IV

Cette catégorie d'enzyme est la moins décrite avec uniquement 19 enzymes caractérisées et 11955 en comptant les prédictions sur la base de génomes (REBASE.neb.com). Elles coupent l'ADN uniquement lorsqu'il est modifié (méthylation, hydroxyméthylation, glucosyle-hydroxyméthylation et phosphorothioation (PT)) (Tableau 5) (Loenen et al., 2014) mais les sites de reconnaissance sont très peu décrits (Roberts et al., 2003).

Il existe dans les génomes de la plupart des protéobactéries des méthyltransférases qui ne sont pas liées à une enzyme de restriction. Ces méthyltransférases sont appelées des orphelines.

6.2 Les méthyltransférases orphelines

Les MTases solitaires ou orphelines sont présentes chez de nombreuses bactéries mais seule une infime proportion de celles-ci sont étudiées, dont Dam (DNA Adenine MTase) et Dcm (DNA Cytosine MTase) chez les *γ-protéobactéries* et CcRM (Cell cycle Regulated MTase) chez les *α-protéobactéries*. Les rôles décrits de ces MTases sont extrêmement variés (Casadesús, 2016).

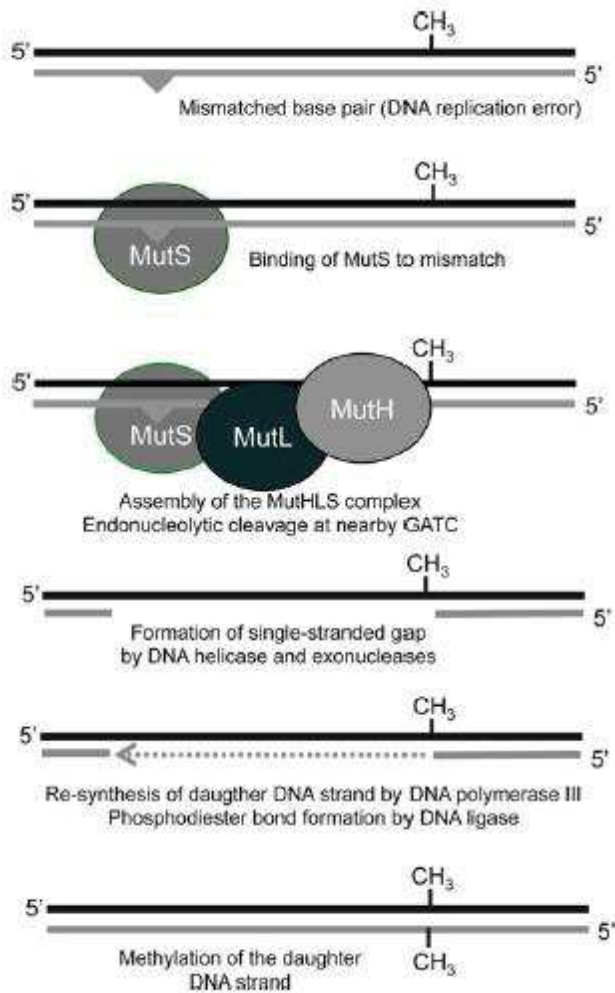


Figure 12 : Fonctionnement du système de réparation des erreurs post-réplcatives de l'ADN (Casadesús, 2016).

En présence d'une erreur « mismatch » lors de la réplication du génome, la protéine MutS va se lier au niveau du mésappariement. Les protéines MutL puis MutH vont se lier à MutS pour former le complexe de réparation de l'ADN. MutH va ensuite couper l'ADN au niveau du site GATC (hémiméthylé). L'hélicase II (UvrD) va ensuite séparer les deux brins d'ADN en partant de la coupure vers le mésappariement et des exonucléases vont dégrader le brin séparé de la molécule. L'ADN polymérase III synthétise alors le brin complémentaire au brin mère et l'ADN ligase relie le brin réparé au brin néosynthétisé. La dernière étape sera la méthylation de l'ADN néosynthétisé par la MTase Dam.

6.2.1 Implication dans les systèmes de réparation de l'ADN post-réplication

Chez les *γ-protéobactéries*, la MTase Dam a un rôle important dans les systèmes de réparations de l'ADN (MMR pour MisMatch Repair). Cette MTase modifie les sites 5'-GATC-3' en ajoutant un groupement méthyle en position N6 de l'adénine (Fig. 10). Elle est capable de méthyle ces sites palindromiques sur les deux brins, et va méthyle légèrement plus vite un brin hémiméthylé qu'un brin non méthylé (Herman and Modrich, 1982). Chez les Entérobactéries, il a été décrit pour *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ou encore *Xenorhabdus* que la majorité des sites 5'-GATC-3' du génome était méthylés en condition de culture *in vitro* (de 95% à 99.9%) (Fang et al., 2012 ; Blow et al., 2016). Lors du processus de réplication de l'ADN, le brin mère est méthylé alors que le brin néosynthétisé ne l'est pas encore. Les protéines MutS, MutL et MutH corrigent les erreurs survenues lors de la réplication de l'ADN et vont se servir de ce différentiel de méthylation pour corriger l'erreur sur le brin néosynthétisé et non sur le brin matrice (Fig. 12, Iyer et al., 2006 pour revue détaillée) (Pukkila et al., 1983). Brièvement, MutS reconnaît les bases mésappariées et se lie à l'ADN sous forme de dimère à ce niveau (Parker and Marinus, 1992). Un dimère de la protéine MutL se lie alors au complexe MutS avec consommation d'ATP (Acharya et al., 2003). La protéine MutH est elle aussi dépendante de MutS, MutL et d'ATP. Elle reconnaît le site GATC hémiméthylé le plus proche en 5' ou 3' du lieu de liaison du complexe MutS/L. MutH coupe alors le brin non méthylé en 5' du G du site GATC (Welsh et al., 1987). Une fois cette incision réalisée, l'hélicase ADN II (UvrD) sépare les deux brins d'ADN en partant de l'incision vers le site de liaison du complexe (Dao and Modrich, 1998). Le simple brin d'ADN résultant de cette séparation est dégradé par des exonucléases différentes selon si la dégradation doit se faire dans le sens 5'-3' ou l'inverse. Exo I et Exo X si l'incision est en 3' de la base mutée et RecJ si elle est en 5', Exo VII est la seule exonucléase impliquée pouvant digérer les brins dans les deux sens (Burdett et al., 2001).

A la suite de cela le brin complémentaire au brin mère est synthétisé par l'ADN polymérase III et ligué par l'ADN ligase (Lahue et al., 1989) enfin le site GATC du brin néosynthétisé est méthylé par Dam (Iyer et al., 2006 ; Marinus and Casadesús, 2009).

L'importance de la méthylation de l'ADN par Dam dans ce système est de première importance chez *E. coli* ou *S. enterica* puisqu'une méthylation aberrante de l'ADN causée par une mutation du gène *dam* (Glickman, 1979) ou une surexpression de cette MTase va

amener une hypermutabilité de la bactérie (Hermann and Modrich, 1981). Dans le cas d'un mutant Dam, on observe une augmentation conséquente de cassures double brin sur l'ADN ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse à ces cassures (Wang and Smith, 1986 ; Manke et al., 2005). En effet, MutH coupe le brin non méthylé d'un ADN hémiméthylé mais il a été décrit qu'en cas de non méthylation, une incision sur les deux brins peut être réalisée (Au et al., 1992 ; Lee et al., 2005). Même dans le cas où MutH ne coupe pas sur les deux brins, la protéine n'a plus la capacité de différencier le brin mère du brin néosynthétisé et va donc initier la correction sur le mauvais brin 50% du temps. Cette hypothèse est supportée par le fait que les doubles mutants *dam/mutS* ou *mutL* ont un taux de mutation plus haut que les simples mutants (Hu et al., 2017). Il semble malgré tout que l'augmentation du taux de mutation des mutants *dam* est due principalement aux cassures double brin de l'ADN car les doubles mutants *rec/dam* sont non viables (Wang and Smith, 1985 ; Marinus, 2000). La surexpression de Dam amène aussi un phénotype hypermutable (Hermann and Modrich, 1981, Pukkila et al., 1983). L'hypothèse la plus probable est que lors d'une surexpression de Dam, l'ADN néosynthétisé est plus rapidement méthylé et ne va donc plus permettre la liaison de MutH et donc la correction d'erreurs. Cette hypothèse est confortée par une différence de taux de mutation en fonction du taux de surexpression de Dam et donc une notion de compétition entre MutH et Dam (Marinus et al., 1984 ; Casadesús, 2016).

6.2.2 Réplication du chromosome et méthylation de l'ADN

- Chez *E. coli*

La réplication du chromosome chez *E. coli* est initiée par la liaison entre la protéine DnaA et ses sites de liaisons (boîtes DnaA) de 9 paires de bases situés au niveau de la région *oriC* sur l'ADN. Cette région *oriC* est d'environ 250 paires de bases et contient 11 sites GATC dispersés entre les diverses boîtes DnaA (Mott and Berger, 2007). Il a été décrit que lorsque les motifs GATC sont complètement méthylés, DnaA va alors pouvoir se lier à l'ADN et initier la réplication du chromosome mais qu'à l'inverse une hémiméthylation empêchait cette liaison (Messer et al., 1985). Plus précisément, il existe une protéine nommée SeqA se liant avec une très forte affinité au niveau des sites GATC lorsqu'ils sont hémiméthylés. Suite à la réplication du génome, les sites GATC se retrouvent hémiméthylés car le brin néosynthétisé n'a pas encore été méthylé par Dam. La protéine SeqA va alors se lier à ces séquences sous

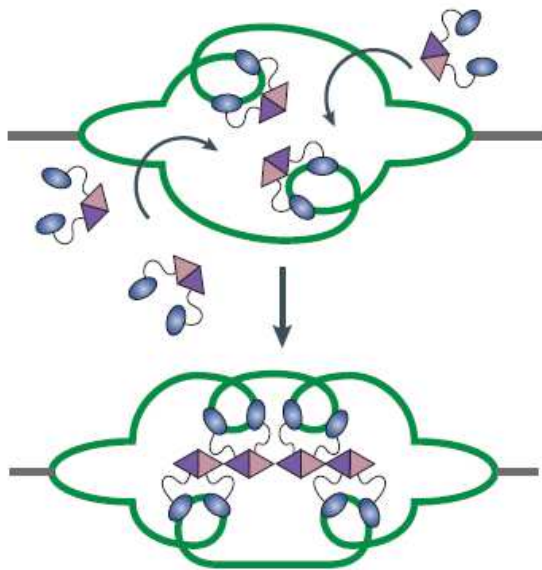


Figure 13 : Multimérisation de SeqA durant la réplication d'*oriC* (Mott and Berger, 2007)

SeqA reconnaît initialement sous forme de dimères les sites GATC hémiméthylés (double brin d'ADN ou le brin néosynthétisé est non méthylé). L'oligomérisation entre les dimères de SeqA va former un complexe amenant rapidement à la séquestration de l'ADN répliqué.

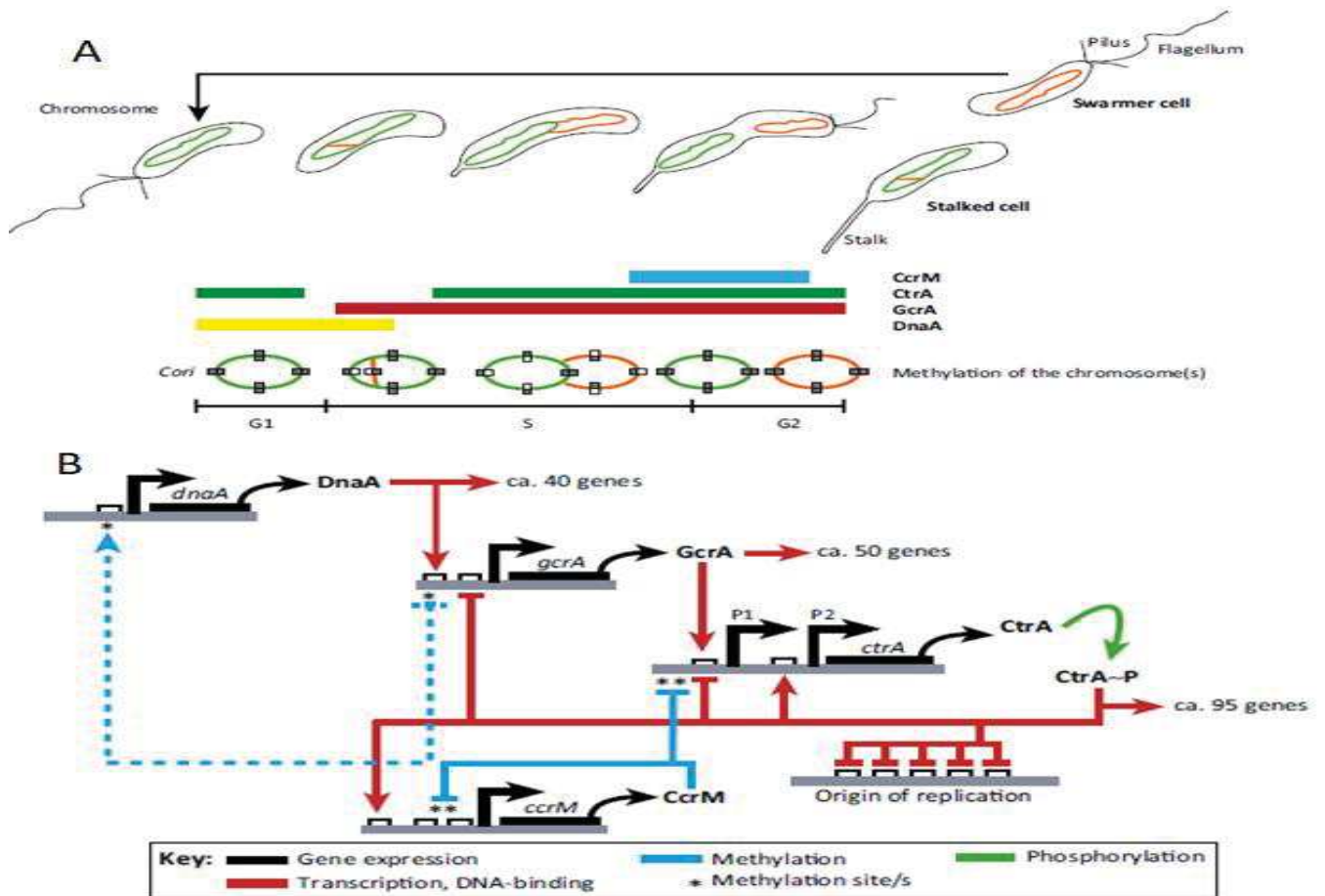


Figure 14 : Le cycle de *Caulobacter crescentus* et sa régulation (Mohapatra et al., 2014).

- A- Le cycle cellulaire de *C. crescentus* inclut une différenciation cellulaire avec notamment une cellule fille flagellée et une cellule mère « attachée ». Durant ce cycle les quatre protéines CcrM, CtrA, GcrA et DnaA sont synthétisées sur des laps de temps respectivement différents. A noter qu'une autre protéine nommée SciP est aussi finement régulée mais non détaillée ici.
- B- Régulation interconnectée des quatre protéines majeures durant le cycle de *C. crescentus*. Les lignes en pointillés représentent des implications actuellement remises en questions.

forme d'homodimères si deux sites GATC sont suffisamment proches (<31pb) (Lobner-olesen et al., 2005) puis former un complexe avec d'autres dimères de protéines SeqA liées eux-aussi aux sites GATC hémiméthylés proches. Cette multimérisation va empêcher Dam de méthyle les sites GATC complètement et donc empêcher un nouvel événement de réplication de s'initier (Fig. 13) (Slater et al., 1995 ; Nievera et al., 2006 ; Mott and Berger, 2007). Il est bien entendu que d'autres protéines sont aussi en jeu dans la régulation de la réplication comme IHF (Integration Host Factor) ou Fis (Factor for Inversion Stimulation) mais je ne les détaillerai pas ici (Mott and Berger, 2007 ; Katayama et al., 2010 pour détail).

- *Chez d'autres bactéries*

Si les mécanismes gouvernant la régulation de la réplication sont assez bien décrits chez *E. coli*, il n'en est pas de même chez de nombreuses autres bactéries. Néanmoins, il semble y avoir plusieurs points communs entre cette régulation chez *E. coli* et d'autres γ -protéobactéries comme les *Pseudomonas* ou *Salmonella*. Il y a en effet chez toutes ces bactéries un système de contrôle de la réplication de l'ADN fortement lié aux protéines DnaA et SeqA ce qui implique indirectement la MTase Dam présente chez ces bactéries (Smith et al., 1991 ; Aloui et al., 2007).

L'autre modèle bactérien le plus décrit sur ces thématiques est *Caulobacter crescentus*. Cette bactérie appartient aux α -protéobactéries. La MTase la plus connue chez cette bactérie se nomme CcrM pour « MTase Régulée durant le Cycle Cellulaire » (*Cell cycle regulated MTase*). Cette MTase méthyle les sites « GANTC » (ou N correspond à n'importe quel nucléotide) au niveau de l'adénine et a une affinité plus forte pour les sites hémiméthylés (Zweiger et al., 1994 ; Berdis et al., 1998). La présence de cette MTase dans *Caulobacter* est finement régulée durant le cycle cellulaire de la bactérie avec une augmentation forte de sa présence en fin de réplication du chromosome (moment où l'ADN est entièrement hémiméthylé) (Marczynski, 1999). Le cycle cellulaire de *Caulobacter* est régulé par 4 protéines principales ayant chacune un rôle précis dans une étape du cycle de la réplication du chromosome. CcrM est l'une de ces protéines, trois autres nommées DnaA, GcrA et CtrA sont responsables de la régulation de près de 200 gènes (Gorbatyuk and Marczynski, 2001 ; Laub et al., 2002 ; Holtzendorff et al., 2004) et ont un rôle direct dans la réplication du chromosome (Fig. 14). Brièvement, le cycle cellulaire de *Caulobacter* commence par la production et l'accumulation de la protéine DnaA. Le gène codant cette protéine sera préférentiellement transcrit si son promoteur est méthylé sur les deux brins au

niveau des sites GANTC (cibles de CcrM) (Collier et al., 2007) mais l'implication directe de CcrM dans la régulation de DnaA est aujourd'hui sujet à débat (Cheng and Keiler, 2009 ; Gonzalez et al., 2014). DnaA va activer la transcription du gène *gcrA* codant pour la protéine GcrA (Collier et al., 2006) et réguler l'expression d'une quarantaine de gènes (Gorbatyuk and Marczyński, 2001). La protéine GcrA régule l'expression d'une cinquantaine de gènes. Certains de ces gènes ont dans leur région promotrice des sites GANTC et il apparaît qu'une méthylation complète de ces sites favorise la liaison de GcrA sur la partie promotrice de ces gènes (Fioravanti et al., 2013). Il est à noter que même si un site GANTC est présent dans la partie promotrice de *gcrA*, une implication réelle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de *gcrA* est aujourd'hui remise en question (Fioravanti et al., 2013 ; Mohapatra et al., 2014). GcrA et CcrM sont toutes deux impliquées dans la régulation de l'expression du gène codant pour CtrA (Holtzendorff et al., 2004). Une hypothèse actuelle sur cette régulation est que GcrA se lierait dans tous les cas à la partie promotrice de *ctrA* mais aurait un rôle activateur si le site GANTC est hémiméthylé et inhibiteur si il est complètement méthylé (Fioravanti et al., 2013). La protéine CtrA est la protéine qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression de CcrM, l'initiation de la réplication ainsi que l'expression de 95 gènes (Laub et al., 2002). CcrM est ensuite exprimée et peut alors méthyler le nouveau brin d'ADN issu de la réplication (Fig. 14) (Mohapatra et al., 2014).

7) La méthylation de l'ADN et la régulation des gènes

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN et plus précisément la méthylation des cytosines, est décrite comme jouant un rôle dans la régulation des gènes (Law and Jacobson, 2011). Un point important à noter est que si chez les eucaryotes cette méthylation de l'ADN peut jouer sur l'expression de gènes lorsqu'elle est intragénique et notamment au niveau d'éléments transposables (Le et al., 2015 ; Zhang et al., 2006), chez les bactéries la grande majorité des exemples sont des méthylations dans la région promotrice d'un gène jouant un rôle dans la régulation de ce dernier. Comme décrit précédemment, les sites GATC du génome peuvent être méthylés par Dam chez les entérobactéries. Cette méthylation, lorsqu'elle est située dans une région promotrice, peut modifier l'affinité de certaines protéines régulatrices pour leur site de fixation. Il y a beaucoup d'exemples de gènes dont l'expression dépend de cette compétition entre fixation d'un régulateur ou de la MTase.

7.1 Implication des MTases dans les phénotypes globaux

Chez les entérobactéries, la méthylation sur les adénines est la plus décrite. Néanmoins certains exemples démontrent un rôle de la méthylation des cytosines. Dcm (DNA cytosine MTase) est la plus connue des MTases bactériennes méthylant les cytosines. Elle méthyle la deuxième cytosine des sites CCWGG. Cette MTase est décrite comme potentiellement impliquée dans la régulation de gènes de la phase stationnaire. En effet, chez un mutant *dcm*, l'expression du facteur sigma RpoS augmente ainsi que celle de nombreux autres gènes de la phase stationnaire et il est possible que ces phénomènes soient en lien direct avec une régulation par Dcm (Kahramanoglou et al., 2012). La conservation de cette MTase étant très forte dans les espèces d'*E. coli* il semble logique qu'elle ait un rôle important dans la cellule (Militello et al., 2012). Plus récemment il a été démontré que la MTase Dcm avait un rôle dans la résistance aux composés antimicrobiens en régulant l'expression du gène *sugE* qui est un transporteur impliqué dans cette résistance (He et al., 2011 ; Militello et al., 2013). Un autre exemple de méthylation des cytosines chez les bactéries à Gram négatif est celui d'*Helicobacter pylori*. Il existe chez cette bactérie de nombreuses MTases méthylant les bases cytosines ou adénines. Des analyses transcriptomiques comparant *H. pylori* WT et un mutant pour une MTase méthylant les cytosines en position 5 (m5C) (*hpyAVIBM*) ont mis en évidence un rôle de cette MTase dans la régulation de gènes de mobilité, d'adhésion et de virulence (Kumar et al., 2012a ; Kumar et al., 2012b). Une étude plus récente a de plus démontré l'importance d'une MTase d'*H. pylori* méthylant les cytosines en position 4 (m4C) dans la régulation de la transcription et de la virulence (Kumar et al., 2018). Hormis ces quelques exemples, la méthylation des cytosines reste à ce jour chez les bactéries un phénomène qui semble moins essentiel que la méthylation des adénines (Marinus and Casadesús, 2009).

La méthylation des adénines chez les bactéries est sans nul doute la plus étudiée. De nombreuses études débutent par une mutation ou une surexpression de la MTase cible suivi d'une étude des phénotypes affectés par la dérégulation de la MTase et parfois d'une analyse transcriptomique. Ces travaux permettent de cibler certains gènes candidats potentiellement sujets à la régulation par une méthylation dans la région promotrice du gène. Des études de ce genre ont commencé chez *Salmonella* où un mutant Dam a été montré comme avirulent chez la souris (Garcia-Del Portillo et al., 1999 ;

Tableau 6 : Exemples de gènes dont la régulation de la transcription est sous contrôle de la méthylation d'adénines (Casadesús, 2016).

Species	Locus	Methylation-sensitive protein or protein complex	Active state of the promoter or the regulatory region	Function
<i>E. coli</i>	<i>tnp(IS10)</i>	RNA polymerase	Hemimethylated	Transposition
<i>S. enterica</i>	<i>traJ</i>	Lrp	Hemimethylated	Plasmid transfer
<i>E. coli</i>	<i>dnaA</i>	SeqA	Methylated	DNA replication
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>ctrA</i>	GcrA	Hemimethylated	Cell cycle control
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>ftsZ</i>	Unknown	Methylated Hemimethylated	Cell division
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>nipZ</i>	Unknown	Methylated	Cell division
<i>E. coli</i>	<i>pxpBA</i>	Lrp	Methylation pattern	Fimbriae
<i>E. coli</i>	<i>agn43</i>	OxyR	Methylated	Adhesion
<i>S. enterica</i>	<i>std</i>	HdfR	Nonmethylated	Fimbriae
<i>E. coli</i>	<i>sciH</i>	Fur	Nonmethylated	Type VI secretion
<i>S. enterica</i>	<i>gtr</i>	OxyR	Methylation pattern	Lipopolysaccharide modification
<i>S. enterica</i>	<i>opvAB</i>	OxyR	Methylation pattern	Lipopolysaccharide modification

Heithoff et al., 1999). Une diminution de la virulence a aussi été démontrée chez les bactéries mutées pour le gène *dam* chez *Haemophilus influenzae* (Watson et al., 2004), *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 et *pestis* (Taylor et al., 2005 ; Robinson et al., 2005), *Klebsiella* (Mehling et al., 2007) et *Actinobacillus* (Wu et al., 2006). Il est intéressant de noter que chez certaines bactéries cette mutation est létale comme chez *Y. pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae* ou encore *Aeromonas hydrophila* (Julio et al., 2001 ; Erova et al., 2006 ; Demarre and Chatteraj, 2010). Dans ce cas, l'alternative de la surexpression de la MTase Dam a permis de démontrer une baisse du pouvoir pathogène (Julio et al., 2001 ; Julio et al., 2002 ; Erova et al., 2006). Il est à noter que la surexpression de Dam chez *Salmonella* ou *Pasteurella multocida* amène aussi à une baisse de la virulence de ces bactéries (Heithoff et al., 1999 ; Chen et al., 2003). Dam joue un rôle majeur dans les systèmes MMR (Voir partie 7.1 pour détails) ce qui amène à penser que c'est le taux d'erreurs dans la réparation de l'ADN qui augmente et donc que ces phénotypes sont causés par des mutations et non directement par la méthylation de l'ADN. En effet, chez *Salmonella* (Torreblanca and Casadesús, 1996) ou *E. coli* (Marinus, 2010) le taux de mutations augmente lorsqu'on mute le gène *dam* ou qu'on surexprime cette protéine. Cependant, les études de transcriptomique (RNAseq) montrent une variation dans l'expression de plusieurs gènes liés à la virulence chez *Salmonella* ce qui confirme l'hypothèse d'une régulation par la méthylation de l'ADN et non une régulation due à l'augmentation du taux de mutations (Balbontín et al., 2006). Un autre moyen de vérification est celui de la complémentation (transformation d'une bactérie mutée sur *dam* avec un plasmide contenant le gène *dam* natif). Si la méthylation de l'ADN est réellement à l'origine du changement d'expression du gène, en rétablissant le profil de méthylation originel par une complémentation on rétablira aussi le phénotype. A l'inverse, si le phénotype est lié à une mutation il restera malgré la complémentation. Ce protocole a par exemple été utilisé chez les *E. coli* uropathogènes (Stephenson and Brown, 2016).

Si les études présentées précédemment ont pour but d'étudier l'impact global de la méthylation par Dam sur les phénotypes des bactéries, certaines études plus mécanistiques ont permis l'explication du phénomène de régulation (Tableau 6 (Casadesús, 2016 pour détail)) comme pour l'opéron *pap*, le système de sécrétion de type VI (SST VI) chez *E. coli* et l'opéron *opvAB* chez *Salmonella* détaillés ci-dessous.

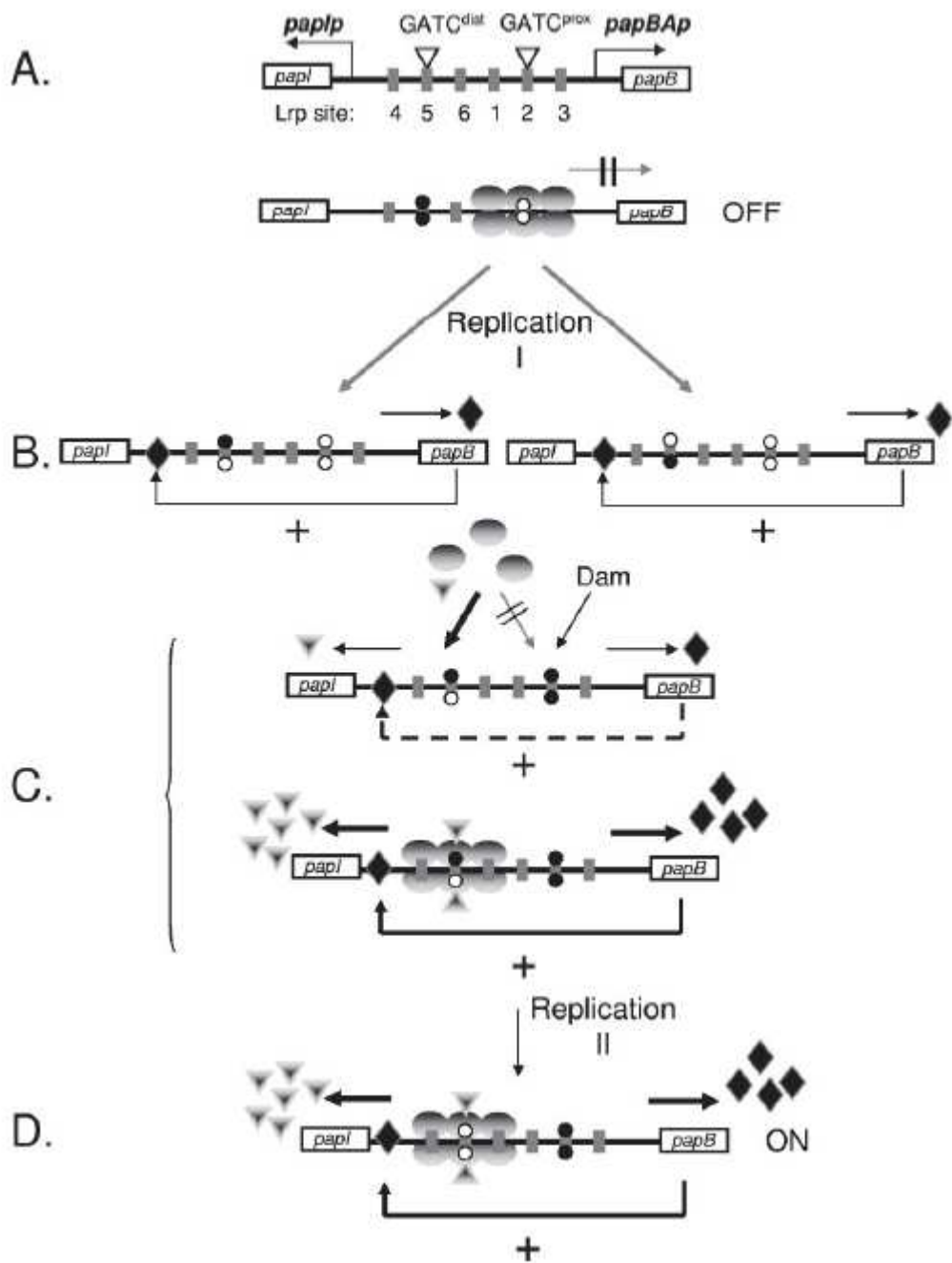


Figure 15 : Switch de l'opéron *pap* de OFF vers ON (Casadesús and Low, 2006)

La région régulatrice de *pap* avec les six sites de liaison de Lrp (rectangles gris) et les sites GATC proximaux et distaux dans les sites de liaison Lrp 2 et 5 respectivement est représentée en haut. Les promoteurs divergents *papI* et *papB* sont signalés avec des flèches. Les protéines Lrp (ovales), PapI (triangles) et PapB (losanges) sont représentées. L'état de méthylation des sites GATC est représenté par un rond blanc si non méthylyé et par un rond noir si méthylyé.

7.2 L'opéron *pap* chez *E. coli*

Chez les *E. coli* uropathogènes, le pilus Pap est un facteur de virulence très important puisqu'il permet l'adhésion à l'urètre (O'Hanley et al., 1985 ; Hultgren and Normak, 1991). Ce pilus est codé par l'opéron *pap* composé de 9 gènes impliqués dans la fabrication et l'assemblage de ce pilus et deux gènes codant pour des régulateurs nommés PapB et PapI (Van der Woude et al., 1996). L'expression des gènes *papBA* et *papI* sont sous contrôle d'une compétition entre le régulateur Lrp et la MTase Dam (Blyn et al., 1990 ; Braaten et al., 1994). Dans une population d'*E. coli* uropathogène, deux sous-populations sont retrouvées, l'une exprimant le pilus Pap (Pap^{ON}) et l'autre ne l'exprimant pas (Pap^{OFF}). Il est à noter que la population Pap^{OFF} est majoritairement retrouvée car le switch ON vers OFF est favorisé par rapport au switch OFF vers ON (Van der Woude et al., 1996 ; Herdnay et al., 2002). On trouve dans la région promotrice de *papBA* 6 sites de liaison du régulateur Lrp (pour « Leucine responsive regulatory protein »). Deux de ces sites (numérotés 2 et 5) contiennent un motif GATC, eux-mêmes nommés respectivement site proximal et site distal (Fig. 15A). Dans la population Pap^{OFF} le régulateur Lrp est lié à la partie promotrice au niveau des sites 1, 2 et 3 alors que les sites 4, 5 et 6 sont libres. Dans ce cas là, le site GATC proximal (chevauchant le site Lrp 2) est non méthylé, à l'inverse le site distal est complètement méthylé (Fig. 15B). Il est à noter que la fixation de Lrp aux sites 1-3 diminue son affinité pour les sites 4-6 ce qui crée une maintenance de l'état OFF (Herdnay et al., 2002 ; Herdnay et al., 2003). Lors de la réplication de l'ADN les protéines Lrp sont détachées et le brin d'ADN néosynthétisé n'est pas méthylé (Fig. 15C). Il apparaît que la protéine PapI semble être exprimée faiblement (bruit de fond) (Casadesús, 2016). Ceci pourrait être expliqué par la possibilité d'une légère expression du gène *papB* lors de la séparation de Lrp. En effet, PapB active la transcription de *papI* codant pour la protéine PapI. Cette protéine va se lier à Lrp et améliorer son affinité pour le site GATC distal (Kaltenbach et al., 1995). Suite à cela Lrp pourra se lier aux sites 4, 5 et 6 bloquant la méthylation par Dam qui méthylera alors le site GATC proximal (Fig. 15D). Dans cette configuration le gène *papB* est traduit et on a donc une boucle de rétroaction positive favorisant le maintien de cette expression puisque PapB et ainsi PapI sont produits. Suite à une nouvelle réplication de l'ADN chromosomique, le brin néosynthétisé sera à nouveau non méthylé et on retrouvera un profil de méthylation de l'ADN inversé avec le site GATC distal non méthylé et le site proximal complètement méthylé

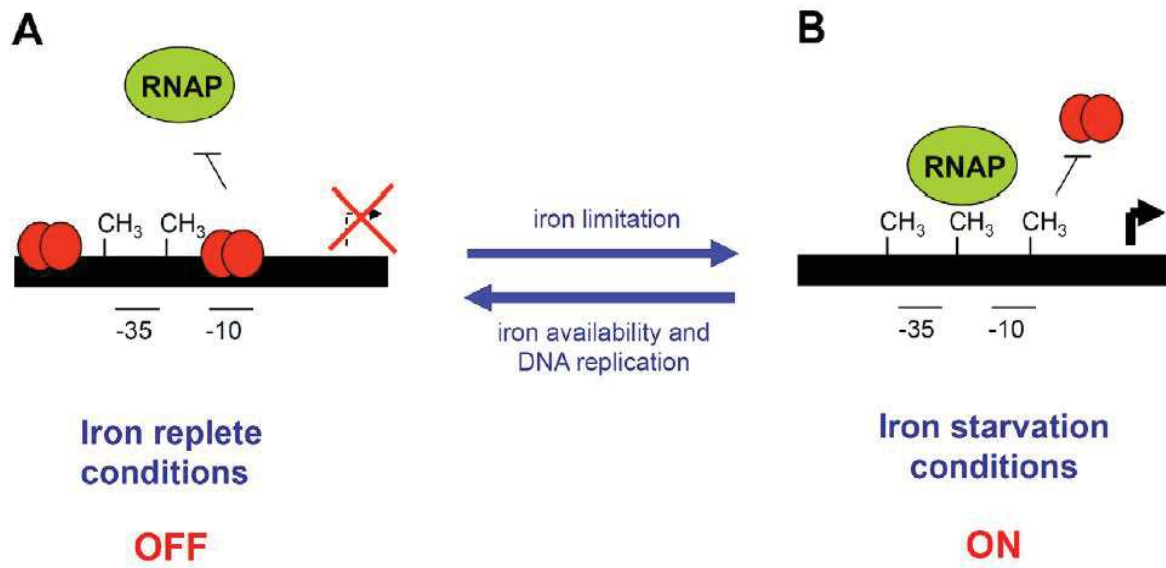


Figure 16 : Représentation de la régulation du cluster *sci1* (Brunet et al., 2011).

- A- En condition où le fer ne manque pas, la protéine Fur (ronds rouges) réprime l'expression du cluster *sci1* en se liant à ses sites de fixation dans la région promotrice. *sci1* est en phase OFF et le site GATC I n'est pas méthylé car il est masqué par Fur.
- B- En condition où le fer manque, Fur n'est pas liée à ses sites de fixation et l'ARN polymérase peut réaliser la transcription de *sci1*. Dam va de plus méthyle le site GATC I qui était protégé par Fur. *sci1* est en phase ON. La transition de phase ON vers OFF nécessite un manque de fer dans le milieu ainsi qu'un cycle de réplication pour que le site GATC I soit hémiméthylé. Les sites GATC méthylés sont indiqués par un CH₃.

(Fig. 15D) (Casadesús and Low, 2006). Si le switch Pap^{OFF} vers Pap^{ON} est bien compris, il n'en est pas de même pour le switch inverse. Suite à un nouveau cycle de réplication on se retrouve avec un site GATC proximal hémiméthylé et un site GATC distal non méthylé. La protéine Lrp a une affinité plus forte pour les sites 1-3 et la méthylation sur le site GATC proximal ne modifie pas l'affinité de Lrp pour ce site (Herdnay et al., 2003). A l'inverse la méthylation complète du site GATC distal par Dam diminuera l'affinité de Lrp lié ou non à PapI (Nou et al., 1993). Le switch ON vers OFF est donc dans ce cas plus important que le switch OFF vers ON (Herdnay et al., 2003 ; Casadesús and Low, 2006 ; Wion and Casadesús, 2006 ; Casadesús, 2016).

7.3 Le SST de type VI chez *E. coli*

Les systèmes de sécrétion de type VI (SST VI) sont présents chez de nombreuses bactéries Gram-, ils ont pour rôle de sécréter des molécules en vue de tuer les cellules de l'hôte mais aussi d'autres bactéries (Cascales, 2008 ; Schwarz et al., 2010). Chez *E. coli*, le cluster *sci1* code pour un SST VI. Ce cluster est sous contrôle de la protéine régulatrice Fur (Escolar et al., 1999). Il a été décrit que la région promotrice de *sci1* contenait 3 sites GATC et que leur méthylation interférait avec la fixation de la protéine régulatrice Fur (Brunet et al., 2011). Plus précisément, la région promotrice de *sci1* contient 2 sites reconnus par la protéine Fur, dont un contenant un site GATC (GATC1) (Fig. 16 (Brunet et al., 2011)). Les deux autres sites GATC sont situés entre le premier et le second site de reconnaissance. Lorsque du fer est présent dans le milieu (condition non stressante), la protéine Fur est liée sur les deux sites qu'elle reconnaît et empêche donc la méthylation du site GATC 1. L'hypothèse formulée se base sur le fait que Fur a une moins bonne affinité pour la région promotrice complètement méthylés (en utilisant des tests d'interaction *in vitro*). Si les conditions changent et que le fer commence à manquer, l'affinité de Fur pour son site de liaison diminue et le site GATC1 deviendra méthylé, permettant la liaison de l'ARN polymérase et l'expression du SST VI (Brunet et al., 2011).

7.4 Le LPS chez *S. enterica*

Chez *S. enterica*, la longueur de l'antigène O est variable. Il a été montré que dans une culture de bactéries, on retrouve deux sous populations, une avec une chaîne courte et une

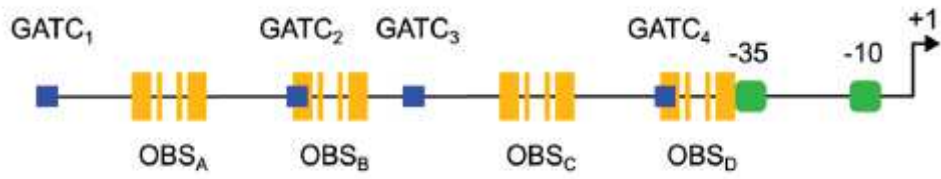


Figure 17 : Représentation de la région promotrice d'*opvAB* avec les sites GATC (bleu) et les sites de liaison d'OxyR (OBS, jaune) représentés (Cota et al., 2016).

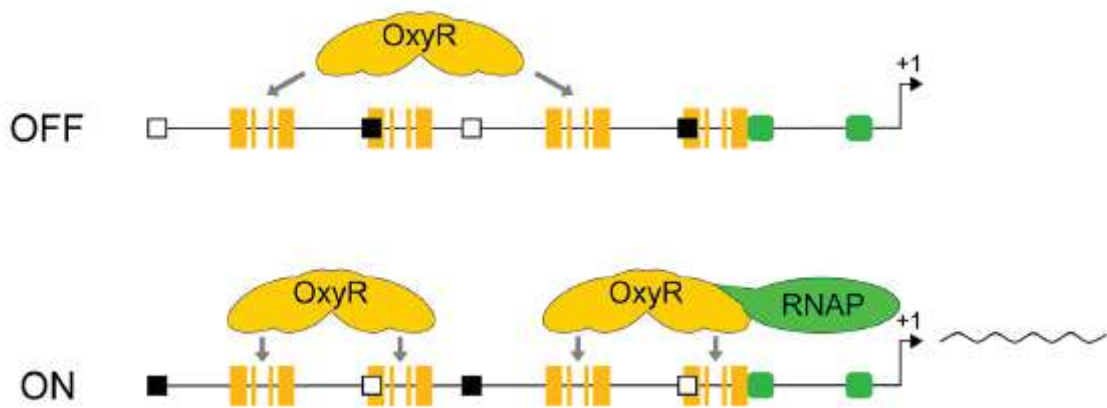


Figure 18 : Modèle de la variation de phase d'*opvAB* (Cota et al., 2016).

L'état de méthylation est représenté pour les sites GATC de la région promotrice par un carré blanc (non méthylé) ou un carré noir (méthylé) en phase OFF et en phase ON.

avec une chaîne plus longue (Cota et al., 2012). Les gènes responsables de cette variation ont été nommés *opvAB* et démontrés comme régulés dans leur expression par un switch dans lequel intervient le régulateur OxyR et la MTase Dam (Cota et al., 2012). Dans la sous-population à chaîne courte, l'opéron *opvAB* est OFF et à l'inverse lorsque la chaîne latérale O est plus longue, l'opéron est exprimé (Cota et al., 2012). La réduction de la chaîne O va conférer à *Salmonella* une résistance aux bactériophages mais aussi une sensibilité au sérum, une diminution de la capacité à se multiplier dans les macrophages et une baisse de pathogénicité chez la souris (Cota et al., 2012 ; Cota et al., 2015). Dans la région promotrice de *opvAB* on trouve 4 sites de fixation de OxyR et 4 sites GATC reconnus par Dam (Fig. 17, Cota et al., 2016). Selon les sites sur lesquels OxyR se fixe, il y a expression ou non de l'opéron. OxyR est une protéine régulatrice sensible au stress oxydatif auquel elle réagit par un changement de configuration. En présence d'H₂O₂ OxyR va faciliter la liaison de l'ARN polymérase et donc activer la transcription alors qu'à l'inverse sous sa forme non oxydée cette protéine va agir en tant qu'inhibiteur transcriptionnel (Chiang and Schellhorn, 2012). OxyR est de plus décrit comme sensible à la méthylation puisqu'il se lie avec moins d'affinité lorsqu'un site GATC méthylé est présent dans la séquence qu'il reconnaît. Ce régulateur a été décrit comme inhibiteur dans le cas d'*agn43* chez *E. coli* (Haagmans and Van der Woude, 2000) et à la fois inhibiteur et activateur pour *gtr* chez *Salmonella* (Broadbent et al., 2010). Le mécanisme de régulation est le suivant, Les sites GATC sont numérotés de 1 (5' du promoteur) à 4 (3' du promoteur) et de A à D pour les sites de fixation d'OxyR (OBS pour *OxyR Binding Site*) (Fig. 17, Cota et al., 2016). Lorsque l'opéron est OFF, OxyR est lié aux sites OBS A et C, les sites GATC 1 et 3 sont non méthylés et à l'inverse les sites GATC 2 et 4 (respectivement situés dans les OBS B et D) sont eux méthylés. A l'inverse, lorsque les sites GATC 2 et 4 ne sont pas méthylés, OxyR peut se lier aux OBS B et D, la liaison de l'ARN polymérase est alors possible et l'opéron passe en phase ON (Fig. 18, Cota et al., 2016). D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de ce switch comme la protéine SeqA ou la protéine « Histone like » HU (pour « Heat Unstable ») mais je ne détaillerai pas cela ici (voir Cota et al., 2016 pour détail).

8) Objectifs de la thèse

Suite à la lecture de ces publications, nous nous sommes interrogés sur plusieurs points concernant notre modèle biologique. La méthylation de l'ADN par Dam joue un rôle important dans de nombreux phénotypes chez diverses bactéries pathogènes. Notre

bactérie alterne entre virulence et symbiose avec ses deux hôtes eucaryotes. A notre connaissance, aucune étude n'a étudié l'impact de la méthylation de l'ADN dans un cycle similaire. En se basant sur l'hypothèse que *Photorhabdus* produisait une MTase Dam nous avons donc premièrement voulu étudier son potentiel rôle dans le cycle de vie de *Photorhabdus*. Pour répondre à cette question, il nous fallait modifier l'expression de cette MTase (par mutation ou surexpression du gène). L'étude des variations phénotypiques de cette souche pourrait nous fournir des pistes de gènes sujets à la régulation par la méthylation de l'ADN. La vérification de cette hypothèse nécessitait l'appui d'une étude transcriptomique (RNAseq) qui permettrait de voir la globalité des gènes dont l'expression changerait sans nécessairement être associé à des phénotypes facilement observables. Afin d'étudier l'impact de la méthylation sur le cycle de notre modèle, il fallait aussi que nous testions la pathogénicité ainsi que la capacité à établir une symbiose de cette souche. L'ensemble de ces travaux a été réalisé durant cette thèse et a permis d'établir un bon état des lieux du rôle de la méthylation par Dam chez notre modèle (Chapitre II]). Dans un second temps, bien que la modification de l'expression de Dam soit connue pour jouer un rôle sur la méthylation des sites GATC nous nous devons de vérifier par nous même l'état de méthylation des sites GATC chez notre bactérie et de déterminer si cet état général variait lors d'une expression différente de Dam. Nous avons donc réalisé une analyse du méthylome (Chapitre III]). Pour comprendre notre modèle bactérien et le rôle de la méthylation de l'ADN chez *Photorhabdus*, nous avons aussi décidé de réaliser la même étude dans différentes phases de croissance ainsi que dans la sous-population résistante aux peptides antimicrobiens. L'intérêt était de chercher des conditions où une variation dans la méthylation de l'ADN (que ce soit par Dam ou tout autre méthyltransférase) pourrait être observée. Cette étude pouvait aussi nous donner des pistes sur d'autres MTases importantes chez notre bactérie modèle et a composé la seconde partie de ma thèse. Les perspectives consécutives à ma thèse seront discutées dans une dernière partie où je mettrai aussi en parallèle l'ensemble des résultats obtenus publiés ou non (Chapitre IV]).

Chapitre II] Rôles de Dam dans le cycle de *P. luminescens*

1) La virulence et la mobilité de *P. luminescens* sont impactées par la surexpression de Dam

Comme décrit précédemment, le premier point à vérifier était qu'un gène codant pour la MTase Dam était bien présent chez *Photobacterium luminescens* et que la protéine produite était fonctionnelle. Grâce au génome publié en 2003 (Duchaud et al., 2003), nous avons pu identifier le gène *plu0087* annoté comme « DNA Adenine Methyltransferase ». Ce gène a 70,7% d'identité et 86,3% de similarité avec le gène *dam* d'*E. coli*. Après alignements des séquences protéiques, nous avons pu voir que les acides aminés essentiels à la reconnaissance des sites GATC, ceux interagissant avec le donneur de méthyle (S-AdoMet) ainsi que ceux formant la poche active de méthylation (DPPY) étaient bien conservés (Fig. S1, Cf. Chapitre II.2 pour toutes les figures et tables de cette partie). Dans un deuxième temps, nous avons cloné le gène *dam* de *P. luminescens* dans un plasmide en le positionnant sous contrôle d'un promoteur fort (P_{Lac}). Ce plasmide (MCS5_Dam) et un plasmide contrôle (MCS5 ne contenant pas le gène *dam* de *P. luminescens*) ont ensuite été transformés chez une souche d'*E. coli* mutée pour le gène *dam* (Dam::16KM) et une souche contrôle non mutée sur *dam* (MG1655). Après extraction de l'ADN plasmidique, nous avons digéré les plasmides provenant de chaque souche avec des enzymes sensibles à la méthylation. La complémentation de cette souche par le plasmide MCS5_Dam a montré un profil de digestion identique au contrôle, prouvant que la méthylation des sites GATC était rétablie par la présence du gène *dam* provenant de *Photobacterium* et prouvant ainsi que ce gène codait pour une MTase Dam fonctionnelle (Fig. 1).

L'objectif suivant était de voir si Dam avait un rôle dans la régulation de certains phénotypes chez *Photobacterium*. Malgré plusieurs essais, en adaptant le protocole et en utilisant notamment des températures plus basses et des milieux pauvres en nous basant sur les résultats obtenus chez *C. crescentus* (Gonzalez and Collier, 2015), nous n'avons pas réussi à muter le gène *dam* de *Photobacterium* amenant l'hypothèse que *Photobacterium* n'est peut-être pas viable sans ce gène. La seconde solution a été de surexprimer ce gène *dam* en introduisant le plasmide MCS5_Dam chez *Photobacterium*. Après vérification par RT-qPCR de l'augmentation de la transcription du gène *dam* chez cette souche (x23), nous avons vérifié divers phénotypes classiques chez cette bactérie. Aucune différence de croissance n'a été

observée entre la souche surexprimant Dam (Dam+) et la souche contrôle contenant le plasmide MCS5 (Fig. 2). Nous avons ensuite testé l'adsorption du bleu de bromothymol sur milieu NBTA, la bioluminescence, la production d'antibiotiques, l'activité hémolytique ainsi que la lyse des lipides sans observer aucune différence. Aucune différence dans le taux de mutation n'a été notée entre les deux souches en utilisant un test classique de sélection de mutants spontanés résistants à la rifampicine (Table 2). A l'inverse, une diminution de la mobilité a été observée pour la souche Dam+ en comparaison de son contrôle (Fig.3, p-value<0,001). Une baisse du pouvoir pathogène a aussi été notée lors de suivi de mortalité de larves de *S. littoralis* injectées avec ces souches (Fig. 5, p-value<0,001). A l'inverse, la souche Dam+ a montré une meilleure capacité à former des biofilms que la souche contrôle (Fig. 4, p-value<0,01).

À la suite de ces résultats intéressants, nous avons décidé d'étudier le profil transcriptomique de ces deux souches. Le but était de vérifier si des gènes jouant un rôle dans la mobilité, la virulence et la formation de biofilms étaient différemment exprimés entre ces deux souches, mais aussi de voir si d'autres gènes n'étaient pas impactés dans leur transcription par la surexpression de Dam. Nous avons donc réalisé une expérience de RNAseq pour chaque souche et trouvé 208 gènes significativement différentiellement exprimés entre ces deux souches ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$ et P-value ajustée < 0.05) (Fig. 6). Parmi ces gènes, 121 sont sous-exprimés et 87 sont surexprimés chez la souche Dam+. En les classant par fonction (COG pour « Cluster of Orthologous Groups ») nous avons pu noter une grande quantité de gènes différemment exprimés dans la catégorie reliée à la mobilité cellulaire (N). 49 gènes sont impliqués dans la mobilité flagellaire chez *Photobacterium* et 48 présentent une expression plus faible chez la souche Dam+ même si leur expression n'est pas toujours significativement impactée (Table S3). Un autre point intéressant est que 16 gènes codant pour des pili (et donc potentiellement impliqués dans la formation de biofilms) sont surexprimés chez la souche Dam+. Si la variation de mobilité et de formation de biofilms semble être corrélée à la transcription des gènes impliqués dans ces phénotypes, nous ne pouvons affirmer la même chose pour la pathogénicité. En effet, seul cinq gènes précédemment reliés à la pathogénicité de la bactérie ont été détectés comme différemment exprimés chez la souche Dam+ et les principaux gènes effecteurs décrits chez *Photobacterium* n'en font pas partis.

Des contrôles réalisés par RT-qPCR sur un panel de gènes représentatifs nous ont permis de confirmer l'ensemble de ces observations.

Grâce à ces travaux, nous avons donc prouvé la fonctionnalité d'une MTase Dam chez *P. luminescens* mais aussi prouvé qu'elle était reliée à l'expression de certains phénotypes. Dans la littérature, il a déjà été décrit un lien entre Dam et la mobilité comme chez *Salmonella* (Balbontin et al., 2006), *E. coli* (Oshima et al., 2002) ou encore *Y. enterocolitica* (Fälker et al., 2007). Notre résultat montrant qu'une surexpression de Dam amenait une diminution de mobilité n'était donc pas inattendu, mais une analyse plus détaillée nous montre qu'aucun site GATC n'est présent dans les régions promotrices du gène *flhD* (gène régulateur de la cascade de synthèse flagellaire) malgré la baisse de son expression. Une hypothèse possible est celle d'une régulation indirecte de ce gène et donc des autres gènes flagellaires par Dam. Un autre point intéressant est la baisse de virulence chez la souche Dam⁺⁺. Les phénotypes de virulence et de mobilité sont reliés chez plusieurs bactéries pathogènes (Josenhans and Suerbaum, 2002). Chez *Photobacterium*, des mutants non mobiles ont été montrés comme tout aussi virulents que la bactérie WT même si leur compétitivité dans le cadavre était diminuée (Easom and Clarke, 2008). Nos résultats montrent que Dam joue un rôle dans ces deux phénotypes, il est donc possible que des relations à ce jour non étudiées existent entre eux, mais il est tout aussi possible que Dam intervienne indépendamment dans la régulation de ces deux mécanismes. Un point important à noter est que notre étude n'a pas permis de déterminer quels étaient les gènes directement impliqués dans la baisse de virulence observée. L'hypothèse d'une protéine, dont l'expression serait sous contrôle de la méthylation par Dam, régulant à la fois la synthèse flagellaire et l'expression de divers facteurs de virulence reste donc tout à fait possible. Un dernier point est l'implication de Dam dans la formation de biofilms. Comme pour la mobilité, Dam a déjà été décrite comme importante dans la formation de biofilms chez *Salmonella* (Aya Castadeña et al., 2015) et impliquée dans la régulation de gènes codant pour des pili comme *pap* chez *E. coli* (Blyn et al., 1990) ou *std* chez *Salmonella* (López-Garrido and Casadesús, 2012). Chez *Photobacterium*, il existe 11 clusters codant pour des pili potentiels (Duchaud et al., 2003). Lors de la surexpression de Dam on peut noter que deux pili semblent particulièrement touchés (Table S2) à savoir Mad et Mrf.

Le pilus Mad est décrit chez *Photorhabdus* comme impliqué dans l'établissement de la symbiose avec le nématode. Le pilus Mrf lui est proche du pilus Pap d'*E. coli* et est finement régulé lors de l'infection chez l'insecte par *Photorhabdus temperata* (Meslet-Cladière et al., 2004) mais son rôle n'est toujours pas décrit chez *Photorhabdus luminescens*. Comme pour la mobilité nous n'avons pas pu déterminer de lien direct entre l'expression de ces pili et un différentiel de méthylation au niveau de sites GATC dans la partie promotrice de ces gènes.

Cette étude a donc permis de montrer un rôle important du niveau d'expression de Dam dans l'expression des phénotypes de mobilité, de virulence et de formation de biofilms. Il aurait été très intéressant de pouvoir comparer les phénotypes liés à la surexpression de Dam à ceux potentiellement présent chez un mutant *dam* mais malgré de nombreux essais cette expérience n'a pas abouti. Le fait que nous n'ayons pas trouvé de sites GATC dans les parties promotrices des gènes différemment exprimés dans la souche surexprimant Dam nous a étonné mais deux résultats ont guidé la suite de cette thèse. Le premier est le nombre de gènes différemment exprimés entre la souche Dam+ et son contrôle. Ceci sous-entend une grande importance de Dam dans l'expression de nombreux gènes. Nous ne pouvions pas étudier chaque gène indépendamment pour vérifier la présence de sites GATC et n'ayant de toute façon pas la possibilité de savoir leur état de méthylation, nous avons décidé de réaliser une étude à l'échelle du génome de l'état de méthylation des sites GATC (Cf. Article 3). Le deuxième point a été celui de l'augmentation dans la formation de biofilms. L'expression des pili chez *Photorhabdus* est reliée à la pathogénicité et à la symbiose avec le nématode. Nous nous sommes donc posé la question de l'importance de la MTase Dam pour la relation symbiotique avec le nématode *Heterorhabditis* (Cf. Chapitre II.3).

2) Article 1 ; Frontiers in Microbiology :

***DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression
Impairs Photorhabdus luminescens Motility and Virulence***



DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression Impairs *Photorhabdus luminescens* Motility and Virulence

Amaury Payelleville¹, Anne Lanois¹, Marie Gislard², Emeric Dubois², David Roche³, Stéphane Cruveiller³, Alain Givaudan¹ and Julien Brillard^{1*}

¹ Diversité, Génomes Interactions Microorganismes Insectes (DGIMI), Institut National De La Recherche Agronomique, Université de Montpellier, Montpellier, France, ² MGX-Montpellier GenomiX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France, ³ Le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Genoscope, Université d'Evry, Centre National De La Recherche Scientifique-UMR8030, Université Paris-Saclay, Evry, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Sauer,
University of Natural Resources and
Life Sciences, Vienna, Austria

Reviewed by:

Louis S. Tisa,
University of New Hampshire,
United States
Pablo Ivan Nikel,
The Novo Nordisk Foundation Center
for Biosustainability (DTU Biosustain),
Denmark

Marjan Van Der Woude,
University of York, United Kingdom

*Correspondence:

Julien Brillard
julien.brillard@umontpellier.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 24 May 2017

Accepted: 17 August 2017

Published: 01 September 2017

Citation:

Payelleville A, Lanois A, Gislard M,
Dubois E, Roche D, Cruveiller S,
Givaudan A and Brillard J (2017) DNA
Adenine Methyltransferase (Dam)
Overexpression Impairs *Photorhabdus*
luminescens Motility and Virulence.
Front. Microbiol. 8:1671.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01671

Dam, the most described bacterial DNA-methyltransferase, is widespread in gamma-proteobacteria. Dam DNA methylation can play a role in various genes expression and is involved in pathogenicity of several bacterial species. The purpose of this study was to determine the role played by the *dam* ortholog identified in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Complementation assays of an *Escherichia coli dam* mutant showed the restoration of the DNA methylation state of the parental strain. Overexpression of *dam* in *P. luminescens* did not impair growth ability *in vitro*. In contrast, compared to a control strain harboring an empty plasmid, a significant decrease in motility was observed in the *dam*-overexpressing strain. A transcriptome analysis revealed the differential expression of 208 genes between the two strains. In particular, the downregulation of flagellar genes was observed in the *dam*-overexpressing strain. In the closely related bacterium *Xenorhabdus nematophila*, *dam* overexpression also impaired motility. In addition, the *dam*-overexpressing *P. luminescens* strain showed a delayed virulence compared to that of the control strain after injection in larvae of the lepidopteran *Spodoptera littoralis*. These results reveal that Dam plays a major role during *P. luminescens* insect infection.

Keywords: entomopathogenic bacterium, MTase, insect, pathogenicity, flagellar genes, RNA-seq

INTRODUCTION

Enterobacteria of the genus *Photorhabdus* are highly pathogenic to insects and are also symbiotically associated to nematodes of the family *Heterorhabditidae*. After invasion of the insect host by the nematodes, bacteria are released into the hemocoel of the insect prey where they multiply until septicemia occurs, employing a broad range of virulence factors that kill the insect. The bacterial symbionts contribute to maintain suitable conditions for nematode reproduction. During the final stages of development, the bacteria and the nematode reassociate and subsequently leave the insect carcass in search of a new insect host (Nielsen-LeRoux et al., 2012). As described for many other microbial pathogens, which constantly alternate between their host and the compartment they disperse in Avery (2006), *Photorhabdus* displays phenotypic heterogeneity (Boemare and Akhurst, 1988; Somvanshi et al., 2012). Such phenomena provide

diverse phenotypes within a bacterial population, which increases the adaptive potential to rapidly changing environmental conditions (Avery, 2006; Grimbergen et al., 2015). For instance, the production of the *Photobacterium luminescens* Mad (Maternal adhesion) pilus is controlled by a reversible DNA switch of the promoter of the *mad* operon (Somvanshi et al., 2012). Two forms can co-exist depending on the promoter orientation: the bacteria are in a M-form (for mutualist) when the Mad pilus is produced, because it allows the colonization of the nematode. When the Mad pilus is not produced, the bacteria are in P-form (for pathogenic). In addition, it has been recently demonstrated that the virulence strategy of *P. luminescens* involves the generation of a bacterial subpopulation which causes septicemia in insects by displaying resistance to cationic antimicrobial peptides (Mouammine et al., 2017). Other mechanisms of phenotypic heterogeneity within clonal bacterial cultures exist, such as bistability (Veening et al., 2008). Phenotypic heterogeneity involving a positive-feedback loop regulation of a transcriptional regulator has been reported in the closely related genus *Xenorhabdus*, where it controls the expression of motility and virulence determinants (Jubelin et al., 2013). DNA methylation is another process that has also been described as responsible for bacterial phenotypic heterogeneity (Casadesus and Low, 2013), but this has not been investigated in *Photobacterium*.

Numerous DNA methyltransferases (MTases) are a component of restriction-modification (RE) systems that protect the bacterial cell from invasion by bacteriophages DNA (Marinus and Løbner-Olesen, 2014). Other MTases are not linked to restriction endonuclease and are classified as “orphan” MTases (Casadesus, 2016). The best characterized orphan MTase in bacteria is Dam (DNA adenine methyltransferase), originally identified in *Escherichia coli* and widespread among gamma-proteobacteria (Løbner-Olesen et al., 2005). Dam MTase transfers a methyl group to an adenosine localized in sites 5'-GATC-3' of the DNA. After DNA replication, the newly synthesized DNA strand is unmethylated and the GATC sites are therefore transiently hemimethylated (Wion and Casadesus, 2006; Marinus and Casadesus, 2009) until the action of a Dam protein. The Dam enzyme has key roles in bacterial genome maintenance, and *E. coli dam* mutants have defects in many important physiological processes such as DNA replication initiation, chromosome partitioning, nucleoid structure, and mismatch repair (Løbner-Olesen et al., 2005).

Changes in DNA methylation can also alter the affinity of regulatory proteins to their target DNA binding sequences (Hale et al., 1994; Tavazoie and Church, 1998). Conversely, DNA-binding proteins can represent a hindrance to MTase for reaching specific DNA sequences, and therefore can inhibit DNA methylation. Both mechanisms may lead to alterations in gene expression. Thus, DNA-methylation can play major roles in transcriptional regulation, including genes involved in bacterial virulence (Heusipp et al., 2007). An illustrative example is the Pap (pyelonephritis-associated pili) pilus phase variation of uropathogenic *E. coli*. The *pap* operon transcription depends on the binding of the transcriptional repressor Lrp. Such binding depends on the methylation state (on several

GATC sites) of the *pap* promoter because of a better Lrp affinity for non-methylated DNA (Blyn et al., 1990; Braaten et al., 1994). The regulation of gene that mediates adhesion to uroepithelial cells is therefore governed by DNA methylation state. In *E. coli*, Dam regulates transcription of several other pili operons (van der Woude and Low, 1994), and expression of a major outer-membrane protein (Ag43) (Henderson and Owen, 1999).

In several bacterial species that possess a *dam* gene, Dam has been described as an important virulence gene regulator. Mutants of *Salmonella* Typhimurium lacking the Dam enzyme are avirulent in mice (Garcia-Del Portillo et al., 1999; Heithoff et al., 1999). The impact of Dam inactivation on bacterial virulence has also been reported in *Haemophilus influenzae* (Watson et al., 2004), *Klebsiella* (Mehling et al., 2007), *Actinobacillus* (Wu et al., 2006) and *Yersinia pestis* (Robinson et al., 2005). In *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, and *Aeromonas hydrophila*, inactivation of the *dam* gene was shown to be a lethal mutation (Julio et al., 2001; Erova et al., 2006b; Demarre and Chatteraj, 2010). However, plasmid-mediated overexpression of the *dam* gene in *Y. pseudotuberculosis* resulted in a virulence decrease in mice compared to wild-type (Julio et al., 2002) and in a defect in colonization of *V. cholerae* in a suckling mouse model compared to wild-type (Julio et al., 2001). Similarly, *dam*-overexpressing strains of *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, or *A. hydrophila* were also highly attenuated in mice (Heithoff et al., 1999; Chen et al., 2003; Erova et al., 2006b).

Phenotypes associated with an alteration of the DNA methylation state have mostly been described in mammalian pathogens, but have not yet been reported in an insect-pathogenic bacterium. The gene plu0087 of the *P. luminescens* TT01 genome is annotated “DNA adenine methylase (Deoxyadenosyl-methyltransferase)” (Duchaud et al., 2003) and displays 70.7% of identity and 86.3% of similarity with the *E. coli dam* gene. The purpose of this study was to determine the role of deregulating the *dam* orthologous gene found in *P. luminescens* TT01. In this work, we confirmed the N⁶-Adenine methyltransferase function of the *dam* gene product. Investigation of several phenotypes of a *P. luminescens dam*-overexpressing strain revealed a major role for Dam in motility as well as during virulence in the insect.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 1**. *E. coli*, *P. luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* cells were routinely grown in Luria broth (LB) medium with a 180 rpm agitation at 37 and 28°C, respectively. As required, antibiotic concentrations used for bacterial selection were gentamycin at 15 µg mL⁻¹, rifampicin at 100 µg mL⁻¹ and kanamycin at 20 µg mL⁻¹. IPTG was added at 0.2 mM when required.

In silico Analysis

Primer sequence was designed using the Primer3 software (Untergasser et al., 2012). The REBASE database (Roberts et al., 2015) was used to identify a putative Dam methyltransferase,

TABLE 1 | Strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant genotype and characteristics ^a	Reference or source
STRAINS		
<i>Photobacterium luminescens</i> TT01	Wild type	Duchaud et al., 2003
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15 Tn10 (Tetr)</i>]	Agilent Technologies
<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsI hsdS lacZ</i> Δ <i>M15 RP4-1360</i> Δ(<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341::[ferm pir (wt)]</i>	Paulick et al., 2009
<i>E. coli</i> MG1655	Wild type	Lobner-Olesen and von Freiesleben, 1996
<i>E. coli</i> <i>Dam::16KM</i>	MG1655 <i>dam16::Km^r</i>	Lobner-Olesen and von Freiesleben, 1996
<i>Xenorhabdus nematophila</i> F1	Wild type	Lanois et al., 2013
<i>Micrococcus luteus</i>	Wild type	Pasteur Institute Culture collection, Paris, France
PLASMIDS		
pBBR1MCS-5	Cloning vector, Gm ^r	Kovach et al., 1995
P _{tet} -MCS	Cloning vector, Km ^r	Jubelin et al., 2013
P _{tet} -MCS-Dam	853 pb PCR fragment (<i>dam</i> gene) inserted between KpnI and BamHI site of P _{tet} -MCS plasmid	This study
pBB-Dam	864 pb fragment (RBS and <i>dam</i> gene) isolated from P _{tet} -MCS-Dam and inserted between EcoRI and BamHI site of pBBR1MCS-5 plasmid	This study
pJQ200KS	Mobilizable vector, Gm ^r	Quandt and Hynes, 1993
pJQ-Δ <i>dam</i>	Region overlapping the <i>dam</i> gene disrupted by a Cm ^r cassette and inserted between PstI and XbaI site of pJQ200KS plasmid	This study

^aKm, kanamycin; Gm, gentamicin; Cm, chloramphenicol.

M.PluTDamP (REBASE Enzyme Number 7410), in the *P. luminescens* TT01 genome. Alignments between Dam from various organism were performed using the Multalin tool (Corpet et al., 1998).

Nucleic Acid Manipulations

The extraction of plasmid DNA from *E. coli* was performed using the GenElute™HP Plasmid® miniprep purification kit as recommended by the manufacturer (Sigma). Chromosomal DNA was extracted from bacterial cells using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used as recommended by the manufacturer (New England Biolabs and Promega, respectively). Oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) and are listed in Table S1. PCR was performed in a T100 thermal cycler (Biorad) using the iProof high-fidelity DNA polymerase (Biorad). Amplified DNA fragments were purified using a PCR purification kit (Roche) and separated on 0.7% agarose gels after digestion as previously described (Brillard and Lereclus, 2007). Digested DNA fragments were extracted from agarose gels with a centrifugal filter device (DNA gel extraction kit, Millipore, Molsheim, France). All constructions were confirmed by DNA sequencing (Eurofins Genomics).

Cloning the *P. luminescens dam* gene was performed as follows. The plu0087 gene was PCR amplified using two primers mapping immediately upstream and downstream (Cp-plu087-F and Cp-plu087-R, respectively, Table S1) the 804 bp ORF (open reading frame), using the following cycling conditions: 98°C, 10 s; 56°C, 30 s; 72°C, 30 s for 35 cycles. The 853 bp-long amplified DNA fragment was then digested according to

the endonuclease sites introduced in the primers (KpnI and BamHI). Because the *P. luminescens dam* gene has no clear ribosome binding site (RBS), the generated DNA fragment was first inserted immediately downstream of the RBS already present in the plasmid P_{tet}-MCS (Jubelin et al., 2013), to create the P_{tet}-MCS-Dam (Table 1). A 864 bp-long fragment corresponding to this insert together with the RBS was then isolated from the P_{tet}-MCS-Dam plasmid by EcoRI and BamHI endonucleases, and was inserted between the corresponding sites of the low-copy plasmid pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995) downstream of the P_{lac} promoter. The recombinant plasmid (pBB-dam) was introduced in *E. coli* strains by electroporation, or transferred in *P. luminescens* and *X. nematophila* by conjugative mating as previously described (Givaudan and Lanois, 2000). Transconjugants harboring the pBBR1MCS-5 empty plasmid were used as a control.

Attempts to construct a *dam* mutant were performed as follows. Briefly, DNA fragments of the plu0087 upstream (540 pb) and downstream (569 pb) regions were PCR-amplified using the primer pairs upF-plu0087/upR-plu0087 and dnF-plu0087/dnR-plu0087, respectively (Table S1). PCR products were digested with PstI/BamHI and BamHI/XbaI using the primer-incorporated restriction sites (Table S1). In parallel, the Ω interposon harboring a Cm^r cassette was digested with BamHI, as previously described (Brillard et al., 2002). The three digested DNA fragments were purified, ligated in PstI/XbaI-digested pJQ200KS (Table 1), and introduced by electroporation in *E. coli* XL1. The resulting pJQ-Δ*dam* plasmid was transferred in *P. luminescens* by conjugative mating. Four independent transconjugants clones were then subjected to allelic exchange

in LB at 28°C, following the protocol routinely used in the laboratory (Brillard et al., 2002; Derzelle et al., 2004b; Brugirard-Ricaud et al., 2005). Because several attempts were unsuccessful, the transconjugants were additionally subjected to allelic exchange in a M9 minimal medium instead of LB, or incubated at room temperature or at 15°C instead of 28°C.

DNA Methylation State Analysis in *E. coli* *dam* Mutant Expressing the *P. luminescens* *dam* Gene

The methylation state of GATC sites was assessed in an *E. coli* *dam* mutant strain Dam 16::KM (Lobner-Olesen and von Freiesleben, 1996) harboring pBB-Dam or the pBBR1MCS-5 empty plasmid, in order to determine the *P. luminescens* *dam* functionality in *E. coli*. These strains were grown in LB supplemented with gentamycin (to maintain the plasmid) and IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) to allow the activation of the P_{lac} promoter controlling the expression of the *dam* gene. Fifty nanogram of plasmid DNA extracted from these strains were then digested during 2 h at 37°C by MboI (which digests only non-methylated GATC sites) or DpnI (which digests only methylated GATC sites) and DNA digestions were analyzed after electrophoresis on a 1% agarose gel.

Phenotype Analysis of *P. luminescens*

Bromothymol blue adsorption was determined after growth on NBTA (nutrient agar supplemented with 25 mg of bromothymol blue and 40 mg of triphenyltetrazolium chloride per liter). It allows the identification of variant forms (Boemare and Akhurst, 1988). Antibiotic production was assessed by measuring antibacterial activity against *Micrococcus luteus* (Table 1). Hemolysis was determined by the observation of a clearing surrounding bacteria grown on standard sheep blood agar plates as previously described (Brillard et al., 2001). Bioluminescence production, lipase activity on Tween 20, 40, 60, 80, and 85 were also assessed as previously described (Boemare and Akhurst, 1988).

For motility assays, agar plates were prepared with LB broth supplemented with 0.35% agar and inoculated using 5 μL of cells grown in exponential phase ($OD_{540\text{ nm}} = 0.8$), as previously described (Givaudan et al., 1995). The diameter of the halo size of swimming motility was measured 24 h and 30 h after incubation. Data from 3 independent experiments (with 10 plates used in each condition) were analyzed using Wilcoxon test.

Growth of *P. luminescens* was monitored with a TECAN automated turbidimetric system (Infinite M200 TECAN®). Estimation of maximum specific growth rate (μ_{max}) was performed on 4 independent biological replicates for each strain, using serial dilution of the inoculum as previously described (Augustin et al., 1999).

The *P. luminescens* biofilm formation was determined as follows. Five milliliters of LB medium in glass tubes were inoculated at 10% with an overnight culture and incubated for 12 days at 28°C in static conditions. The tubes were then rinsed with PBS before the addition of 7 mL of Crystal violet solution at 0.01% (in PBS) to stain the biofilms during 15 min. Biofilms were rinsed with PBS and then dissolved 3 h in 7 mL ethanol. The

$OD_{570\text{ nm}}$ measurement allowed the quantification of the biofilm-associated crystal violet. Data from 3 independent experiments with replicates (totalizing 17 tubes for each strain) were analyzed using Wilcoxon test.

The *P. luminescens* spontaneous mutation rate was assessed by quantifying the emergence of rifampicin-resistant CFUs as follows. *P. luminescens* was grown overnight in 100 mL of LB medium supplemented with gentamycin (for plasmid maintenance) before plating on LB and LB with rifampicin. The mutation rate was calculated as the rifampicin-resistant population divided by the total population. Data from 3 independent experiments were compared using the Student *t*-test.

Plasmid Curing of *P. luminescens* Strains

Plasmid curing was performed as follows. For each *P. luminescens* transconjugant strain, a fresh colony was used to inoculate 5 mL LB and incubated overnight with shaking in the absence of antibiotic pressure. These cultures were used to inoculate 100 mL fresh LB at an $OD_{540\text{ nm}} = 0.05$, and incubated with shaking until $OD_{540\text{ nm}} = 0.8$ was reached. These cultures were then diluted and spread on LB agar-plates prior incubation until CFU were visible. For each strain, 50 CFU were then streaked on LB Gm and LB without antibiotic in parallel to check for the plasmid stability. The loss of the pBB-Dam plasmid, as well as that of the pBBR1MCS-5, was observed for all the 50 tested CFU. Four Gm^S clones from each strain were then tested for their motility ability after inoculation on low-agar plates as described above. Finally, one clone from each strain was tested for insect virulence.

Insect Virulence Assay

The virulence-related properties of *dam*-overexpression were assessed by comparing the killing effect of *P. luminescens* transconjugants harboring either the pBB-Dam or the pBBR1MCS-5 empty plasmid during infection in the common cutworm *Spodoptera littoralis* as previously described (Brillard et al., 2002). Four to five independent pathogenicity assays were performed for each bacterial strain. Briefly, 20 μL of exponentially growing bacteria ($DO_{540\text{ nm}} = 0.3$) diluted in LB, corresponding to about 1×10^4 CFU (1.4×10^4 , mean value of 4 experiments or 1.2×10^4 , mean value of 5 experiments, for *P. luminescens* harboring pBBR1MCS-5 or pBB-Dam, respectively), were injected into the hemolymph of 20 fifth-instar larvae of *S. littoralis* reared on an artificial diet. Insect larvae were then individually incubated at 23°C. Altogether, the survival rate of 80–100 larvae for each bacterial strain were analyzed. The CFU of bacteria were determined by plating dilutions on LB agar. Insect death was monitored over time for up to 60 h. The time for killing 50% of the insect larvae (LT_{50}) was calculated. Statistical analysis (Wilcoxon test) was performed as previously described (Givaudan and Lanois, 2000; Brillard et al., 2002) using SPSS version 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) to compare the mortality state.

RNA Preparation

Total RNA extraction was performed on cells harvested at $OD_{540\text{ nm}} = 0.5$, from nine independent cultures for each strain, using RNeasy miniprep Kit (Qiagen), according to the

manufacturer's instructions. An additional incubation step with DNase I (Qiagen) was performed. The quantity and quality of RNA were assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip kit. Lack of DNA contamination was controlled by carrying out a PCR on each RNA preparation.

RNA Sequencing

The RNA-sequencing was performed as previously described (Mouammine et al., 2017) with the following changes. Equal amounts of total RNA from three independent samples per strain were pooled together to generate one final biological RNA sample per strain. Thus, from the initial nine independent RNA samples per strain, three final RNA samples were generated for each strain and subsequently treated as follows prior sequencing. Ribo-Zero rRNA Removal Kit Bacteria (illumina, San Diego, CA) was used to remove ribosomal RNA from 4 µg of total RNA. For each sample, 100 ng of rRNA-depleted RNA was used to construct sequencing libraries using Illumina's TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Low throughput). The mRNA was chemically fragmented. The first cDNA strand was generated by reverse transcription with random hexamer primers, SuperScript IV Reverse Transcriptase (Life Technologies), Actinomycine D. The Second strand cDNA was synthesized by replacing dTTP with dUTP. A single "A" nucleotide was added to the 3' end and ligation was carried out with Illumina's indexed adapters. After 15 cycles of PCR, libraries were validated on a Fragment Analyzer (AATI, Ankeny, IA) and quantified with a KAPA qPCR kit. On a sequencing lane of a flowcell V4, nine libraries were pooled in equal proportions, denatured with NaOH and diluted to 8 pM before clustering. Clustering and 50 nt single read sequencing were performed according to the manufacturer's instructions. Cluster formation, primer hybridisation and single end-read 50 cycles sequencing were performed on cBot and HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA), respectively. Image analyses and basecalling were performed using the Illumina HiSeq Control Software and Real-Time Analysis component. Demultiplexing was performed using Illumina's conversion software (bcl2fastq 2.17). The quality of the data was assessed using FastQC from the Babraham Institute and the Illumina software SAV (Sequencing Analysis Viewer). Potential contaminants were investigated with the FastQ Screen software from the Babraham Institute.

RNA-Seq Analysis

High-throughput transcriptomic sequencing data were processed with a bioinformatic pipeline implemented at the Microscope platform (Vallenat et al., 2013). The reads were mapped onto the *P. luminescens* subsp. *laumondi* TT01 genome sequence (EMBL accession number: BX470251) with BWA software (v. 0.7.4) (Li and Durbin, 2009). We then used SAMtools (v.0.1.12) (Lister et al., 2009) to lower the false-positive discovery rate and to extract reliable alignments from BAM-formatted files. The number of reads matching each genomic object harbored by the reference genome was then calculated with the Bioconductor-GenomicFeatures package (Lawrence et al., 2013). For reads matching several genomic objects, the count number was weighted so as to keep the total number of reads constant.

Finally, we used the Bioconductor-DESeq package (Anders and Huber, 2010) with default parameters to analyze raw count data, to normalize the samples to the reliable reads and to evaluate differential expression between conditions, as previously described (Jubelin et al., 2013). Between 14 and 19 million Illumina sequences (50-base reads) were obtained for each sample and between 80 and 93% of high-quality sequences mapped to at least one site in the reference genome. The complete dataset from this study has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) database, under accession number GSE100650.

RT-qPCR Analysis

For the validation of RNA-seq data, quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) were carried out as previously described (Mouammine et al., 2017). Briefly, RNA samples from 9 biological replicates for each strain were used for cDNA synthesis. The SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) was used on 1 µg of total RNA with random hexamers (100 ng/µl; Roche Diagnostics). qPCR analyses were performed using SYBR green Master kit (Roche Diagnostics) with 1 µl of cDNA and specific gene primers at 1 µM (Table S1). The reactions were performed in triplicate at 95°C for 10 clones from each strain min, followed by 45 cycles at 95°C for 5 s, 61°C for 10 s, and 72°C for 15 s and monitored in the LightCycler 480 system (Roche). Melting curves were analyzed and always contained a single peak. The data analyzed with the REST software 2009 (Pfaffl et al., 2002) using the pairwise fixed randomization test with 2,000 permutations are presented as a ratio with respect to the reference housekeeping gene *gyrB*, as previously described (Jubelin et al., 2013).

RESULTS

Conservation of Major Amino Acids in *P. luminescens* Dam Protein

Functional characterization of Dam proteins has been described in several organisms, and allowed the identification of several amino-acids essential for the Dam function (Yang et al., 2003; Erova et al., 2006a; Horton et al., 2006). Comparing these protein sequences with that of M.PluTDamP by a multiple alignment revealed that all major amino acids described in these organisms were conserved in *P. luminescens* Dam protein (Figure S1). They were also conserved in a protein encoded by a *dam* ortholog (XNC3v2_1950011) (83.3% of identity and 92.6% of similarity with M.PluTDamP) found in the closely related bacterium *X. nematophila* (Lanois et al., 2013). These findings strongly suggest that M.PluTDamP plays a role in DNA adenine methylation, as described for other Dam proteins.

Complementation by M.PluTDamp of an *E. coli* dam Mutant

In order to confirm the *P. luminescens* Dam function, the plu0087 gene was cloned and introduced in an *E. coli* dam mutant or in its *E. coli* parental strain. The pBBR1MCS-5 empty plasmid was used as a control. The recombinant strains harboring pBB-Dam or pBBR1MCS-5 were assessed for their ability to methylate GATC

sites. Plasmid DNA extracted from these strains were digested by enzymes sensitive to DNA methylation. Results presented in **Figure 1** show that the DNA extracted from the *E. coli* MG1655 strain harboring either the pBB-Dam or the empty plasmid was digested by DpnI, but not by MboI, as expected, indicating that the GATC sites of the DNA are methylated in this strain, whatever the plasmid introduced. However, the DNA extracted from the *E. coli dam* mutant harboring the control empty plasmid was digested by MboI, but not by DpnI, confirming that the GATC sites are not methylated in this mutant strain. In contrast, the DNA extracted from the *E. coli dam* mutant harboring the pBB-Dam was digested by DpnI, but not by MboI, revealing a methylation on GATC sites. This indicates that the *P. luminescens dam* gene was able to complement the *E. coli dam* mutant, and therefore confirms that it is a genuine *dam* ortholog, with M.PluTDamP being able to methylate adenine on GATC sites of DNA.

dam Overexpression in *P. luminescens* Does Not Alter Growth Nor Several Major Phenotypes

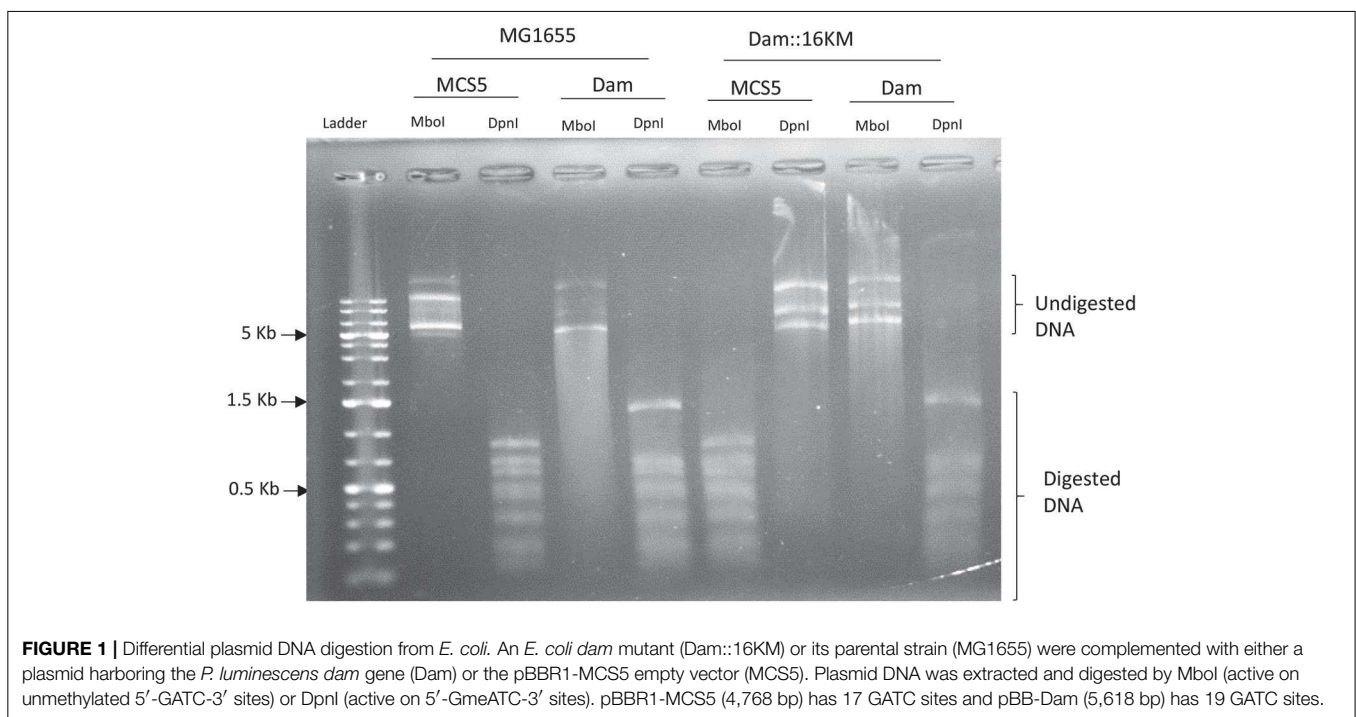
Construction of a *P. luminescens dam*-mutant failed despite several attempts. The role of *P. luminescens dam* gene was therefore investigated by using a strain overexpressing *dam*. In *P. luminescens*, genes placed under the control of the P_{lac} promoter are constitutively expressed (Lanois et al., 2011; Mouammine et al., 2014). Therefore, the additional copy of the *dam* gene caused by the presence of pBB-Dam plasmid, together with constitutive expression of the strong P_{lac} promoter are supposed to induce a *dam* overexpression in *P. luminescens*. This postulate was confirmed by quantification of mRNA

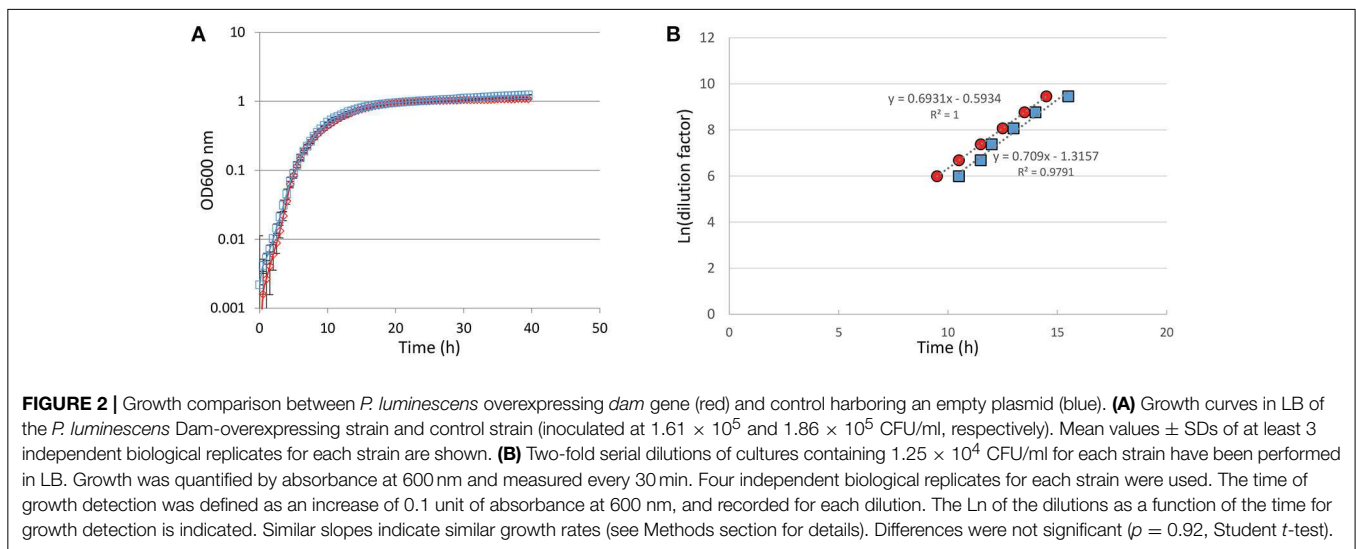
corresponding to the *dam* gene. RT-qPCR experiments showed an average of 23.1-fold induction of expression of *dam* in *P. luminescens* harboring pBB-Dam when compared to the control strain (ie, harboring a pBBR1MCS-5 empty plasmid).

Considering that this *dam* overexpression may modify *P. luminescens* physiology, growth of both strains was monitored with an automated turbidimetric system, and the maximum specific growth rate (μ_{max}) was estimated (**Figure 2**). The growth curves of both strains overlapped with the same shape: their slope were similar during the exponential phase and they reached the same maximum OD during stationary phase. No lag-phase was observed. Moreover, the calculated μ_{max} were not different: 0.647 h^{-1} for *P. luminescens* harboring pBB-Dam vs. 0.636 h^{-1} for the control strain ($p = 0.92$, Student *t*-test). Several phenotypes were also assessed to compare the *dam*-overexpressing strain to the control strain. No significant difference was observed between *P. luminescens* harboring pBB-Dam when compared to the control *P. luminescens* strain for bromothymol blue adsorption on NBTA, bioluminescence production, antibiotic production, hemolysis, lipase activities and mutation rate (**Table 2**). Altogether, these findings indicate that many *P. luminescens* phenotypes are not altered by *dam* overexpression.

dam Overexpression Impairs the Bacterial Motility

The halo size of motility, assessed on low agar LB medium, was much smaller in *P. luminescens* harboring pBB-Dam when compared to that of the control strain (**Figure 3**). Data revealed that for *P. luminescens* harboring pBB-Dam, the median halo size after 30 h of incubation was 59.3% that of the control strain





(17.5 vs. 29.5 mm, respectively). This difference was significant as early as 24 h after inoculation ($p < 0.01$, Wilcoxon test), and highly significant after 30 h of incubation ($p < 0.001$, Wilcoxon test). This indicates that motility is significantly reduced but not abolished in the *dam*-overexpressing *P. luminescens* strain.

Because introducing the pBB-Dam plasmid led to an impaired motility, we checked if the loss of the plasmid would restore the WT phenotype. After growth in a liquid medium followed by growth on agar plates, both in the absence of antibiotic pressure, the loss of the pBB-Dam plasmid, as well as that of the pBBR1MCS-5, was observed for all the 50 tested CFU of *P. luminescens* (not shown). Four Gm-sensitive CFU originating from each strain were then tested for their motility ability after inoculation on low-agar plates, as described above. No significant difference in the halo size of motility was observed between the cured strains originating either from the *dam*-overexpressing *P. luminescens* strain or from the control strain, after 30 h of incubation ($p = 0.44$, Wilcoxon test). These results revealed that motility was fully restored in pBB-Dam cured cells, confirming that *dam*-overexpression causes an impaired motility in *P. luminescens*.

We wondered if *dam* overexpression in another species closely related to *P. luminescens* would also cause an impaired motility. We therefore introduced the pBB-Dam plasmid, or the control empty plasmid, in *X. nematophila* and checked the motility on a low agar medium. Results from 5 independent experiments showed that the median halo size after 30 h of incubation was 13 mm for *X. nematophila* harboring pBB-Dam vs. 19 mm for the control strain. This difference was significant ($p = 0.001$, Wilcoxon test) indicating that swimming motility is reduced, but not abolished, in the *dam*-overexpressing *X. nematophila* strain, similarly as it was observed for *P. luminescens*.

dam Overexpression Increases the Biofilm Formation Ability

Determination of the biofilms formed in glass tubes by the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* and the control strain

was analyzed by a crystal violet staining method (**Figure 4**). The results revealed a significant increase of biofilm-associated crystal violet measured for the *P. luminescens* overexpressing *dam* strain ($p = 0.003$, Wilcoxon test), suggesting an increase in adhesion properties for this strain.

Effect of dam Overexpression on P. luminescens Insect Virulence

The insect virulence of the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* was compared to that of the control strain. It was assessed by injection of bacterial cells in *S. frugiperda* (**Figure 5**). Both strains were pathogenic, being able to cause death of all injected larvae in < 60 h. However, while the time needed to kill 50% of infected larvae (LT_{50}) was about 38 h for the control strain, it was significantly increased in *P. luminescens* pBB-*dam*, reaching 44.5 h ($p < 0.001$, Wilcoxon test). This delay in killing insect larvae indicates a reduction in virulence properties of the *P. luminescens* strain overexpressing *dam*.

After loss of the *dam* overexpressing plasmid as described above, cured strains displayed a significantly lower LT_{50} compared to that of the *dam* overexpressing *P. luminescens* strain (data not shown), confirming that *dam*-overexpression causes an impaired virulence in *P. luminescens*.

Flagellar Genes Are Downregulated in the P. luminescens dam-Overexpressing Strain

We wondered if the reduced motility and the delayed virulence in insects observed for the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* were associated to changes in gene expression. RNA sequencing was therefore performed on the *dam* overexpressing strain and the control strain during exponential phase of growth. The transcriptome analysis revealed significant differences (\log_2 fold change ≥ 1 ; adjusted $p \leq 0.005$) in expression for 208 genes between the two strains, with 121 down-regulated and 87 up-regulated genes in the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* (Table S2). Both up- and down-regulated genes were

TABLE 2 | Phenotypes of *P. luminescens* TT01 transconjugants, overexpressing *dam* gene (pBB-dam) and control (pBBR1MCS-5).

Strain	Tested phenotypes ^a										Mutation rate ⁱ	
	Btb adsorption ^b	Bioluminescence ^c	Antibiotic production ^d	Sheep blood hemolysis ^e	Motility ^f	Lipolysis of ^g						
						Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Tween 85		
TT01 WT	G	+	+	-	++	+	+	+	+	-	ND	ND
TT01+pBBR1MCS-5	G	+	+	-	++	+	+	+	+	-	0.636	4.80×10^{-8}
TT01+pBB-dam	G	+	+	-	+	+	+	+	+	-	0.647	3.84×10^{-8}

^aAll plates were incubated for 2 days at 28°C before assays were interpreted, unless otherwise indicated. Routinely tested phenotypes on the WT strain are indicated for comparison.

^bBtb, bromothymol blue; G, green-blue colonies on NBTA medium.

^c+, Luminescence detected by visual observation in a dark room.

^d+, Halo size (>25 mm) of growth inhibition of *Micrococcus luteus*.

^e-, No halo of hemolysis detected

^f+, +, Large spreading area (halo size >20 mm); +, reduced spreading area (halo size <20 mm) after 30 h of incubation.

^g+, Halo of precipitation; -, no halo of precipitation

^hGrowth rate was estimated on 4 independent biological replicates, using serial dilution of the inoculum as described in the method section. Differences were not significant ($p = 0.92$, Student *t*-test). ND, not done.

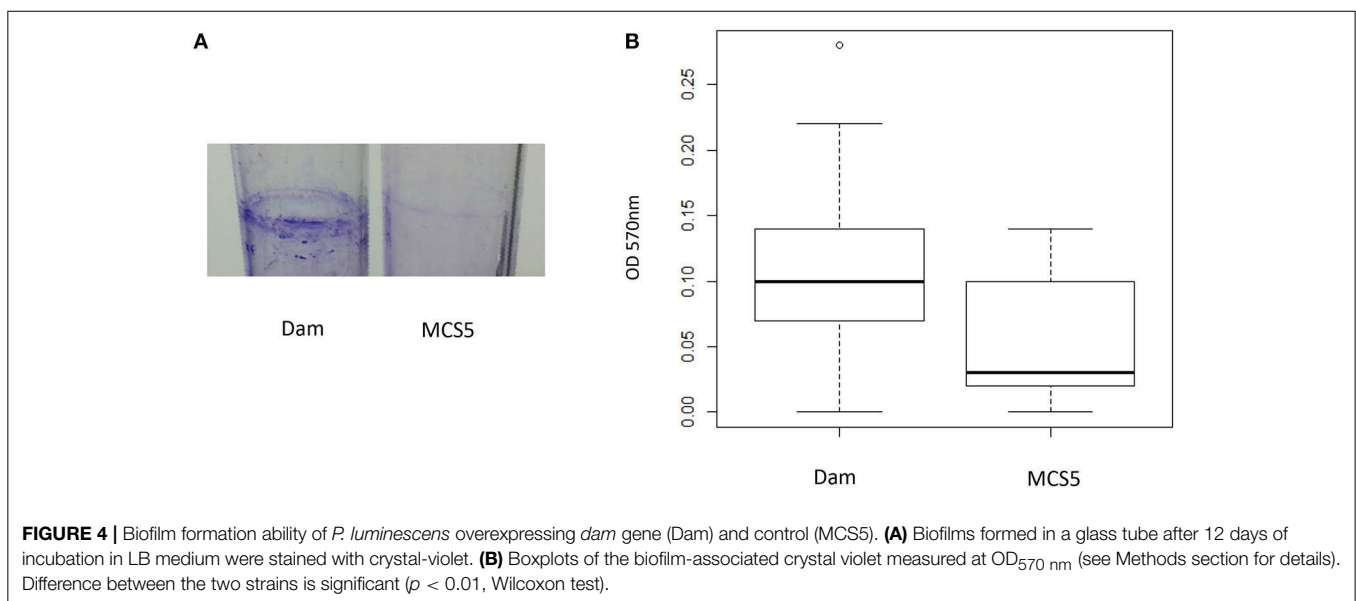
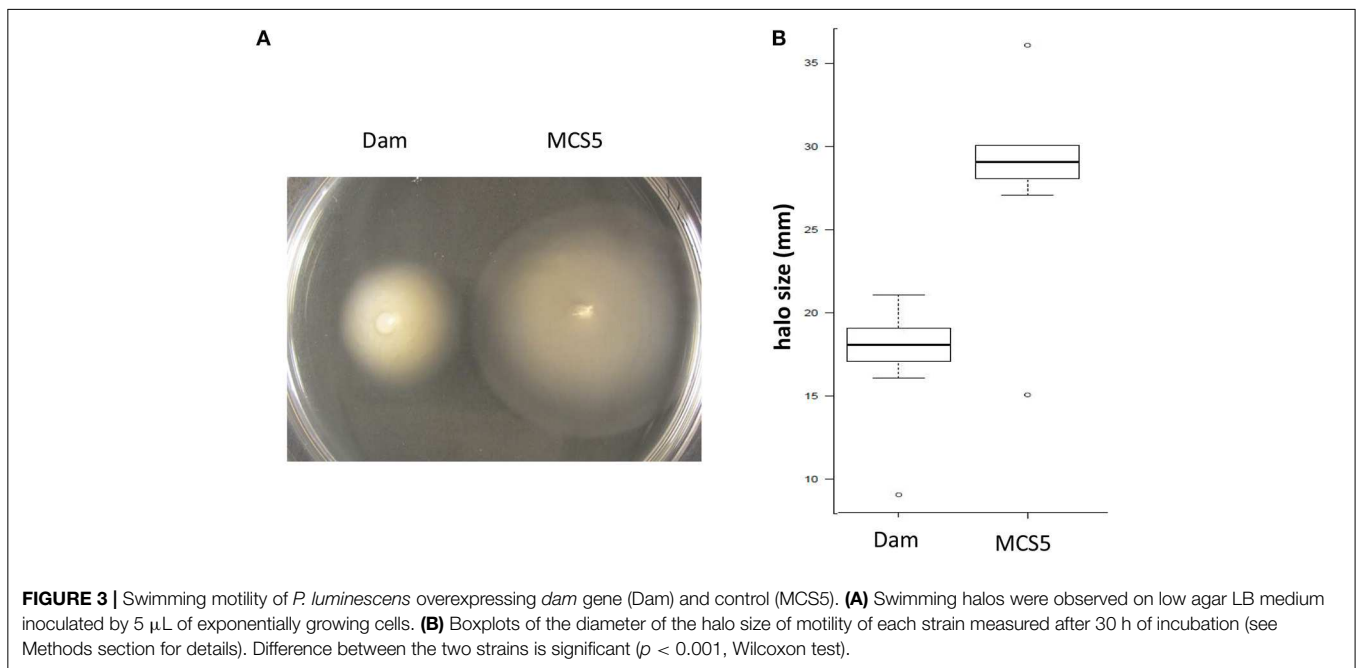
ⁱSpontaneous mutation rate per CFU was assessed by quantifying the number of rifampicin-resistant CFU arising in the total population after overnight growth in liquid medium. Presented values are the mean of 3 independent experiments. Differences were not significant ($p = 0.73$, Student *t*-test).

distributed all over the chromosome (Table S2). The percentages by COG class in TT01 genome revealed that the 208 differentially expressed genes belong to various COG categories (Figure 6). Interestingly, we observed an enrichment in genes encoding proteins belonging to the N category, and putatively involved in “cell motility” (Figure 6 and Table S2). Most of them are either flagellar genes or encode putative pili/fimbrial proteins (Table S2). When focusing on the 49 flagellar genes that are found in the *P. luminescens* TT01 genome, 48 of them displayed a lower expression in the strain overexpressing *dam* when compared to the control strain, although not always reaching a significant adjusted *p*-value to be considered as differentially expressed (Table S3). Interestingly, 16 genes encoding putative pili or fimbrial proteins were upregulated in the *dam*-overexpressing strain (Table S2), including *pilL* (plu1049), the first gene of an operon encoding a type IV pilus. This result may explain the observed increased biofilm formation in this strain.

However, while an impaired virulence was observed in the *P. luminescens* strain overexpressing *dam*, only a limited number of genes ($n = 5$) encoding effectors influencing the infection process were differentially regulated (Table S2). In order to confirm these observation, a few genes related to the two major impaired phenotypes (i.e., motility and insect virulence) were therefore selected and their level of expression was quantified by RT-qPCR in the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* in comparison to the control strain. As mentioned above, the *dam* gene was up-regulated about 23-fold. Results also showed that 7 of the 10 tested flagellar genes were significantly downregulated in the *dam*-overexpressing strain (Figure S2), in agreement with the results of the RNA-seq analysis. This result confirmed that a reduced expression at the transcriptional level of flagellar genes was responsible for the impaired motility. In contrast, 5 additional genes (*manA*, *sodA*, *luxS*, *tcaZ*, *lopT*) likely involved in insect virulence displayed similar level of expression between the two strains (Figure S2). Finally, RT-qPCR confirmed the overexpression of a fimbrial gene (*madA*) in the *dam*-overexpressing strain (Figure S2).

DISCUSSION

Given the high degree of conservation of Dam methyltransferase among enterobacteria and several other Gram-negative bacteria (Lobner-Olesen et al., 2005; Casadesus and Low, 2013; Marinus and Løbner-Olesen, 2014), the identification of a *dam* ortholog in *P. luminescens* was expected. We first showed that the amino-acids previously described as essential for the Dam function in several organisms (Erova et al., 2006a; Horton et al., 2006) were conserved in the predicted amino-acid sequence of the plu0087 *dam* orthologous gene. This result strongly suggested that the predicted encoded enzyme, M.PluTDamP, has the same DNA methylation function in *P. luminescens* as that described for Dam proteins from other Gram-negative bacteria. The finding that the *P. luminescens dam* gene was able to complement the *E. coli dam* mutant, confirmed that M.PluTDamP was able to induce DNA-adenine methylation of GATC sites. Since our results confirmed the putative function of M.PluTDamP, the enzyme should now be named M.PluTDam (or M.PluTII) (Roberts et al., 2003).



The pleiotropic role of DNA-methylation by Dam has been illustrated in many bacterial species (Marinus and Casadesus, 2009). In some of them, it was proposed an essential function of *dam* for cell viability (Julio et al., 2001; Erova et al., 2006b). In particular, the role of Dam during bacterial-host interactions has been reported in several bacterial species (Heusipp et al., 2007), and mostly in the mammalian pathogen *Salmonella* (Garcia-Del Portillo et al., 1999; Heithoff et al., 1999), but also in *E. coli*, *H. influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Actinobacillus*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Y. pestis* (Julio et al., 2001; Watson et al., 2004; Robinson et al., 2005; Wu et al., 2006; Mehling et al., 2007; Kim et al., 2008; Shell et al.,

2013). However, the role of DNA methylation in host-pathogen interaction remains unexplored in bacterial insect pathogens. Construction of a *P. luminescens dam*-mutant failed despite several attempts, suggesting that the presence of Dam itself is possibly required for some essential mechanisms, as described in other bacterial species (Julio et al., 2001; Erova et al., 2006b; Demarre and Chattoraj, 2010). We therefore investigated the role of Dam in *P. luminescens* by using a strain overexpressing *dam*. Growth in standard conditions together with the observation of most major phenotypes were found unmodified by the 23-fold increase of *dam* expression. Remarkably, two major phenotypes were impaired when compared to the control strain: motility and

virulence properties were significantly reduced in *P. luminescens* overexpressing *dam*. *P. luminescens* harbors a large repertoire of factors involved in bacterial-host interaction (Clarke, 2008),

and several genes have been described to contribute to insect virulence (Nielsen-LeRoux et al., 2012). For instance, isogenic mutants of genes encoding the SodA or the LuxS proteins display reduced virulence (Krin et al., 2006; Chalabaev et al., 2007). The Tc toxins and the type III secretion system (T3SS) are also considered to play key roles during *P. luminescens*-insect interactions (Bowen et al., 1998; Brugirard-Ricaud et al., 2005; Gatsogiannis et al., 2013). In addition, a *manA*-mutant is impaired in motility, insect virulence, but also in biofilm formation (Amos et al., 2011). Despite a significantly impaired virulence in *P. luminescens* overexpressing *dam*, no change in gene expression was detected for *manA*, *sodA*, *luxS*, *tcaZ*, *lopT* (encoding an effector of the T3SS), neither by RNA-seq nor RT-qPCR analysis. Thus, the precise factors involved in the observed impaired virulence of the *P. luminescens* strain overexpressing *dam* remains to be elucidated.

Our findings suggest that genome-wide alterations of methylation states may significantly impact some major phenotypes, although the specific mechanisms by which DNA methylation regulates the expression of the genes involved in these phenotypes remains unknown in *P. luminescens*. Strikingly, there is no GATC site in the promoter region of *flhD*, the gene encoding the master regulator of flagellar cascade. Therefore, the *flhD* downregulation (and consequently, of other flagellar genes) in the Dam overexpressing strain cannot be directly related to a difference in GATC methylation states in this locus. However, the observed downregulation of flagellar genes in *P. luminescens dam*-overexpressing strain opens new fields of investigation. The impaired motility coupled with an impaired ability to kill insects identified in this study may illustrate the occurrence of a direct mechanism, yet undescribed, involving these two

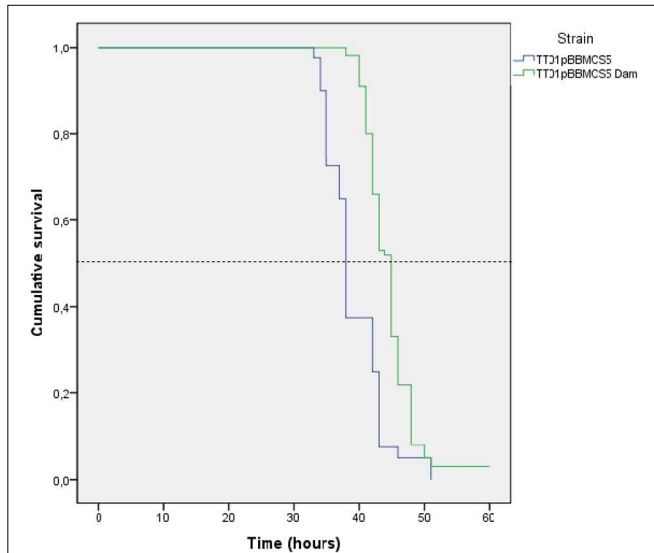


FIGURE 5 | Infection of *Spodoptera littoralis* larvae by *P. luminescens* overexpressing *dam* and the control strain. Proportion of survival of *S. littoralis* after injection of 10^4 CFU of *P. luminescens* overexpressing *dam* (TT01 + pBB-Dam, green) or carrying the vector control (TT01 + pBBR1-MCS5, blue). Graph represents the results from 4 to 5 independent experiments (with 20 insect larvae per experiment). The survival of 50% of the infested larvae is represented by the dotted line. The time needed to kill 50% of infected larvae (LT_{50}) was significantly different between the two strains ($p < 0.001$, Wilcoxon test).

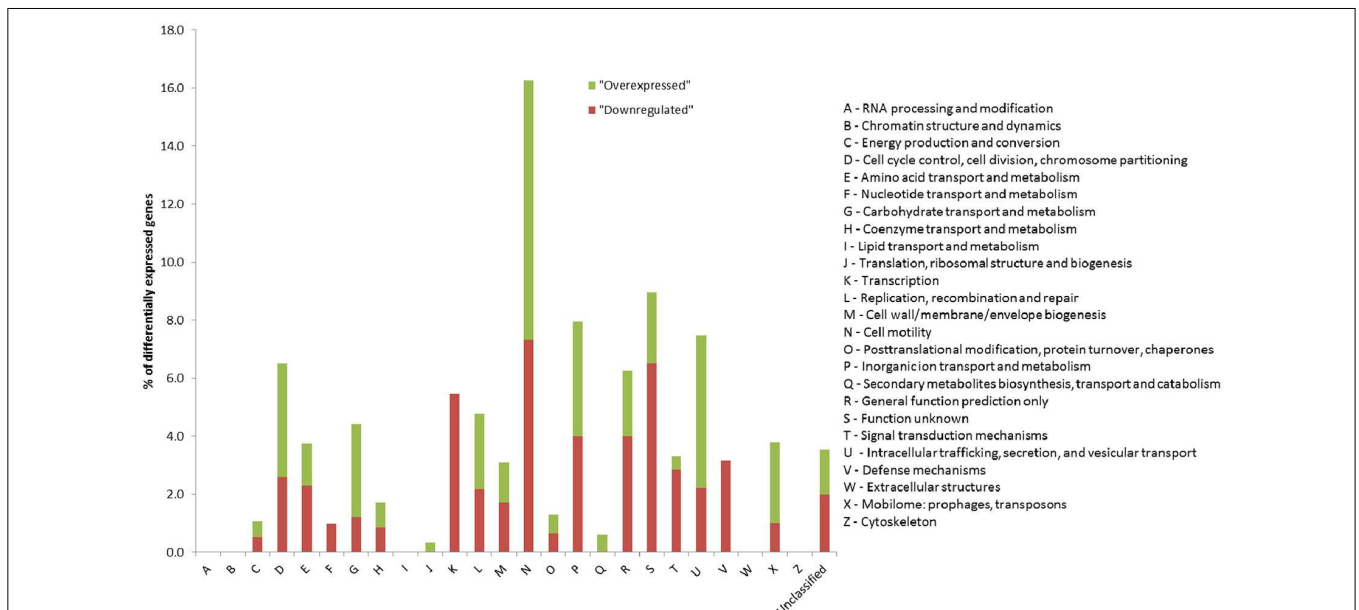


FIGURE 6 | Classification by COG (cluster of orthologous group) annotation of the 208 genes differentially expressed between *P. luminescens* overexpressing *dam* and the control strain. Results show the percentage of genes from each COG class differentially expressed between the *P. luminescens dam*-overexpressing strain and the control strain, according to the 2014 update ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/COG2014/static/lists/homeCOGs.html](http://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/COG2014/static/lists/homeCOGs.html)).

phenotypes. Indeed, a complex interplay between the regulation of flagellar motility and the expression of virulence factors exists in several bacterial pathogens (Josenhans and Suerbaum, 2002). In particular, these two phenotypes were previously shown as being linked in the closely related genus *Xenorhabdus* (Givaudan and Lanois, 2000, 2017). In this bacterium, the global regulators encoded by the class I operon *flhDC*, controls the expression of class II genes, including most of the structural genes for the flagellar hook-basal body, but also the *fliAZ* operon encoding the alternative sigma factor FliA and another flagellar regulator, FliZ (Givaudan and Lanois, 2000, 2017; Park and Forst, 2006). FliZ was found to upregulate many genes, including genes encoding 2 hemolysins, and a toxin complex (Tc) protein, all of them being considered as virulence factors (Lanois et al., 2008). In *P. luminescens*, no mutant in flagellar regulators has been described (Givaudan and Lanois, 2017). However, the mutation of a response regulator of a two-component system (i.e., AstR) in *P. luminescens* TT01, which regulates the *flhDC* transcription level, causes an impaired motility but has no impact on virulence in insects (Derzelle et al., 2004a). In addition, it was shown that two distinct flagellar genes (*flgG* and *motAB*) deletion mutants, that were consequently non-motile, were as efficient as their parental strain in killing insects (Easom and Clarke, 2008). Our result revealed that *dam* overexpression causes both a reduced motility linked to a downregulation of flagellar genes (i.e., *flhDC*, *motAB*...) and an impaired virulence. Thus, further investigations are required in *P. luminescens* in order to determine if a common regulator (such as FlhD, FlhC, FliA, or FliZ) is involved in both motility and the ability to kill insects, as already described in *X. nematophila*. Then, it will be important to determine if the changes in the global methylation state caused by *dam*-overexpression involve such common regulator, or in contrast if it impairs distinct mechanisms that are involved in each of these two phenotypes.

A differential expression of several genes encoding virulence factors such as *pap*, *agn43*, *sci1* in *E. coli* (Blyn et al., 1990; Henderson and Owen, 1999; Brunet et al., 2011), but also *gtr*, or *opvAB* in *Salmonella* (Broadbent et al., 2010; Cota et al., 2016), is related to a differential methylation state of the GATC sites found in their respective promoters. This is caused mostly by differences in DNA affinity, depending on the DNA methylation state, of various transcriptional repressors (OxyR, Lrp, or Fur). In *X. nematophila*, virulence attenuation in insects was shown to be associated with an *lrp* mutation and Lrp positively regulates the expression of the *flhD* gene encoding the master flagellar regulator (Cowles et al., 2007; Lanois et al., 2008). Thus, because of the presence of *lrp* (*plu1600*) but also of *oxyR* (*plu4740*) and *fur* (*plu1327*) orthologs in the *P. luminescens* genome (Duchaud et al., 2003), it remains to be determined if similar mechanisms exist in *P. luminescens*.

It was shown that GATC methylation itself but also the level of Dam, have multiple functions in the cell (Low and Casadesus, 2008). These functions are correlated with three DNA transactions: DNA mismatch repair, initiation of chromosome replication, and regulation of gene expression (Marinus and Løbner-Olesen, 2014). Our results confirm that modifying the *dam* level of expression in *P. luminescens* causes major phenotypes, presumably in the regulation of gene

expression. However, *dam* overexpression did not significantly cause difference in the growth rate (Figure 2). In addition, this overexpression did not lead to the identification of drug-induced mutators in the tested conditions (Table 2). This is in contrast to what was described in other species (Chen et al., 2003) for which the general mutation rate is however similar to what is observed in *P. luminescens*. Our result suggests that after DNA replication, the Mismatch Repair (MMR) apparatus is highly efficient and therefore still able to discriminate between the nascent (error-containing) DNA strand and the mother strand. Many genes putatively involved in regulation of the chromosome replication, in MMR (including *mutH*, the gene encoding the nuclease which relies on the DNA methylation state to identify the correct strand), in double strand breaks (DSBs) repair and/or required for viability of *dam* mutants in other bacterial species are conserved in *P. luminescens* TT01 (Table S4). Such mechanisms may require the presence of Dam for cell viability in *P. luminescens* during the growth conditions tested. In contrast, our results suggest that an elevated level of *dam* expression does not drastically affect the mechanisms involved in chromosomal replication or in DNA mismatch repair.

This study revealed that DNA methylation state on GATC sites seems to be critical in *P. luminescens* for phenotypes involving interactions with the insect host. Eleven additional MTases are found in the genome and probably contribute to the global DNA methylation state which may also account for some of the *P. luminescens* phenotypes during bacterial-insect interaction.

ETHICS STATEMENT

According to the EU directive 2010/63, this study is exempt from the above requirements because experiments were performed on invertebrates animals (insects).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, AL, AG, and JB analyzed the data and designed the experiments; AP performed the experiments; MG and ED performed the RNA-seq; DR and SC analyzed the RNA-seq data; JB drafted the manuscript. All authors revised the manuscript and have approved its final version.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank N. Ginibre, S. Pagès, and W. Levrat for technical assistance and Philippe Clair from the Montpellier GenomiX facility for assistance with real-time PCR. They are grateful to Anders Løbner-Olesen for gift of *E. coli* strains. The authors thank INRA Plant Health and Environment (SPE) division for financial support (SPE2015-65359) and GAIA doctoral school #584 for supporting AP's PhD.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01671/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Amos, M. R., Sanchez-Contreras, M., Jackson, R. W., Munoz-Berbel, X., Ciche, T. A., Yang, G., et al. (2011). Influence of the *Photorhabdus luminescens* phosphomannose isomerase gene, *manA*, on mannose utilization, exopolysaccharide structure, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 776–785. doi: 10.1128/AEM.02326-10
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Augustin, J. C., Rosso, L., and Carlier, V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 38, 137–146. doi: 10.1016/S0167-7012(99)00089-5
- Avery, S. V. (2006). Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 577–587. doi: 10.1038/nrmicro1460
- Blyn, L. B., Braaten, B. A., and Low, D. A. (1990). Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential dam methylation states. *EMBO J.* 9, 4045–4054.
- Boemare, N. E., and Akhurst, R. J. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*). *J. Gen. Microbiol.* 134, 751–761. doi: 10.1099/00221287-134-3-751
- Bowen, D., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., et al. (1998). Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280, 2129–2132. doi: 10.1126/science.280.5372.2129
- Braaten, B. A., Nou, X., Kaltenbach, L. S., and Low, D. A. (1994). Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pylonophritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* 76, 577–588. doi: 10.1016/0092-8674(94)90120-1
- Brillard, J., Duchaud, E., Boemare, N., Kunst, F., and Givaudan, A. (2002). The PhlA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. *J. Bacteriol.* 184, 3871–3878. doi: 10.1128/JB.184.14.3871-3878.2002
- Brillard, J., and Lereclus, D. (2007). Characterization of a small PlcR-regulated gene co-expressed with cereolysin O. *BMC Microbiol.* 7:52. doi: 10.1186/1471-2180-7-52
- Brillard, J., Ribeiro, C., Boemare, N., Brehelin, M., and Givaudan, A. (2001). Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2515–2525. doi: 10.1128/AEM.67.6.2515-2525.2001
- Broadbent, S. E., Davies, M. R., and van der Woude, M. W. (2010). Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism. *Mol. Microbiol.* 77, 337–353. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07203.x
- Brugirard-Ricaud, K., Duchaud, E., Givaudan, A., Girard, P. A., Kunst, F., Boemare, N., et al. (2005). Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell. Microbiol.* 7, 363–371. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00466.x
- Brunet, Y. R., Bernard, C. S., Gavioli, M., Lloubes, R., and Cascales, E. (2011). An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster. *PLoS Genet.* 7:e1002205. doi: 10.1371/journal.pgen.1002205
- Casadesus, J. (2016). Bacterial DNA methylation and methylomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 945, 35–61. doi: 10.1007/978-3-319-43624-1_3
- Casadesus, J., and Low, D. A. (2013). Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J. Biol. Chem.* 288, 13929–13935. doi: 10.1074/jbc.R113.472274
- Chalabaev, S., Turlin, E., Charles, J. F., Namane, A., Pages, S., Givaudan, A., et al. (2007). The HcaR regulatory protein of *Photorhabdus luminescens* affects the production of proteins involved in oxidative stress and toxemia. *Proteomics* 7, 4499–4510. doi: 10.1002/pmic.200700609
- Chen, L., Paulsen, D. B., Scruggs, D. W., Banes, M. M., Reeks, B. Y., and Lawrence, M. L. (2003). Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiology* 149, 2283–2290. doi: 10.1099/mic.0.26251-0
- Clarke, D. J. (2008). *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cell. Microbiol.* 10, 2159–2167. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x
- Corpet, F., Gouzy, J., and Kahn, D. (1998). The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Res.* 26, 323–326. doi: 10.1093/nar/26.1.323
- Cota, I., Bunk, B., Sproer, C., Overmann, J., König, C., and Casadesus, J. (2016). OxyR-dependent formation of DNA methylation patterns in OpvABOFF and OpvABON cell lineages of *Salmonella enterica*. *Nucleic Acids Res.* 44, 3595–3609. doi: 10.1093/nar/gkv1483
- Cowles, K. N., Cowles, C. E., Richards, G. R., Martens, E. C., and Goodrich-Blair, H. (2007). The global regulator Lrp contributes to mutualism, pathogenesis and phenotypic variation in the bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Cell. Microbiol.* 9, 1311–1323. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00873.x
- Demarre, G., and Chattoraj, D. K. (2010). DNA adenine methylation is required to replicate both *Vibrio cholerae* chromosomes once per cell cycle. *PLoS Genet.* 6:e1000939. doi: 10.1371/journal.pgen.1000939
- Derzelle, S., Ngo, S., Turlin, E., Duchaud, E., Namane, A., Kunst, F., et al. (2004a). AstR-AstS, a new two-component signal transduction system, mediates swarming, adaptation to stationary phase and phenotypic variation in *Photorhabdus luminescens*. *Microbiology* 150, 897–910. doi: 10.1099/mic.0.26563-0
- Derzelle, S., Turlin, E., Duchaud, E., Pages, S., Kunst, F., Givaudan, A., et al. (2004b). The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects. *J. Bacteriol.* 186, 1270–1279. doi: 10.1128/JB.186.5.1270-1279.2004
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., et al. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21, 1307–1313. doi: 10.1038/nbt886
- Easom, C. A., and Clarke, D. J. (2008). Motility is required for the competitive fitness of entomopathogenic *Photorhabdus luminescens* during insect infection. *BMC Microbiol.* 8:168. doi: 10.1186/1471-2180-8-168
- Erova, T. E., Fadl, A. A., Sha, J., Khajanchi, B. K., Pillai, L. L., Kozlova, E. V., et al. (2006a). Mutations within the catalytic motif of DNA adenine methyltransferase (Dam) of *Aeromonas hydrophila* cause the virulence of the Dam-overproducing strain to revert to that of the wild-type phenotype. *Infect. Immun.* 74, 5763–5772. doi: 10.1128/IAI.00994-06
- Erova, T. E., Pillai, L., Fadl, A. A., Sha, J., Wang, S., Galindo, C. L., et al. (2006b). DNA adenine methyltransferase influences the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 74, 410–424. doi: 10.1128/IAI.74.1.410-424.2006
- Garcia-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., and Casadesus, J. (1999). DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11578–11583. doi: 10.1073/pnas.96.20.11578
- Gatsogiannis, C., Lang, A. E., Meusch, D., Pfaumann, V., Hofnagel, O., Benz, R., et al. (2013). A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins. *Nature* 495, 520–523. doi: 10.1038/nature11987
- Givaudan, A., Baghdiguian, S., Lanois, A., and Boemare, N. (1995). Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1408–1413.
- Givaudan, A., and Lanois, A. (2000). FlhDC, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J. Bacteriol.* 182, 107–115. doi: 10.1128/JB.182.1.107-115.2000
- Givaudan, A., and Lanois, A. (2017). Flagellar Regulation and Virulence in the Entomopathogenic Bacteria-*Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 402, 39–51. doi: 10.1007/82_2016_53
- Grimbergen, A. J., Siebring, J., Solopova, A., and Kuipers, O. P. (2015). Microbial bet-hedging: the power of being different. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 67–72. doi: 10.1016/j.mib.2015.04.008
- Hale, W. B., van der Woude, M. W., and Low, D. A. (1994). Analysis of nonmethylated GATC sites in the *Escherichia coli* chromosome and identification of sites that are differentially methylated in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* 176, 3438–3441. doi: 10.1128/jb.176.11.3438-3441.1994
- Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., and Mahan, M. J. (1999). An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 284, 967–970. doi: 10.1126/science.284.5416.967
- Henderson, I. R., and Owen, P. (1999). The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1

- protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. *J. Bacteriol.* 181, 2132–2141.
- Heussipp, G., Falck, S., and Schmidt, M. A. (2007). DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 1–7. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.10.002
- Horton, J. R., Liebert, K., Bekes, M., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2006). Structure and substrate recognition of the *Escherichia coli* DNA adenine methyltransferase. *J. Mol. Biol.* 358, 559–570. doi: 10.1016/j.jmb.2006.02.028
- Josenshans, C., and Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 605–614. doi: 10.1078/1438-4221-00173
- Jubelin, G., Lanois, A., Severac, D., Rialle, S., Longin, C., Gaudriault, S., et al. (2013). FliZ is a global regulatory protein affecting the expression of flagellar and virulence genes in individual *Xenorhabdus nematophila* bacterial cells. *PLoS Genet.* 9:e1003915. doi: 10.1371/journal.pgen.1003915
- Julio, S. M., Heithoff, D. M., Provenzano, D., Klose, K. E., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., et al. (2001). DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 69, 7610–7615. doi: 10.1128/IAI.69.12.7610-7615.2001
- Julio, S. M., Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., and Mahan, M. J. (2002). DNA adenine methylase overproduction in *Yersinia pseudotuberculosis* alters YopE expression and secretion and host immune responses to infection. *Infect. Immun.* 70, 1006–1009. doi: 10.1128/IAI.70.2.1006-1009.2002
- Kim, J. S., Li, J., Barnes, I. H., Baltzegar, D. A., Pajaniappan, M., Cullen, T. W., et al. (2008). Role of the *Campylobacter jejuni* Cj1461 DNA methyltransferase in regulating virulence characteristics. *J. Bacteriol.* 190, 6524–6529. doi: 10.1128/JB.00765-08
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. 2nd, et al. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176. doi: 10.1016/0378-1119(95)00584-1
- Krin, E., Chakroun, N., Turlin, E., Givaudan, A., Gaboriau, F., Bonne, I., et al. (2006). Pleiotropic role of quorum-sensing autoinducer 2 in *Phototuberculosis luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6439–6451. doi: 10.1128/AEM.00398-06
- Lanois, A., Jubelin, G., and Givaudan, A. (2008). FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Mol. Microbiol.* 68, 516–533. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06168.x
- Lanois, A., Ogier, J. C., Gouzy, J., Laroui, C., Rouy, Z., Givaudan, A., et al. (2013). Draft genome sequence and annotation of the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* strain F1. *Genome Announc.* 1:e00342–13. doi: 10.1128/genomeA.00342-13
- Lanois, A., Pages, S., Bourot, S., Canoy, A. S., Givaudan, A., and Gaudriault, S. (2011). *Transcriptional analysis of a Phototuberculosis sp.* variant reveals transcriptional control of phenotypic variation and multifactorial pathogenicity in insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1009–1020. doi: 10.1128/AEM.01696-10
- Lawrence, M., Huber, W., Pages, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., et al. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1003118. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003118
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322. doi: 10.1038/nature08514
- Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O., and Marinus, M. G. (2005). Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 154–160. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.009
- Lobner-Olesen, A., and von Freiesleben, U. (1996). Chromosomal replication incompatibility in Dam methyltransferase deficient *Escherichia coli* cells. *EMBO J.* 15, 5999–6008.
- Low, D. A., and Casadesus, J. (2008). Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 106–112. doi: 10.1016/j.mib.2008.02.012
- Marinus, M. G., and Casadesus, J. (2009). Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 488–503. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00159.x
- Marinus, M. G., and Løbner-Olesen, A. (2014). DNA methylation. *EcoSal Plus* 6. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013
- Mehling, J. S., Lavender, H., and Clegg, S. (2007). A Dam methylation mutant of *Klebsiella pneumoniae* is partially attenuated. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 187–193. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00581.x
- Mouammine, A., Lanois, A., Pages, S., Lafay, B., Molle, V., Canova, M., et al. (2014). Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of *Phototuberculosis* genus. *PLoS ONE* 9:e110060. doi: 10.1371/journal.pone.0110060
- Mouammine, A., Pages, S., Lanois, A., Gaudriault, S., Jubelin, G., Bonabaud, M., et al. (2017). An antimicrobial peptide-resistant minor subpopulation of *Phototuberculosis luminescens* is responsible for virulence. *Sci. Rep.* 7:43670. doi: 10.1038/srep43670
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., and Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Phototuberculosis* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 220–231. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.006
- Park, D., and Forst, S. (2006). Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FliA pathway in *Xenorhabdus nematophila*. *Mol. Microbiol.* 61, 1397–1412. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05320.x
- Paulick, A., Koerdet, A., Lassak, J., Huntley, S., Wilms, I., Narberhaus, F., et al. (2009). Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol. Microbiol.* 71, 836–850. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06570.x
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21. doi: 10.1016/0378-1119(93)90611-6
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., Bitinaite, J., et al. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1805–1812. doi: 10.1093/nar/gkg274
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015). REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43, D298–D299. doi: 10.1093/nar/gku1046
- Robinson, V. L., Oyston, P. C., and Titball, R. W. (2005). A *dam* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 251–256. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.001
- Shell, S. S., Prestwich, E. G., Baek, S. H., Shah, R. R., Sasseti, C. M., Dedon, P. C., et al. (2013). DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 9:e1003419. doi: 10.1371/journal.ppat.1003419
- Somvanshi, V. S., Sloup, R. E., Crawford, J. M., Martin, A. R., Heidt, A. J., Kim, K. S., et al. (2012). A single promoter inversion switches *Phototuberculosis* between pathogenic and mutualistic states. *Science* 337, 88–93. doi: 10.1126/science.1216641
- Tavaoie, S., and Church, G. M. (1998). Quantitative whole-genome analysis of DNA-protein interactions by *in vivo* methylase protection in *E. coli*. *Nat Biotechnol* 16, 566–571. doi: 10.1038/nbt0698-566
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40:e115. doi: 10.1093/nar/gks596
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., et al. (2013). MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res.* 41, D636–D647. doi: 10.1093/nar/gks1194
- van der Woude, M. W., and Low, D. A. (1994). Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 11, 605–618. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00340.x
- Veening, J. W., Smits, W. K., and Kuipers, O. P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193–210. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.163002
- Watson, M. E. Jr., Jarisch, J., and Smith, A. L. (2004). Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (*dam*) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence. *Mol. Microbiol.* 53, 651–664. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04140.x

- Wion, D., and Casadesus, J. (2006). N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 183–192. doi: 10.1038/nrmicro1350
- Wu, H., Lippmann, J. E., Oza, J. P., Zeng, M., Fives-Taylor, P., and Reich, N. O. (2006). Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 21, 238–244. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00284.x
- Yang, Z., Horton, J. R., Zhou, L., Zhang, X. J., Dong, A., Zhang, X., et al. (2003). Structure of the bacteriophage T4 DNA adenine methyltransferase. *Nat. Struct. Biol.* 10, 849–855. doi: 10.1038/nsb973

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Payelleville, Lanois, Gislard, Dubois, Roche, Cruveiller, Givaudan and Brillard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Fig. S1

	1				50
Plum	MKKKRAFL <u>KW</u>	AGGKYPLVDD	IKRHLPAGSR	LIEPFVGGAGS	VFLNTDYDSY
Xnem	MKKKRAFL <u>KW</u>	AGGKYPLVDD	IKRHLPEGDC	LIEPFVGGAGS	VFLNTDYDSY
Ecoli	MKKNRAFL <u>KW</u>	AGGKYPLDD	IKRHLPKGEC	LVEPFVGGAGS	VFLNTDFSR
Ahyd	MKKTRAFL <u>KW</u>	AGGKYSLVEE	IAERLPAGRV	LLEPFVGGAGS	VFLNTDYDAY
T4	...MLGAIAY	TGNKQSLLE	LKSHFPKYNR	FVDLFCGGLS	VSLNVNGPV.
Consensus	mkk.raflkw	aGgKysLl.#	ik.hlPkg.r	lv#pFvGagS	VfLnt#...y
	51				100
Plum	ILADINSDLI	NLYNTVKLRA	DEFIVHTRPL	FTQEYNTAEH	FYQLREQFNQ
Xnem	ILSDINSDLI	NLYNTVKSR	DEFINHARPL	FFPEFNTSEN	FYRMREEFNK
Ecoli	ILADINSDLI	SLYNIVKMRT	DEYVQAAREL	FVPETNCAEV	YYQFREEFNK
Ahyd	VLNDINPDLI	GLYNHLK RTP	DSFIAEARKL	FVAEHNHKA	YYRLRTQFNQ
T4	...EMYKRLI	NVSWDDVLKV	IKQYKLSKTS	KEEFKLKRED	YNKLANDIQE
Consensus	.l.#in.dLI	nlyn..kl..	d.....r.l	f..e.n.e.e.	%y.l.r.#f#.
	101				150
Plum	STDPFHRSVL	FLYLNHRHCYN	<u>GLCRYN</u> SHGK	FNV <u>PF</u> GRYKK	PYFPEEELHW
Xnem	SSDPFYRSIL	FLYLNHRHCYN	<u>GLCRYN</u> SRGQ	FNV <u>PF</u> GRYKK	PYFPENELYW
Ecoli	SQDPFRAVL	FLYLNRYGYN	<u>GLCRYN</u> LRGE	FNV <u>PF</u> GRYKK	PYFPEAEELYH
Ahyd	ADTSFERALL	FLFLNRHGFN	<u>GLCRYN</u> KKGG	FNV <u>PF</u> GSYKK	PYFPEKELWA
T4	PIITRDPLLL	YV.LHFHGF	NMIR <u>IN</u> DKGN	FTT <u>PF</u> GKRTI	NKNSEKQYNH
Consensus	...f.r.lL	%l.Lnrhg%	g\$cRyN.kG.	FnvPFg.ykk	pyfpEk#l.h
	151				200
Plum	FAEKAQNATF	ICEHYQHTLN	EAHKDSVIYC	<u>DPPY</u> APLSAT	ANFTAYHTNS
Xnem	FAEKSQKATF	ICQHYEIALN	NAPKGAVVYC	<u>DPPY</u> APLSAT	ANFTAYHTNN
Ecoli	FAEKAQNAFF	YCESYADSM	RADDASVVYC	<u>DPPY</u> APLSAT	ANFTAYHTNS
Ahyd	FAEKAQKATF	ICESYADAIQ	RAEEDWVIYC	<u>DPPY</u> APLSTT	ASFRTYSAGG
T4	SSLHFKDVKI	L.....	...DGDFVYV	<u>DPPY</u> .LITV	ADYNKFWSED
Consensus	faek.q.a.f	.c..y.....	.a.dg.v!Yc	DPPYapLstt	A.%t.%....
	201				250
Plum	FNIADQENLA	NIAFKLSSER	AIPVLISNHD	TPMTRKWWYQ	ASLHIVKARR
Xnem	FNLLDQENLA	QIAYHLSSQR	GIPVLISNHD	TPMTREWYHQ	ASLYIVKARR
Ecoli	FTLEQQAHLA	EIAEGLV.ER	HIPVLISNHD	TMLTREWYQR	AKLHVVKVRR
Ahyd	FTLDDQAVLA	RLARHTAARK	GVPVLISNHD	IELTRELYRG	ARLDEILVKR
T4	FKQNCDKIIF	E.....EKD	LLNLLDSLND	RGI..KFGQS	NVLEHHGKEN
Consensus	F...#.lla	e.a.....	..pvLiSnhD	...trk.yq.	a.L.....r
	251				290
Plum	TISRNILARS	KVDELLALYR
Xnem	TISRNILARS	KVDELLALYC	QK.....
Ecoli	SISSNGGTRK	KVDELLALYK	PGVVSPAkk.
Ahyd	TISRNGGTRN	KVAELLALYP	PGIEPEQGY	PSDAELAPLG
T4	TLLKEWSKKY	NVKHLNKKYV	FNIYHSKEKN	GTDEVYIFN.
Consensus	tis.#...r.	kV.eLlalY.	..i.....k.	..d.....

Figure S1. Sequence alignment of selected Dam MTase orthologs.

Plum, *P. luminescens* TT01 (Uniprot database accession number: Q7NA58); Xnem, *Xenorhabdus nematophila* F1 (N1NIZ0); Ecoli, *Escherichia coli* K-12 (P0AEE8); Ahyd, *Aeromonas hydrophila* (Q4PLJ4); T4, bacteriophage T4 (P04392). Red and bold underlined, amino-acid involved in GATC sequence recognition on DNA; highlighted in green, DPPY motif which corresponds to the active pocket site of the enzyme; highlighted in grey, amino-acids which interact with S-AdoMet.

Fig. S2

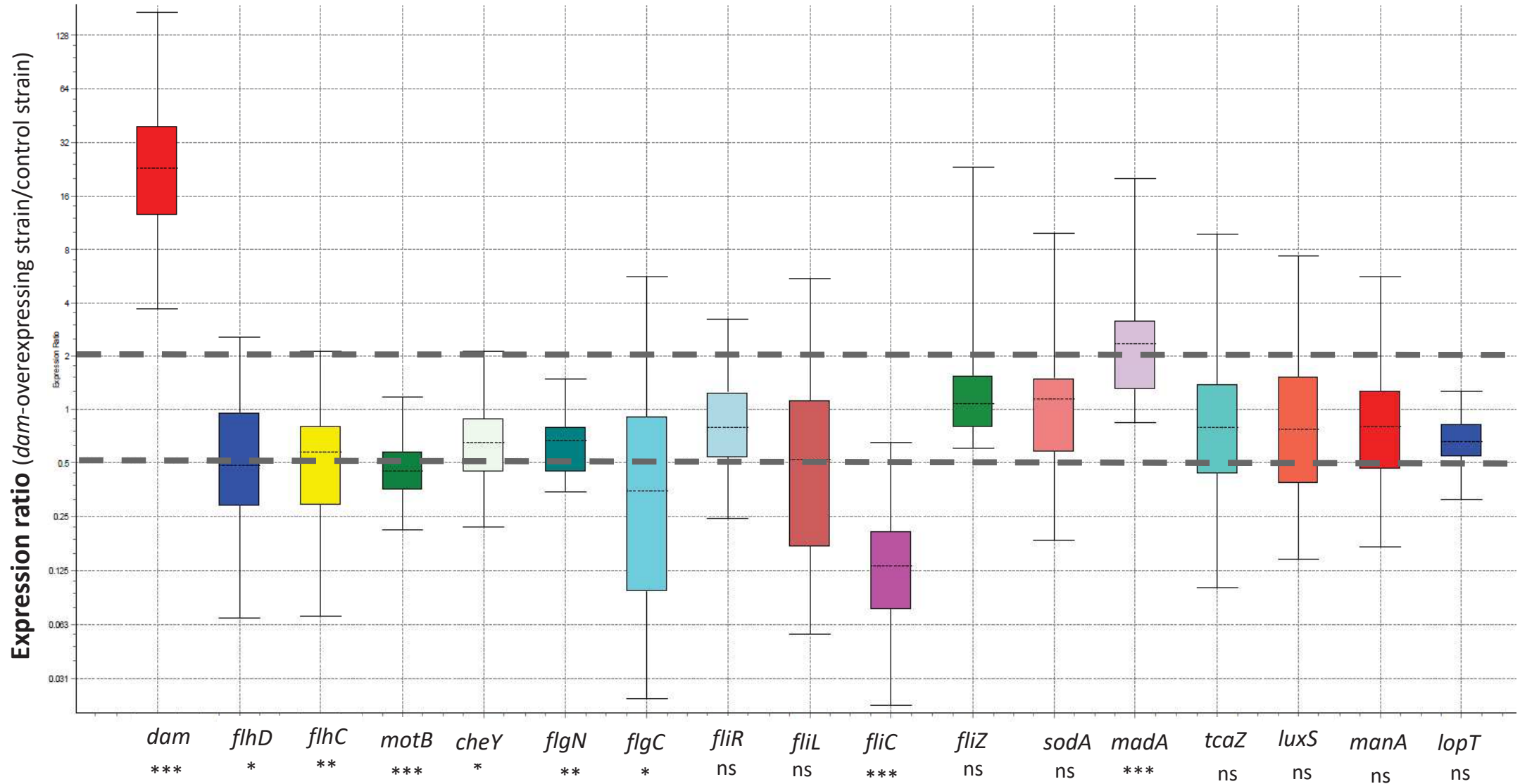


Figure S2. Relative expression of 17 genes in the *P. luminescens* *dam*-overexpressing strain.

qRT-PCR was carried out with total RNA extracted from exponentially growing cells of the *dam*-overexpressing strain and of the control strain. Box-plot representing the expression ratio between the two strains is represented for each tested gene, with *gyrB* used as a control gene (see Materials & Methods section for details). Expression ratios between 0.5 and 2 are flanked by dotted gray lines. The level of expression between the 2 strains was different at $p < 0.05$ (*), at $p < 0.01$ (**), at $p < 0.001$ (***), or was not significantly different (ns, $p > 0.05$), depending on the tested genes.

Table S1: Primers used in this study.

Oligonucleotides	use	Sequence (5'- 3') ^a
Cp-plu087-F	Cloning of <i>dam</i> gene	GGCGGTACCCATGAAAAAAAAACGCGCTTTC
Cp-plu087-R	Cloning of <i>dam</i> gene	TCCCGGATCCTCATCCCTTAATTGCCAAGC
plu0004-F	qRT-PCR on <i>gyrB</i> gene	ATACACGAAGAAGAAGGTGTTTCAG
plu0004-R	qRT-PCR on <i>gyrB</i> gene	TACCTGTCTGTTTCAGTTTCTCCAAC
plu4089-F	qRT-PCR on <i>fis</i> gene	TAAATTCTGACGTACTAACCGTTGC
plu4089-R	qRT-PCR on <i>fis</i> gene	CCAATACCAGCTCATAACAGATCATT
plu087-F	qRT-PCR on <i>dam</i> gene	CTGATGAGTTTATAGTCCACACACG
plu087-R	qRT-PCR on <i>dam</i> gene	ACCATGAGAATTATAACGACAGAGG
plu1847-F	qRT-PCR on <i>flhD</i> gene	TGAGTACGGTTGAATTGCTCA
plu1847-R	qRT-PCR on <i>flhD</i> gene	TCACTCTCTTCGAACCGGAA
plu1848-F	qRT-PCR on <i>flhC</i> gene	ACAATTGGCGATGGAACTCA
plu1848-R	qRT-PCR on <i>flhC</i> gene	CTGTTCCCACGTCATAAACCA
plu1850-F	qRT-PCR on <i>motB</i> gene	GCGTAACGTCTCAGTCATTAGG
plu1850-R	qRT-PCR on <i>motB</i> gene	TCTTGTGGGCTGGAAATTGC
plu1857-F	qRT-PCR on <i>cheY</i> gene	TGGCGAATAAGGATCTGAGATT
plu1857-R	qRT-PCR on <i>cheY</i> gene	CCCCATCCTGAGCTTCTTCT
plu1912-F	qRT-PCR on <i>flgN</i> gene	ACTCGAACAGCAAGTGACCT
plu1912-R	qRT-PCR on <i>flgN</i> gene	GCGCGGACAACAGGAAAATT
plu1916-F	qRT-PCR on <i>flgC</i> gene	GCTCGGCATTATCAGCTCAA
plu1916-R	qRT-PCR on <i>flgC</i> gene	CAACACGGAAAACCACCTGT
plu1936-F	qRT-PCR on <i>fliR</i> gene	CTGATCCAGTTCGTCAAGTGAA
plu1936-R	qRT-PCR on <i>fliR</i> gene	GGTTGCAGGTTTGGCATCAA
plu1942-F	qRT-PCR on <i>fliL</i> gene	ACTGTTAGTACTGATTGCCGT
plu1942-R	qRT-PCR on <i>fliL</i> gene	ATGGCTTTAGATGCCGCAGA
plu1954-F	qRT-PCR on <i>fliC</i> gene	CTTGAATAGATCCCAGGGTACTTTG
plu1954-R	qRT-PCR on <i>fliC</i> gene	TAGAGATACCGTCATTAGCGTTACG
plu1956-F	qRT-PCR on <i>fliZ</i> gene	CAACACAAAAGAAACGGCCG
plu1956-R	qRT-PCR on <i>fliZ</i> gene	TCAATCAACTCCGTCATCTCG
plu0261-F	qRT-PCR on <i>madA</i> gene	AATGCGGCGAATAATGCCAT

plu0261-R	qRT-PCR on <i>madA</i> gene	TTTGAAATTCCTGCGCCTGG
plu0075-F	qRT-PCR on <i>sodA</i> gene	CCTCATTTTGATAAGCAGACGATGG
plu0075-R	qRT-PCR on <i>sodA</i> gene	AGTTGTGCCTAATTTTCAGACCTTTC
plu0514-F	qRT-PCR on <i>tcaZ</i> gene	ATGGCATTAAAAGGTGTGATTGCTG
plu0514-R	qRT-PCR on <i>tcaZ</i> gene	CAAATCGAGGAATTTTAGTCAGGGG
plu1253-F	qRT-PCR on <i>luxS</i> gene	CTGTTGACCATACTCGAATGAATGC
plu1253-R	qRT-PCR on <i>luxS</i> gene	AATAATTTCAACGCCCTCACCATTG
Plu2360-F	qRT-PCR on <i>manA</i> gene	AGTTTCAGATAGCTTTCACCGTTTG
Plu2360-R	qRT-PCR on <i>manA</i> gene	AAGGGGTAAGGGCATAAACCAATTC
plu3788-F	qRT-PCR on <i>lopT</i> gene	GTAAATCCCTGAAAGTCTCTTCCCC
plu3788-R	qRT-PCR on <i>lopT</i> gene	AGAATTTTGAACACTCCCTAACGTG
upF-plu0087	Disruption of <i>dam</i> gene	TGGACTGCAGCGGCTAAATCAAACCATCG
upR-plu0087	Disruption of <i>dam</i> gene	TGGTGGATCCCGCCAACAAATGGCTCTATC
dnF-plu0087	Disruption of <i>dam</i> gene	TGGTGGATCCCGGGAGCAATTTAACCAAAG
dnR-plu0087	Disruption of <i>dam</i> gene	TGGATCTAGATCATCCCTTAATTGCCAAGC

^a Restriction enzyme sites are underlined

Supplementary Table S2 : List of 208 genes differentially expressed between the Dam-overexpressing *P. luminescens* TT01 strain and its control strain (LB culture, logarithmic phase, FDR \leq 0.005, abs(log $_2$ FC) \geq 1)

* ratio Dam+/control (blue, overexpressed in Dam+ strain; red, underexpressed in Dam+ strain)

Highlighted functions:

- Flagellar genes (13 genes differentially regulated / 49 genes in the genome)**
- pil/fimbriae genes (16 genes differentially regulated / 76 genes in the genome), as defined by Duchaud et al 2003**
- **** Mutation of these genes in *Photobacterium* (or their ortholog in *Xenorhabdus*) influences the infection process in lepidopteran larvae (as described by Nielsen-Leroux et al., 2012)
- "N"** functional category (COG classification)

the *dam* gene is in bold type

Label	Type	Name	Product	Begin	End	Length	Frame	normalized average read count	log2 fold change *	adjusted pvalue (FDR)	Primary COG_ID				Secondary COG_ID (if any)				
											COG #	Functional categories (letter)	Functional categories (detailed)	Broad functional category	COG #	Functional categories (letter)	Functional categories (detailed)	Broad functional category	
plu0012	CD5	pts23	Phage tail protein	14517	14636	120	-2	205	1.5	1.51E-03	Unknown								
plu0013	CD5	pts22	Phage tail protein	14651	14968	318	-3	493	1.68	7.65E-05	Unknown								
plu0014	CD5	pts21	Major phage tail tube protein	14995	15510	516	-1	771	1.7	3.11E-05	COG3498	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu0015	CD5	pts20	Major phage tail sheath protein	15521	16693	1173	-3	1173	1.87	1.92E-06	COG3497	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu0022	CD5	pts13	Phage tail protein	20546	21260	615	-2	260	1.04	3.79E-02	COG4385	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu0024	CD5	pts11	Phage baseplate assembly protein	22256	22597	342	-3	149	1.15	3.78E-02	COG3228	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu0025	CD5	pts10	Phage-related baseplate assembly protein	22597	23439	843	-1	128	1.42	7.08E-03	COG4540	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu0052	CD5	asnA	Asparilate--ammonia ligase (Asparagine synthetase A)	46030	47022	993	1	10400	-1.4	7.16E-03	COG2502	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM					
plu0087	CD5	dam	DNA adenine methylase (Deoxyadenosyl-methyltransferase)	81849	82661	813	-2	17800	5.27	1.64E-24	COG0338	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu0136	CD5	-	conserved hypothetical protein	143880	144713	834	3	180	1.22	2.21E-02	COG0827	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu0169	CD5	-	hypothetical protein	180224	180394	171	2	391	-1.12	1.18E-02	Unknown								
plu0180	CD5	-	conserved hypothetical protein	191028	191300	273	-2	554	-1.05	2.93E-02	COG4453	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu0224	CD5	-	conserved hypothetical protein	229778	230323	546	-3	227	1.59	1.46E-03	Unknown								
plu0225	CD5	-	Putative TpsA-related protein	230329	235488	5160	-1	3256	1.3	4.52E-03	COG3210	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu0254	CD5	-	Putative functional antitoxin of the RelE-RelB toxin-antitoxin syst	271540	271794	255	1	389	-1.09	1.75E-02	COG3077	V	Defense mechanisms						
plu0255	CD5	-	putative toxin of the RelE-RelB toxin-antitoxin system; Qjn proph	271784	272074	291	2	596	-1.12	9.29E-03	COG2026	V	Defense mechanisms						
plu0261	CD5	madA	fimbrial protein MadA	277866	278471	606	3	387	-1.1	1.67E-02	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0263	CD5	madC	fimbrial protein MadC	279376	279948	573	1	255	-1.01	3.27E-02	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0264	CD5	madD	fimbrial protein MadD	280016	280738	723	2	342	-1.02	8.44E-03	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0279	CD5	-	putative hypothetical secreted protein of Photobacterium	295804	296493	690	-1	1174	-1.43	2.61E-04	Unknown								
plu0285	CD5	-	conserved hypothetical protein	301670	302125	456	-3	456	-1.56	2.42E-04	COG0328	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	COG3077	V	Antitoxin component of the RelBE or YafQ-DinJ toxin-antitoxin module		
plu0321	CD5	-	-	345064	345411	348	1	12	1.79	2.46E-02	COG1263	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM					
plu0335	CD5	-	Putative tmpA protein, N-terminal (domain IPR010657)	355899	356792	894	-2	49	1.33	2.77E-02	COG3515	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu0336	CD5	-	Putative Type VI secretion system IcmF, C-terminal (domain IPRC	356888	360433	3546	-3	120	1.16	3.57E-02	COG3523	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu0354	CD5	-	Conserved hypothetical protein	377114	377533	420	-3	128	1.19	3.57E-02	COG5435	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu0355	CD5	-	Putative Type VI secretion system, RhsGE-associated Vgr protein	377581	379476	1896	-1	258	1.47	8.03E-04	COG3501	UXR							
plu0356	CD5	-	Truncated gene; similarities with putative component of Type VI	379498	380175	678	-1	121	1.3	1.18E-02	COG3515	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu0417	CD5	-	-	446415	447017	603	-2	302	-1.4	1.58E-03	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0418	CD5	-	Major structural subunit MPrA of Proteus mirabilis	447141	447707	567	-2	2094	-1.01	2.03E-06	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0470	CD5	malP	maltodextrin phosphorylase	506182	508584	2403	-1	424	1.15	1.84E-02	COG0058	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM					
plu0531	CD5	-	hypothetical protein	586977	587129	153	3	27	1.31	3.03E-02	Unknown								
plu0563	CD5	thrA	aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I	636040	638499	2460	1	4389	-1.36	6.35E-03	COG0460	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM	COG0527	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM	
plu0587	CD5	nhaA	Na(+)/H(+) antiporter 1 (sodium/proton antiporter 1)	668004	669170	1167	3	2037	-1.52	4.32E-04	COG3004	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM					
plu0706	CD5	-	HicB-like protein	816018	816374	357	-2	2086	-1.48	2.36E-04	COG4226	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED					
plu0707	CD5	-	HicA-like protein	816371	816646	276	-3	1571	-1.52	3.30E-04	Unknown								
plu0769	CD5	mrfa	Major fimbrial subunit polypeptide, MrfA	888552	889091	540	3	175	-1.55	8.19E-06	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0770	CD5	mrfb	Fimbrial pilin protein precursor, MrfB	889175	889723	549	2	101	-1.25	3.57E-02	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0786	CD5	-	Conserved hypothetical protein. Probable transmembrane prote	905365	905925	561	1	490	-0.90	1.53E-06	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0787	CD5	-	putative fimbrial chaperone	906027	906743	717	3	235	1.17	2.49E-02	COG3121	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	COG3121	U	Intracellular trafficking, secretion, and cellular processes and signaling		
plu0792	CD5	-	conserved hypothetical protein	911804	912958	1155	2	426	-1.01	4.48E-02	COG0741	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu0866	CD5	-	putative proteic killer suppression protein	993308	993589	282	-3	88	-1.11	4.44E-02	COG3549	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED					
plu0890	CD5	-	putative pycocin S3 immunity protein	1016619	1017086	468	3	43	-1.48	3.86E-02	Unknown								
plu0922	CD5	-	-	1062305	1063027	723	-3	1141	-1.26	2.03E-03	COG2197	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	COG2197	T	Signal transduction mechanisms	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	
plu0927	CD5	-	putative MFS transporter	1068465	1069637	1173	-2	110	1.2	3.57E-02	COG2814	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM					
plu0959	CD5	-	conserved hypothetical protein	1098942	1099238	297	-2	107	-1.71	1.30E-04	COG4453	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu0977	CD5	phfS	PHfC protein, putative adhesion protein, fimbriae	1188182	1188121	910	-3	498	-1.39	8.83E-05	COG3539	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu1021	CD5	-	-	1203054	1203223	270	-2	32	1.44	3.57E-02	COG3344	X	Mobilome: prophages, transposons						
plu1049	CD5	pilI	-	1227925	1228974	1050	1	174	-1.25	3.57E-02	COG3266	D	Cell cycle control, cell division, chromosome	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu1064	CD5	-	putative DNA-binding prophage protein	1241604	1241915	312	-2	3526	-1.09	3.57E-02	COG3636	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu1097	CD5	-	Conserved hypothetical protein	1267164	1267526	363	3	61	1.33	4.42E-02	Unknown								
plu1140	CD5	-	conserved hypothetical protein	1320126	1321181	1056	-2	117	2.21	1.77E-06	COG3210	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu1209	CD5	-	putative membrane protein	1389961	1390977	1017	-1	95	-1.3	1.64E-02	COG4104	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport						
plu1223	CD5	-	conserved hypothetical protein	1416046	1416384	339	-1	11600	-1.16	4.48E-02	COG5606	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED					
plu1224	CD5	-	conserved hypothetical protein	1416365	1416745	381	-3	9118	-1.22	2.93E-02	COG4679	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu1342	CD5	-	-	1589606	1590259	654	2	103	1.18	2.32E-02	COG2931	Q	Secondary metabolites biosynthesis, trans	METABOLISM	COG1073	T			
plu1359	CD5	-	-	1621192	1622322	1131	-1	9	2.86	2.80E-04	COG4974	K	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu1402	CD5	-	putative transcriptional regulator	1684697	1684981	285	-3	1187	-2.16	1.02E-08	COG2944	L	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu1403	CD5	-	conserved hypothetical protein	1684983	1685156	174	-2	1086	-1.86	1.17E-06	COG4737	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu1404	CD5	-	conserved hypothetical protein	1685147	1685314	168	-3	628	-1.58	7.68E-05	COG4737	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu1476	CD5	modA	molybdate-binding periplasmic protein precursor	1770069	1770339	771	3	497	-1.07	3.03E-02	COG0725	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM					
plu1482	CD5	-	hypothetical protein	1775312	1775986	675	2	298	-1.54	3.47E-04	COG1893	H	Coenzyme transport and metabolism	METABOLISM					
plu1537**	CD5	pit	Insecticidal crystal-related protein Pit	1838326	1838736	411	-1	1041	1.89	3.92E-06	Unknown								
plu1561	CD5	-	Putative calcium-dependent cell adhesion molecule-1 of Dictyost	1866612	1867232	621	-2	114	1.48	7.93E-03	Unknown								
plu1608	CD5	-	conserved hypothetical protein	1921727	1922050	324	-3	73	-1.68	8.03E-04	COG5473	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED	COG0494	V			
plu1617	CD5	-	conserved hypothetical protein	1933264	1933539	276	1	2587	-1.03	4.70E-02	COG4453	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED					
plu1641	CD5	-	conserved hypothetical protein	1961833	1962453	621	-1	2159	-1.28	6.90E-03	Unknown								
plu1685	CD5	-	conserved hypothetical protein	2010883	2011341	459	-1	38	1.73	5.69E-03	Unknown								
plu1688	CD5	-	conserved hypothetical protein	2014005	2015087	1083	-2	56	1.49	1.20E-02	COG3497	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED					
plu1717	CD5	-	conserved hypothetical protein	2048099	2049754	1656	-3	23	1.43	4.44E-02	COG1196	D	Cell cycle control, cell division, chromosome	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu1727	CD5	-	conserved hypothetical protein	2061031	2062215	1185	-1	105	1.17	4.77E-02	COG3497	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED					
plu1776	CD5	suIA	Cell division inhibitor SuIA	2119585	2120118	534	-1	407	-1.04	2.98E-02	COG5404	D	Cell cycle control, cell division, chromosome	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING					
plu1784	CD5	ycyV	Hemimethylated oriC DNA-binding protein; weak repressor of dr	2128483	2128803	321	-1	1794	-1.18	1.01E-02	COG3785	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones						
plu1788	CD5	ISPu3v	Transposase, IS630 family	2131018	2132043	1026	1	3	-2.5	3.67E-02	COG3385	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING					
plu1803																			

plu1854	CDS	tap	-	2202807	2204441	1635	3	461	-1.11	2.40E-02	COG0840	T	Signal transduction mechanisms	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1863	CDS	-	Hypothetical protein	2209346	2209504	159	-3	66	-1.47	6.50E-03	Unknown			
plu1864	CDS	-	Truncated gene, Putative phosphoenolpyruvate phosphomutase	2210011	2210184	174	1	80	-1.22	1.04E-02	COG0615	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1865	CDS	-	Truncated gene, Putative phosphoenolpyruvate phosphomutase	2210256	2210996	74	3	59	-1.31	2.54E-02	COG2513	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM
plu1879	CDS	glbB	Similar to protein encoded in the glidobactin A synthetase gene I	2225254	2226519	1266	-1	222	1.14	3.27E-02	COG0477	GEPR		
plu1899	CDS	-	conserved hypothetical protein	2262599	2263042	444	2	20	1.48	3.45E-02	COG1048	C	Energy production and conversion	METABOLISM
plu1913	CDS	flgM	Negative regulator of flagellin synthesis (Anti-sigma-28 factor) Fl	2280636	2280938	303	-2	545	-1.11	2.43E-02	COG2747	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu1924	CDS	flgK	Flagellar hook-associated protein 1 (HAP1)	2289341	2290990	1650	2	400	-1.45	6.74E-04	COG1256	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1925	CDS	flgL	Flagellar hook-associated protein 3 (HAP3) (Hook-filament juncti	2291005	2292030	966	1	518	-1.63	4.62E-05	COG1344	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1951	CDS	flit	Flagellar protein FlIT	2317465	2317842	378	-1	66	-1.23	1.84E-02	Unknown			
plu1952	CDS	flIS	Flagellar protein FlIS	2317842	2318252	411	-2	105	-1.21	2.13E-02	COG1516	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1953	CDS	flrD	Flagellar hook-associated protein 2 (HAP2) (Filament cap protein	2318265	2319586	1422	-2	670	-1.08	1.76E-08	COG1345	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1954	CDS	flrC	Flagellin	2319861	2321028	1068	-1	563	-1.35	1.07E-16	COG1344	N	Cell motility	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu1961	CDS	phaxB1	PhaxB1, similar to binary toxin XaxB of Xenorhabdus nematophil	2331853	2332881	1029	-1	67	-1.64	6.12E-04	COG0419	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu1962	CDS	phaxA1	PhaxA1, similar to binary toxin XaxA of Xenorhabdus nematophil	2332924	2334162	1239	-1	139	-1.44	8.03E-04	Unknown			
plu1973	CDS	-	hypothetical protein	2347205	2347441	237	2	1041	-1.28	1.39E-03	Unknown			
plu1974	CDS	-	conserved hypothetical protein	2347410	2347739	330	3	2208	-1.16	4.85E-03	COG2026	V	Defense mechanisms	
plu1986	CDS	-	hypothetical protein	2355775	2356209	435	-1	38	-1.31	2.40E-02	COG2771	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2017	CDS	-	conserved hypothetical protein	2385147	2385434	288	3	13	1.65	3.42E-02	COG4104	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	
plu2031	CDS	-	Conserved hypothetical protein	2401213	2401551	339	1	228	-1.15	2.12E-02	COG1226	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM
plu2032	CDS	uspG	Universal stress protein G	2401730	2402167	438	2	252	-1.37	1.93E-03	COG0589	T	Signal transduction mechanisms	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2077	CDS	-	hypothetical protein	2461846	2462130	285	1	1512	-1.14	1.04E-02	COG4972	NW		
plu2082	CDS	luxB	Alkanal monoxygenase beta chain (luciferase beta subunit)	2466759	2467733	975	3	180	-1.09	3.57E-02	COG2141	C	Energy production and conversion	METABOLISM
plu2083	CDS	luxE	Acyl-protein synthetase (long-chain-fatty-acid-luciferin-compone	2467795	2468907	1113	1	93	-1.26	2.51E-02	COG1541	H	Coenzyme transport and metabolism	METABOLISM
plu2143	CDS	-	hypothetical protein	2525735	2526553	821	-2	127	-1.21	4.51E-02	Unknown			
plu2211	CDS	ureA	Urease gamma subunit (Urea amidohydrolase)	2557998	2558300	303	3	356	-1.11	3.27E-02	COG0881	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM
plu2211	CDS	-	conserved hypothetical protein	2558182	2598627	456	-9	209	-1.55	1.51E-03	COG0328	GEPR		
plu2250	CDS	-	conserved hypothetical protein	2648666	2646108	243	1	1392	-1.03	4.32E-02	COG3609	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2252	CDS	-	conserved hypothetical protein	2646494	2646784	291	2	322	-1.07	4.42E-02	COG1598	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu2265	CDS	-	conserved hypothetical protein	2662679	2662930	252	-3	253	-1.15	1.51E-02	COG2161	D	Cell cycle control, cell division, chromosome	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2268	CDS	-	-	2666118	2666579	462	3	106	-1.12	3.50E-02	COG3311	KX		
plu2277	CDS	-	conserved hypothetical protein	2675668	2676039	372	1	770	-1.03	3.56E-02	COG0346	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM
plu2307	CDS	-	-	2706888	2707022	135	-2	78	-2.59	2.55E-07	COG1487	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED
plu2308	CDS	-	conserved hypothetical protein	2707235	2707513	279	-3	2211	-1.18	1.56E-02	COG3636	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2309	CDS	-	conserved hypothetical protein	2707510	2707812	303	-1	950	-1.66	4.96E-05	COG3657	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu2328	CDS	-	-	2747264	2747920	657	-3	229	-1.27	7.54E-03	COG2755	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM
plu2329	CDS	-	-	2747927	2748127	201	-3	188	-1.33	7.06E-03	COG4644	X	Mobilome: prophages, transposons	
plu2330	CDS	-	putative the plasmid stabilization ParD protein	2748978	2749232	255	3	309	-1.27	7.08E-03	Unknown			
plu2351	CDS	-	conserved hypothetical protein	2770570	2771403	834	-1	862	-1.01	4.47E-02	COG0702	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2365	CDS	-	putative plasmid stable inheritance protein K	2783821	2784310	390	-3	2178	-1.01	3.20E-02	COG2336	T	Signal transduction mechanisms	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2366	CDS	-	putative plasmid stable inheritance protein I	2784255	2784512	258	-2	1913	-1	3.91E-02	COG2336	T	Signal transduction mechanisms	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2369	CDS	-	conserved hypothetical protein	2785156	2785719	204	-1	1913	-1.05	3.42E-02	COG4540	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2434	CDS	cysB	Cys regulon transcriptional activator	2856686	2857660	975	-3	1222	-1.02	3.02E-02	COG0583	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2460*	CDS	tccA2	Insecticidal toxin complex protein TccA2	2895541	2899062	3522	-1	115	1.2	3.57E-02	COG3206	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2461	CDS	-	Similar to exochitinase	2899159	2900793	1635	-1	100	1.24	2.06E-02	COG3325	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM
plu2480	CDS	ail1	All protein precursor of Yersinia	2920701	2921228	528	-2	4614	-1.2	6.50E-03	COG3637	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu2565	CDS	-	-	3010375	3010692	318	-1	308	-1.08	2.12E-02	COG3042	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED
plu2580	CDS	tyrR	Transcriptional regulatory protein TyrR	3021998	3023581	1584	-3	904	-1.02	3.79E-02	COG3283	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2638	CDS	pqrA	Regulatory protein PqrA (AraC/XylS family)	3088162	3088527	366	1	407	-1.95	4.29E-07	COG2207	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2651	CDS	-	conserved hypothetical protein	3104667	3104993	327	-2	244	-1.39	3.63E-03	COG4453	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu2687	CDS	yebZ	-	3190475	3191368	894	-3	1009	-1.12	8.20E-03	COG1276	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM
plu2688	CDS	yoBA	-	3191371	3191757	387	-1	504	-1.27	4.49E-03	COG2372	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM
plu2689	CDS	ftnA	nonheme ferritin 1	3191952	3192455	504	-2	3697	-1.19	6.82E-03	COG1528	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM
plu2707	CDS	-	conserved hypothetical protein	3209538	3209798	261	3	14	-1.41	3.79E-02	COG1396	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2819	CDS	-	-	3348696	3349283	588	3	48	-1.23	3.79E-02	COG0127	F	Nucleotide transport and metabolism	METABOLISM
plu2846	CDS	-	-	3377040	3377321	282	3	1309	-1.1	2.13E-02	COG1396	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
plu2897	CDS	-	hypothetical protein	3425672	3426157	486	-3	102	1.24	1.89E-02	Unknown			
plu2898	CDS	-	conserved hypothetical protein	3426160	3427317	1158	-1	128	1.09	4.47E-02	COG3566	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu2899	CDS	-	conserved hypothetical protein	3427321	3428133	813	-1	83	1.33	1.89E-02	COG2369	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu2932	CDS	-	-	3446861	3447283	423	2	11	2.33	2.46E-03	Unknown			
plu2933	CDS	-	Similar to bacteriophage protein	3447353	3448255	903	2	39	1.33	3.57E-02	Unknown			
plu2946	CDS	-	hypothetical protein	3454621	3454839	219	1	5	2.1	1.89E-02	Unknown			
plu2998	CDS	cbiB	CbiB protein	3498179	3499138	960	-3	210	1.24	1.18E-02	COG1270	H	Coenzyme transport and metabolism	METABOLISM
plu3003	CDS	-	conserved hypothetical protein	3504922	3505212	291	1	1320	-1.08	2.92E-02	COG3093	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED
plu3014	CDS	-	putative phage protein	3514650	3515003	354	3	19	-1.58	1.84E-02	COG1598	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu3021	CDS	-	putative sigma protein	3522745	3523173	429	-1	88	-1.14	4.70E-02	COG1598	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED
plu3057	CDS	-	putative plasmid stability protein (pII domain)	3561555	3561974	420	-2	2454	-1.05	4.17E-02	COG1487	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED
plu3058	CDS	-	putative plasmid stability protein	3561971	3562210	240	-3	1152	-1.03	3.89E-02	COG4691	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED
plu3101	CDS	-	conserved hypothetical protein	3619962	3620591	630	-2	60	1.51	1.15E-02	Unknown			
plu3109	CDS	astA	arginine N-succinyltransferase (AOST)	3630459	3631490	1032	-2	166	1.65	1.45E-04	COG3138	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM
plu3110	CDS	argM	succinylornithine transaminase (succinylornithine aminotransfer	3631512	3632720	1209	-2	185	1.05	3.47E-02	COG4992	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM
plu3156	CDS	-	-	3715712	3716482	771	-3	83	-1.46	1.02E-02	Unknown			
plu3176*	CDS	tcc22	-	3736581	3736823	243	-2	98	-1.94	3.42E-05	Unknown			
plu3253	CDS	-	Putative Type VI secretion system, RhsGE-associated Vgr protein	3852594	3855122	2529	-2	211	1.17	1.79E-02	COG3501	UMR		
plu3255	CDS	-	Putative Outer membrane protein, (OmpA/MotB domain) IPO06	3855809	3857536	1728	-3	531	1.19	7.72E-03	COG2885	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
plu3260	CDS	-	putative Type VI secretion protein, VC_A0314 (IPRO10263)	3860551	3861900	1350	-1	1310	-1.14	2.54E-02	COG3522	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	
plu3261	CDS	-	putative type VI secretion protein, EvpB/VC_A0308, tail sheath (i	3861916	3863442	1527	-1	2248	-1.92	3.92E-06	COG3517	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	
plu3262	CDS	-	putative Type VI secretion system, Vipa, VC_A0307 or Hcp2 (don	3863474	3863971	498	-3	806	-2.33	2.97E-09	COG3516	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	
plu3331	CDS	-	Weakly similar to putative P2 tail fiber protein H and RNA polym	3961157										

plu3756	CDS	lopB	Translocator proteins LopB	4426297	4427475	1179	-1	2052	-1.01	4.77E-02	COG5613	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED			
plu3856	CDS	amtB	Probable ammonium transport protein AmtB	4529787	4531106	1320	-2	220	1.06	3.45E-02	COG0004	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM			
plu3938	CDS	-	conserved hypothetical protein	4623441	4624040	600	3	573	-1.21	7.51E-03	Unknown						
plu4172	CDS	-	putative pyocin S3 immunity protein and to Phtorhabdus lumin	4878614	4879081	468	-3	532	-1.24	4.49E-03	Unknown						
plu4173	CDS	-	-	4879191	4879652	462	-2	196	-1.05	3.57E-02	Unknown						
plu4217	CDS	-	Conserved hypothetical protein. Putative membrane protein	4932024	4932692	669	-2	104	-1.17	4.48E-02	Unknown						
plu4233	CDS	-	putative membrane protein	4956862	4957422	561	-1	331	-1.04	3.67E-02	COG0705	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4248	CDS	osmY	Osmotically inducible protein Y precursor	4970837	4971214	378	-3	350	-1.28	4.83E-03	COG2823	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4267	CDS	-	-	4992386	4993351	966	2	7	1.77	2.49E-02	COG0683	E	Amino acid transport and metabolism	METABOLISM			
plu4352	CDS	yeiC	Putative kinase YeiC protein of Escherichia coli	5085038	5086123	1086	-3	36	1.39	4.42E-02	COG0524	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM			
plu4446	CDS	fecA	Iron(III) dicitrate outer membrane transporter precursor protein	5194611	5196971	2361	3	3299	1	3.89E-02	COG4772	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM	COG1629	P	Inorganic ion transport and metabolism
plu4448	CDS	fecC	Iron(III) dicitrate transport system permease protein FecC	5197936	5198934	999	1	352	1.19	1.55E-02	COG0609	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM			
plu4449	CDS	fecD	Iron(III) dicitrate transport system permease protein FecD	5198931	5199887	957	3	306	1.31	4.34E-03	COG0609	P	Inorganic ion transport and metabolism	METABOLISM			
plu4468	CDS	-	hypothetical protein	5221667	5221978	312	-3	43	1.22	4.48E-02	Unknown						
plu4470	CDS	-	putative integrase	5222567	5223433	867	2	102	1.54	4.06E-03	COG0582	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	COG1516	O	Posttranslational modification, protei
plu4471	CDS	-	-	5223587	5224729	1143	2	350	1.09	2.95E-02	COG3598	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
plu4612	CDS	-	-	5376454	5376708	255	-1	109	1.33	1.89E-02	COG3385	X	Mobilome: prophages, transposons				
plu4694	CDS	smf	Smf protein	5478193	5479278	1086	-1	1297	1.04	3.29E-02	COG0758	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	COG0758	U	Intracellular trafficking, secretion, anc
plu4731	CDS	coaA	pantothenate kinase (pantothenic acid kinase)	5502515	5503465	951	2	235	1.19	2.86E-02	COG1072	H	Coenzyme transport and metabolism	METABOLISM			
plu4748	CDS	-	Conserved hypothetical protein; putative secreted protein	5528419	5529000	582	1	1225	1.46	6.20E-04	Unknown						
plu4781	CDS	-	conserved hypothetical protein	5561171	5561497	327	2	1407	-1.3	1.62E-03	COG4679	S	Function unknown	POORLY CHARACTERIZED			
plu4782	CDS	-	conserved hypothetical protein	5561494	5561832	339	1	420	-1.28	9.55E-04	COG5606	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4786	CDS	-	-	5563680	5563865	186	3	334	-2.22	6.41E-08	COG3549	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4787	CDS	-	-	5563807	5563959	153	1	424	-2.25	1.17E-08	COG3549	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4788	CDS	-	putative proteic killer active protein Hig B of plasmid Rts1	5563959	5564273	315	3	2006	-1.98	4.53E-07	COG3093	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4789	CDS	-	-	5564298	5564486	189	3	470	-2.45	7.75E-10	COG2944	K	Transcription				
plu4790	CDS	-	putative bacteriophage integrase	5564508	5564930	423	3	534	-2.36	2.97E-09	COG0582	L	Replication, recombination and repair	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
plu4796	CDS	wblA	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase (WblA protein)	5569740	5571050	1311	3	79	1.29	2.40E-02	COG0677	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING			
plu4797	CDS	wblB	Myo-inositol 2-dehydrogenase (WblB protein)	5571065	5572114	1050	2	133	1.33	1.84E-02	COG0673	R	General function prediction only	POORLY CHARACTERIZED			
plu4801	CDS	wblE	WblE protein	5575036	5576142	1107	1	6	3.05	3.95E-04	COG5017	G	Carbohydrate transport and metabolism	METABOLISM			
pluCD516291	CDS	-	-	1629184	1629867	684	-1	165	-1.58	3.51E-04	Unknown						
pluCD522408	CDS	glbE	Similar to protein encoded in the glidobactin A synthetase gene i	2240665	2240847	183	1	40	-1.8	1.55E-03	COG3039	X	Mobilome: prophages, transposons				
pluCD525560	CDS	-	-	2556076	2556432	357	-1	558	-1.37	1.51E-03	COG3905	K	Transcription	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
pluRNAS502	tRNA	-	transfert RNA-Thr	5502009	5502084	76	-1	8241	1.3	7.37E-03							

References

- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., and Kunst, F. (2003) The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol* 21, 1307-1311.
- Nielsen-Leroux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., and Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr Opin Microbiol* 15, 220-23

Supplementary Table S3

List of 49 flagellar genes found in *P. luminescens* TT01 strain, and their differential expression level between the Dam-overexpressing strain and its control strain, based on RNAseq data

* ratio Dam+ strain/control strain (red, underexpressed in the Dam overexpressing strain)

** Bold, p value<0.05

The putative operonic structure is indicated by blue arrows beside the genes' name based on data from *E. coli* and *Salmonella* (Chilcott et al., 2000)

	plu	Gene name		log2 fold change*	adjusted pvalue (FDR)**	
Cluster I	plu1847	flhD	↓	-1.05	0.04	
	plu1848	flhC	↓	-1.15	0.01	
	plu1849	motA	↓	-1.09	0.04	
	plu1850	motB	↓	-0.82	0.12	
	plu1851	cheA	↓	-0.61	0.30	
	plu1852	cheW	↓	-0.55	0.33	
	plu1853	cheD	↓	-1.80	0.00	
	plu1854	tap	↓	-1.11	0.02	
	plu1855	cheR	↓	-0.68	0.34	
	plu1856	cheB	↓	-0.45	0.62	
	plu1857	cheY	↓	-0.66	0.27	
	plu1858	cheZ	↓	-0.60	0.33	
	Cluster II	plu1895	flhB	↓	0.00	1.00
		plu1896	flhA	↓	-0.27	0.67
Cluster III	plu1912	flgN	↑	-0.87	0.09	
	plu1913	flgM	↑	-1.11	0.02	
	plu1914	flgA	↑	-0.46	0.53	
	plu1915	flgB	↑	-0.91	0.03	
	plu1916	flgC	↑	-0.59	0.20	
	plu1917	flgD	↑	-0.57	0.22	
	plu1918	flgE	↑	-0.63	0.16	
	plu1919	flgF	↑	-0.47	0.34	
	plu1920	flgG	↑	-0.75	0.11	
	plu1921	flgH	↑	-0.13	0.91	
	plu1922	flgI	↑	-0.14	0.88	
	plu1923	flgJ	↑	-0.05	0.97	
	plu1924	flgK	↑	-1.45	0.00	
	plu1925	flgL	↑	-1.63	0.00	
Cluster IV	plu1936	fliR	↑	-0.32	0.63	
	plu1937	fliQ	↑	-0.47	0.51	
	plu1938	fliP	↑	-0.25	0.65	
	plu1939	fliO	↑	-0.34	0.51	
	plu1940	fliN	↑	-0.49	0.29	
	plu1941	fliM	↑	-0.58	0.18	
	plu1942	fliL	↑	-0.58	0.16	
	plu1943	fliK	↑	-0.37	0.50	
	plu1944	fliJ	↑	-0.23	0.82	
	plu1945	fliI	↑	-0.06	0.91	
	plu1946	fliH	↑	-0.29	0.62	
	plu1947	fliG	↑	-0.36	0.46	
	plu1948	fliF	↑	-0.44	0.33	
	plu1949	fliE	↑	-0.30	0.63	
plu1951	fliT	↑	-1.23	0.02		
plu1952	fliS	↑	-1.21	0.02		
plu1953	fliD	↓	-2.08	0.00		
plu1954	fliC	↓	-3.35	0.00		
plu1955	fliA	↓	-0.38	0.66		
plu1956	fliZ	↓	-0.51	0.30		

Reference

Chilcott, G. S., and K. T. Hughes. 2000.

Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:694-708

Supplementary Table S4

P. luminescens genes putatively involved in regulation of the chromosome replication, in mismatch repair (MMR), in double strand breaks (DSBs) repair and/or required for viability of *dam* mutants in other bacterial species. None of them showed a significant difference in expression in the *P. luminescens dam*-overexpressing strain.

Label	Begin	End	Length	Frame	Gene	Product	log2FoldChange	padj
plu0001	234	1622	1389	3	dnaA	Chromosomal replication initiator protein DnaA	-0.0518207589055677	0.997680032068507
plu0002	1627	2727	1101	1	dnaN	DNA polymerase III, beta chain	0.846304397460403	0.201662965393312
plu0003	2749	3840	1092	1	recF	DNA replication and repair protein	0.0846176574906654	0.970697136537198
plu0004	3860	6274	2415	2	gyrB	DNA gyrase subunit B	-0.0697211500242034	0.997680032068507
plu0005	6415	6894	480	1	_	Similar to Hcp protein	-0.0658956468439219	0.969630004815419
plu0050	44870	45310	441	-3	mioC	Protein mioC, involved in modulation of initiation at oriC, initiation of chromosome replication	-0.189801532644711	0.927841228043529
plu0339	362659	363132	474	1	vsr	Very short patch repair protein (DNA mismatch endonuclease) (Vsr mismatch endonuclease) (V.EcoKDCm)	-0.0100259517205973	0.995080928223759
plu0386	417018	419807	2790	3	polA	DNA polymerase I	0.083135162159989	0.968202378227714
plu0552	622889	624271	1383	2	radA	DNA repair protein RadA (sms)	0.18236546861866	0.923190120101124
plu0630	713763	717152	3390	3	recC	Exodeoxyribonuclease V gamma chain	-0.181579648744075	0.934203506186693
plu0632	720056	723664	3609	2	recB	Exodeoxyribonuclease V beta chain	0.0515759450379597	0.977003021015846
plu0722	830921	833476	2556	-3	mutS	DNA mismatch repair protein MutS	-0.113316130588219	0.977029176398937
plu1169	1353493	1354530	1038	-1	mutY	A/G-specific adenine glycosylase	-0.152872592493022	0.950845828359512
plu1249	1444202	1445269	1068	2	recA	RecA protein (Recombinase A)	-0.132698828293765	0.971766894615316
plu1406	1688390	1688914	525	2	seqA	SeqA protein, negative modulator of initiation of replication	-0.140905687617962	0.949619215739893
plu1784	2128483	2128803	321	-1	yccV	Hemimethylated oriC DNA-binding protein; weak repressor of dnaA transcription	-1.15062174589762	0.051094815936547
plu2110	2493753	2494274	522	3	ruvC	crossover junction endodeoxyribonuclease (Holliday junction nuclease RuvC) (Holliday junction resolvase RuvC)	-0.338803074503579	0.918856365490837
plu2111	2494361	2494978	618	2	ruvA	Holliday junction DNA helicase	-0.320273206059374	0.852105764563787
plu2112	2494995	2496002	1008	3	ruvB	Holliday junction DNA helicase	-0.425321467478446	0.866155280934776
plu2752	3263456	3264157	702	-3	hda	Required for regulatory inactivation of DnaA; multicopy suppressor of dnaN(ts) (by simialrity)	-0.319158123817258	0.891005488344538
plu2815	3341618	3345064	3447	2	mfd	transcription-repair coupling factor (TRCF)	-0.110958801845131	0.977029176398937
plu2859	3394549	3394968	420	1	_	putative Mut family protein	-0.135463956599561	0.950845828359512
plu3338	3965785	3966510	726	-1	recO	DNA repair protein recO (recombination protein O)	0.344909149968757	0.80653343217027
plu3374	4002348	4004009	1662	3	recN	DNA repair protein recN (recombination protein N)	-0.149412065969804	0.931683737733771
plu3610	4258106	4259008	903	2	iciA	Chromosome initiation inhibitor (OriC replication inhibitor)	-0.332414087454454	0.836539895258107
plu3644	4291033	4291425	393	-1	mutT	Mutator mutT protein (7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase) (8-oxo-dGTPase) (dGTP pyrophosphohydrolase)	0.200449297044812	0.934339013099061
plu3678	4332988	4333674	687	1	mutH	DNA mismatch repair protein	-0.375401824183046	0.78847219117069
plu4344	5073287	5076445	3159	-3	_	putative NTPase involved in DNA repair	-0.0452502196468109	0.970697136537198
plu4374	5106205	5106810	606	-1	lexA	LexA repressor	-0.21631016426044	0.924379639012215
plu4583	5348451	5350346	1896	-2	mutL	DNA mismatch repair protein	0.167492620498627	0.917780401388868
plu4759	5540058	5542256	2199	3	priA	primosomal protein N' (replication factor Y)	0.0420304764865283	0.995080928223759
plu4857	5631647	5632456	810	-3	mutM	formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FAPY-DNA glycosylase)	-0.368105439246214	0.791036525756647
plu4865	5639239	5639931	693	-1	radC	DNA repair protein	0.216422317083523	0.96788767205344

3) La surexpression de la méthyltransférase Dam de *P.luminescens* cause une diminution de la virulence du complexe nématobactérien

Suite au précédent article, nous avons voulu étudier l'impact de la MTase Dam sur la partie symbiotique du cycle de vie de *Photorhabdus*. En effet, si de nombreux travaux ont étudiés l'impact de Dam sur la virulence bactérienne (Casadesús, 2016 pour revue), les seules études s'intéressant à son impact sur la symbiose concernent *Bradyrhizobium* (Davis-Richardson et al., 2016) et *Mesorhizobium loti* (Ichida et al., 2007 ; Ichida et al., 2009). Ces deux bactéries étant des symbiotes de plantes, il est d'autant plus intéressant d'étudier Dam dans une symbiose nématobactérienne.

Notre but a été d'étudier plusieurs paramètres permettant d'avoir une vue d'ensemble sur la symbiose. Le premier est la virulence du complexe, le second l'efficacité du cycle pathogénique (en comptant le nombre de nématodes émergeant de chaque cadavre) et enfin l'efficacité de colonisation (en dénombrant le nombre de bactéries par nématode). Du fait que durant les phases symbiotiques et le passage dans le cadavre de l'insecte on ne puisse maintenir la pression antibiotique (comme utilisé dans l'article précédent), il nous a fallu créer une souche de *P. luminescens* sur-exprimant Dam par insertion chromosomique. Nous avons pour cela utilisé en partie le protocole publié en 2015 (Glaeser and Hermann, 2015) et adapté ce dernier à nos besoins. La souche Dam+ ainsi obtenue (Chr_Dam par la suite) surexprime *dam* (x14, p-value=0.001) en comparaison du contrôle ayant le gène de la GFP inséré (Chr_GFP par la suite). Nous avons de plus observé une diminution de la mobilité de cette souche (Fig. 1A, Cf. Chapitre II.4 pour figures et tables de cette partie) et de la pathogénicité (Fig. 1B). De manière surprenante, le gène *fliC*, codant pour un flagelle, n'est pas transcrit différemment de façon significative alors que la mobilité est diminuée (Fig. S1) contrairement au gène *mad*, codant pour un pilus, qui est surexprimé (x4.3, p-value=0.001) dans cette souche.

Nous avons ensuite procédé à l'établissement de la symbiose entre *Heterorhabditis* et les deux souches de *P. luminescens in vitro* (Chr_Dam et Chr_GFP). L'établissement de cette symbiose a donné des résultats identiques pour les deux souches avec autant de nématodes monoxéniques récupérés pour chaque souche. Afin d'avoir un point de vue plus global de

cette symbiose, nous avons choisi deux insectes différents dans nos expériences. *G. mellonella* qui est l'insecte modèle de référence, et *S. littoralis* qui est un ravageur actuel et pour lequel le complexe *Heterorhabditis/Photorhabdus* peut être utilisé. Nous avons donc infesté chacun de ces insectes avec nos complexes némato-bactériens. Nous avons observé un retard significatif de 2h (p-value=0.016) dans le temps nécessaire à la souche Chr_Dam pour tuer 50% des larves de *G. mellonella* (Fig. 2A) et un retard de 6h chez *S. littoralis* (p-value<0.001). A l'inverse, le nombre de nématodes émergents des cadavres de chacune des larves ne diffère pas entre les deux souches (Fig. 3A/B). Le dernier point était le dénombrement des bactéries dans chaque nématode, une diminution de 50% du nombre de *P. luminescens* Chr_Dam retrouvées en symbiose avec le nématode en comparaison du contrôle Chr_GFP a pu être notée (p-value=0.03).

La surexpression de la MTase Dam avait déjà été démontrée au début de cette thèse comme impactant la pathogénicité et la virulence de *P. luminescens*. Un point intéressant est que cette baisse de pathogénicité est augmentée lorsque l'infestation est réalisée en utilisant le complexe némato-bactérien. Une hypothèse possible est celle de l'effet-dose. La chute plus importante dans la virulence serait liée à la différence du nombre de bactérie à l'intérieur du nématode. En effet, la souche Chr_Dam est présente en moins grande quantité dans le nématode que la souche contrôle après un cycle dans l'insecte. Il serait donc logique que lors du relargage de la bactérie dans l'hémolymphe de l'insecte, moins de bactéries pour la souche Chr_Dam soient retrouvées. Cette diminution dans le nombre de bactéries pourrait être à l'origine de cette baisse plus importante du pouvoir pathogène mais nous ne pouvons pas le prouver actuellement.

Le fait que la symbiose némato-bactérienne soit possible avec la souche Chr_Dam nous montre que le nématode peut se nourrir et s'associer avec cette souche. Ainsi, Dam ne semble pas impacter la symbiose de manière très importante malgré les résultats de pathogénicité. Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser de nombreux cycles chez l'insecte en ré-infestant les insectes avec les IJs émergents. Si notre hypothèse est correcte, le nombre de bactéries par nématode devrait diminuer au cours de ces générations pour atteindre un phénotype drastique.

En conclusion de ces travaux, on peut dire que si Dam joue un rôle dans la partie pathogène du cycle de *P. luminescens*, il n'en est peut être pas de même pour la partie symbiotique de ce cycle. Des travaux futurs réalisés à plus grande échelle pourraient clarifier ces hypothèses.

4) Article 2 ; En préparation :

Photorhabdus Dam MTase is necessary for full virulence
of the nemato-bacterial complex in the insects *G.*
mellonella and *S. littoralis*

Photorhabdus* Dam MTase is necessary for full virulence of the nemato-bacterial complex in the insects *G. mellonella* and *S. littoralis

Amaury Payelleville¹, Anne Lanois¹, Sylvie Pages¹, Marine Cambon^{1,2}, Dana Blackburn³, David Clarke³, Alain Givaudan¹ and Julien Brillard^{1*}

¹ Diversité, Génomes Interactions Microorganismes Insectes (DGIMI), Institut National De La Recherche Agronomique, Université de Montpellier, Montpellier, France, ² CNRS, Centre National de la Recherche Scientifique - UMR 5174 Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, Toulouse, France, ³ Department of Microbiology, University College Cork, Cork, Ireland,

P. luminescens is an entomopathogenic bacterium found in symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. Dam DNA methylation has been described to be involved in the pathogenicity of many bacteria whereas studies about its involvement in symbiosis are scarce. We previously described that Dam is involved in the pathogenicity of *P. luminescens*. The aim of this study was to determine its role in symbiosis. We created a strain overexpressing Dam by chromosomal insertion and achieved monoxenic symbiosis. Dam overexpressing strain was able to feed the nematode and reassociate with Infective Juvenile (IJ) stages in the insect. No differences in the amount of emerging IJs from the cadaver were observed. A strong difference in the time needed to kill a half of the larvae (TL50) was observed for the nematode in symbiosis with Dam overexpressing strain and less bacterial symbionts were counted in each IJs compared to the control. These results reveal that Dam might play a role in the ability of the bacteria to colonize IJ gut resulting in a decrease of pathogenicity.

Keywords: Dam, nematobacterial complex, symbiosis, pathogenicity

Introduction

Studies aiming to understand bacteria-host interaction often show that molecular mechanisms involved in mutualism or pathogenesis have common molecular mechanisms (Hentschel et al., 2000). This raises the interest to study models that have a life-cycle including both mutualism and pathogenicity to understand what differs between both stages.

Photorhabdus luminescens is an *Enterobacteria* symbiotically associated with a nematode from the genus *Heterorhabditis* (Boemare et al., 1993). This nemato-bacterial complex is highly pathogenic against insect pest crops and used as biocontrol agent (Lacey et al., 2015). Mutualistic interaction is absolutely required as *Photorhabdus* is not viable alone in the soil environment and *Heterorhabditis* cannot infect and reproduce without its symbiont (Han and Ehlers, 2000). *Photorhabdus* is carried inside the nematode gut during the infective juvenile stage (IJ), a stage that is similar to the well characterized dauer-stage of *Caenorhabditis elegans* (Hu, 2007). After its entrance by natural orifices such as stigmata, or by cuticle disruption, the nematodes release *Photorhabdus* in the hemocoel of the insect

(Bedding and Molineux, 1982; Ciche and Ensign, 2003). Regurgitation of the symbiont induces a phenomenon called “IJ recovery” resulting in the formation of a self-fertile adult hermaphrodite from every IJ (Ciche and Ensign 2003). The bacteria then grow and produce a broad-range of virulence factors to kill the insect by septicemia within 48 to 72 hours (Clarke and Dowds, 1995; Watson et al., 2005) until entry in stationary phase of growth. Nematodes feed specifically on its symbiotic bacteria (Bintrim and Ensign, 1998; Bowen and Ensign, 2001). Once nutrients are lacking and nematodes have done several development cycles, some bacterial cells adhere to hermaphrodite gut at INT9 cells (Somvanshi et al., 2012). Bacterial cells which can adhere to these cells express the Mad pilus (Somvanshi et al, 2010; Somvanshi et al., 2012). Hermaphrodites lay about 100 to 300 hundred eggs giving rise to IJs feeding on and re-associating with *Photorhabdus*. Some eggs will not be released and develop inside the hermaphrodite by a mechanism called *endotokia matricida* (Ciche et al., 2008). Nematodes coming from *endotokia matricida* will only become IJs that will re-associate with *Photorhabdus* inside the hermaphrodite (Ciche et al., 2008; Clarke, 2017). After re-association of the complex, it exits from the cadaver and reaches the soil in order to infect other insects (Nielsen-LeRoux et al., 2012). The pathogenic cycle implies a strong interaction between the bacterium and the nematode and a bacterial switch from mutualism to pathogenic state. It is therefore a good model to study differences between both states (Clarke, 2008).

DNA methylation is part of the epigenetic mechanisms in bacteria. Dam (for DNA Adenine Methyltransferase) methylates the adenine of 5'-GATC-3' sites and can be involved in gene transcription regulation because of a binding competition between a regulator and Dam in some promoter regions (Casadesus and Low, 2006). Dam DNA methylation has also been described as involved in pathogenicity of several pathogens as *S. Typhimurium* (Garcia-Del Portillo et al., 1999 ; Heithoff et al., 1999) or *Y. pestis* and *tuberculosis* (Robinson et al., 2005; Julio et al., 2002). Other DNA methylation marks (m4C and m5C) have been described as involved in pathogenicity as in *H. pylori* (Kumar et al., 2012; Kumar et al., 2018). However, studies trying to correlate a mutualistic association with DNA methylation are focused on host modification whereas bacterial DNA methylation data in these interactions are scarce. To our knowledge, the only ones are focusing on bacterial-plant interactions (*Bradyrhizobium* (Davis-Richardson et al., 2016) and *Mesorhizobium loti* (Ichida et al., 2007; 2009)).

The overexpression of Dam in *P. luminescens* was shown to lead to a decrease in motility and virulence and an increase in biofilm formation (Payelleville et al., 2017). Here we focused on the symbiotic stages of the *P. luminescens* lifecycle. We constructed a strain overexpressing Dam MTase with a chromosomal insertion and achieved a symbiosis between this strain and the symbiotic nematode *Heterorhabditis*. The involvement of Dam in symbiosis was studied after insect's infection with the nemato-bacterial complex. The mortality rate overtime, the IJs emergence from the cadaver and the number of bacteria associated with these IJs were quantified.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains, primers and plasmids used during this experiment are listed in Table 1. Except for special conditions, bacteria were grown on Luria broth (LB) medium at 28°C for *Photobacterium* and 37°C for *E. coli*. When required, antibiotics have been used (gentamycin at 20µg/mL⁻¹ and chloramphenicol at 8 µg/mL⁻¹). When needed, IPTG was added at 0.2mM, pyruvate at 0.1% and sucrose at 3%. Phenotypic characterisation of the strains was determined as previously described (Payelleville et al., 2017).

Table 1 : Strains, plasmids and primers used in this study

Strains				
<i>P. luminescens</i> Chr_Dam	Chromosomal Dam overexpressing strain			This study
<i>P. luminescens</i> Chr_GFP	Control for Chr_Dam strain with GFP instead of dam gene			This study
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183\Delta(\text{mcrCB-hsdMRmr})$ 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIQ Δ IM15 Tn10 (Tetr)] thrB1004 pro thi rpsI hsdS lacZ Δ IM15 RP4-1360 Δ (araBAD)567 Δ dapA1341...[erm pir (wt)] Wild type			Agilent technologies Lobner-Olesen and von Friesleben, 1996 Pasteur Institute Culture collection, Paris, France
<i>E. coli</i> WM3064				
<i>Micrococcus luteus</i>				
Plasmids				
pBB1MCS-5	Cloning vector, GmR			Kovach et al., 1995
MCS5-Dam	MCS5 with dam gene from <i>P. luminescens</i> under Plac control			Payelleville et al., 2017
pBBMCS-1	Cloning vector, CamR			Kovach et al., 1995
MCS1-Dam	MCS1 with dam gene from <i>P. luminescens</i> under Plac control			This study
plQ200	Mobilizable vector, GmR			Quandt and Hynes, 1993
plQ_GFP	plQ plasmid with GFP coding gene			This study
plQ_Dam	plQ plasmid with Plac_dam sequence from MCS1_Dam surrounded by GimsS and RpmE partial sequences			This study
Primers				
plu0004-F	qRT-PCR on gyrB gene			ATACACGAAGAAGAGGTGTTTCAG
plu0004-R	qRT-PCR on gyrB gene			TACCTGTCTGTTCCAGTTTCTCCAAC
plu087-F	qRT-PCR on dam gene			CTGATGAGTTTATAGTCCACACAGC
plu087-R	qRT-PCR on dam gene			ACCATGAGAATTATAACGACAGAGG
plu1954-F	qRT-PCR on flhC gene			CTTGAATAGATCCCAGGGTACTTTTG
plu1954-R	qRT-PCR on flhC gene			TAGAGATACCGTCAITTAGCGTTACG
plu0261-F	qRT-PCR on madA gene			AATGGGGGAATTAATGCCAT
plu0261-R	qRT-PCR on madA gene			TTTGAAATTCCTGGCCTGG
R_Gims_Sall	Partial amplification of GimsS for chromosomal insertion			GGGGTGGACTTCAACTAAGGCATTTACAAC
F_Gims_AatII	Partial amplification of GimsS for chromosomal insertion			GGGGAGTCAACCTTATCCACCGTCAAC
R_RpmE_SacI	Partial amplification of RpmE for chromosomal insertion			GGGGAGCTCTAGTAAGAAGTTGAAATAAGCC
F_RpmE_Spel	Partial amplification of RpmE for chromosomal insertion			GCTACTAGTTAAACCCCGCAGTTATAAGC
L_verif_GimsS	PCR verification of chromosomal insertion			TGCGGATACATTAGCAGCAC
R_verif_RpmJ	PCR verification of chromosomal insertion			GCACTAATAAGGTTTCAITTTGTCAT

Chromosomal integration of *dam*

To avoid the use of antibiotic on the EPN complex, and because the strain used previously for *dam*-overexpression in *P. luminescens* was shown to lose its plasmid in the absence of antibiotic, we inserted the *dam* gene under the control of a strong promoter (P_{Lac}) using the method described by Glaeser and Heermann in 2015 (Glaeser and Hermann, 2015) with the following modifications. We extracted the *dam* gene from a previously constructed plasmid (Payelleville et al., 2017) and digested it with Sall and XbaI enzymes commercialized by NEB following their recommendation. The 900bp was cloned in a MCS1 plasmid previously digested by same enzymes. After ligation with T4 DNA Ligase, following manufacturer recommendation (Promega), this plasmid MCS1_Dam was digested with AatII and SacI enzymes to obtain a DNA fragment of 2194bp containing chloramphenicol resistance gene and P_{Lac} promoter controlling *dam* gene. At the same time, we amplified two 600 bp fragments corresponding to a part of *GlmS* and *rpmE* genes from *Photobacterium*. These fragments were amplified using R_GlmS_Sall, F_GlmS_AatII for the *GlmS* fragment and R_RpmE_SacI, F_RpmE_SpeI for the *RpmE* fragment and digested with the enzymes related to their names. The last step was the digestion of pJQ200 by Sall and SpeI. The three fragments together with the pJQ200 plasmid were ligated using T4 DNA Ligase (Promega). We then transformed XL1 Blue *E. coli*. The plasmid construction was controlled by sequencing of the insert.

The recombinant plasmid pJQ_Cam_ P_{Lac} Dam was then transferred in *P. luminescens* by conjugation as previously described (Givaudan and Lanois, 2000). Transconjugants harboring pJQ_Cam_ P_{Lac} GFP (same plasmid with GFP gene instead of *dam*) were used as a control. At least 2 conjugations were done at the same time for each plasmid to increase the number of transconjugants. These transconjugants were selected with both Chloramphenicol (Cm) and Gentamycin (Gm). The allelic exchange has been done on at least 20 independent selected transconjugants per strain as previously described (Glaeser and Hermann, 2015). Clones with the correct insertion were grown overnight in LB + Cm, genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) and correct insertion was verified by sequencing using L_verif_GlmS and R_verif_RpmJ. Clones with the correct insertion (Chr_Dam and Chr_GFP) were then conserved in glycerol and several phenotypes were checked.

RT-qPCR analysis

To verify Dam overexpression in the Chr_Dam strain, quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was done as previously described (Payelleville et al., 2017). Briefly, RNA samples from 3 independent cultures for each strain (Chr_Dam and Chr_GFP) were extracted with RNeasy miniprep

kit (Qiagen). Results are presented as a ratio with respect to the housekeeping gene *gyrB*, as previously described (Jubelin et al., 2013).

Insect Virulence Assay

P. luminescens Chr_Dam and Chr_GFP strain virulence were tested for their virulence properties on *Spodoptera littoralis* in three independent experiments, as previously described (Brillard et al., 2002). Briefly, 20µL of exponentially growing bacteria ($DO_{540nm} = 0,3$) diluted in LB, corresponding to about $1 \cdot 10^4$ CFU for each strain were injected into the hemolymph of thirty fifth-instar larvae of *S. littoralis* reared on an artificial diet. Each larva was then individually incubated at 23°C and mortality times were checked. Survival rate for each bacterial strain infestation were then analyzed with Wilcoxon test performed as previously described (Givaudan and Lanois, 2000 ; Brillard et al., 2002) using SPSS version 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) to compare the time needed to kill 50% of the infested larvae.

Nemato-bacterial monoxenic symbiosis

A monoxenic nemato-bacterial complex between *Heterorhabditis* and *P. luminescens* Chr_Dam or Chr_GFP strains was created as follow. *Photorhabdus* WT strain was grown overnight at 27°C with shaking in LB + pyruvate, plated on lipid agar plates and then incubated at 27°C during 48 h. 5000 IJs were added to *Photorhabdus* lipid plates and incubated during 4 days at 27°C. Hermaphrodites were collected from lipid agar plates in 50mL conical tubes by adding PBS to the plate, swirling and dumping into the tube. After hermaphrodites have settle, remove PBS and let it settle again. This step was repeated until a clear solution was obtained. Egg isolation from hermaphrodites was then performed as follow. 200µL of washed hermaphrodites were put into a 15mL conical tube and PBS was added to 3.5mL. 0.5mL of 5M NaOH mixed with 1mL of 5.6% sodium hypochlorite were then added and the tube was incubated for 10 minutes at room temperature with vortex every 2 minutes. Tube was then centrifuged for 30 seconds at 1300g, almost all the supernatant was removed leaving 100µL in the tube and PBS was added to 5mL. After vortexing and centrifugation, eggs were washed with 5mL PBS and collected after another centrifugation step. *P. luminescens* Chr_Dam and the control strain were grown in 5mL of LB overnight at 27°C with shaking. 30µL of the culture was spread on split lipid agar plates and equal amount of eggs (~1000) were added. PBS was added to the empty part of the plate and plates were incubated for two weeks at 27°C temperature incubator. Monoxenic IJs were collected in the PBS side of the plate and stored at 4°C.

Insect infestation and IJs emergence

G. mellonella infestations were performed in 1.5mL Eppendorf tube because of their weave ability (that hinders direct contact with EPN in 12 well plates). A filter paper was put in each tube and 100µL of PBS containing 50 IJs were added to this filter. One *Galleria* larva was added in each tube and incubated at 23°C. Mortality was checked regularly for 72 hours. *S. littoralis* infestation was performed in 12 well plates. A filter paper was added in each well and 100µL of PBS containing 50IJs was added on each filter paper. One *S. littoralis* larva was added in each well with artificial diet. Mortality was regularly checked for 72 hours.

For both insect infestation, survival rate for each nemato-bacterial complex were analyzed with Wilcoxon test performed as previously described (Givaudan and Lanois, 2000 ; Brillard et al., 2002) using SPSS version 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) to compare the time needed to kill 50% of the infested larvae.

Bacterial CFUs in nemato-bacterial complex

CFUs for each nemato-bacterial complex were quantified as follows. IJs were filtered using a 20µm pore-size filter to remove bacteria that may develop in the solution. After resuspension in PBS, 10 IJs were counted under binocular magnifier and put in 1.5mL tube in 10-50µL volume. Manual crushing was performed using plastic putter and crushing efficiency was verified by microscope observation. After addition of 1mL LB, the suspension was plated on LB Petri dish pure or at 10^{-1} dilution, with 3 replicates for each dilution. *Photobacterium* CFUs were determined using (Li-Cor Odyssey) and Image Studio version 1.1.7 version to discriminate luminescent colonies (corresponding to *P. luminescens*) from others. CFUs data were analyzed with a Wilcoxon test. Three independent experiments were performed, with 3 independent crushing for each strain.

Results

Dam overexpression by chromosomal insertion

To avoid plasmid loss because antibiotic pressure cannot be maintained during the whole pathogenic cycle, we used a strain overexpressing Dam MTase by chromosomal insertion (Chr_Dam). We quantified the expression of two genes previously described as impacted by Dam overexpression: *madA* and *fliC* involved in pilus and flagellar synthesis, respectively (Payelleville et al., 2017). An increase of 14-fold changes in *dam* expression in the Chr_Dam strain was observed (p-value = 0.001) compared to a control strain Chr_GFP (having GFP gene inserted in the chromosome). *fliC* expression

was not significantly different between the 2 strains (p-value = 0.075). An increase of 4.3-fold change in *madA* expression (p-value = 0.001) (Fig S1) was observed Chr_Dam strain.

Phenotypes associated to chromosomal *dam* overexpression

To determine if chromosomal Dam overexpression modified some *P. luminescens* phenotypes, similarly as the strain overexpressing *dam* using plasmid did (Payelleville et al., 2017), we performed motility and insect pathogenicity assays with Chr_Dam and Chr_GFP strains (control). A significant decrease in motility was observed for the Chr_Dam strain (p-value < $2 \cdot 10^{-13}$ Wilcoxon test) at 36h hours post inoculation (Fig 1A). Pathogenicity in *S. littoralis* of bacterial strain was significantly reduced in the Dam overexpressing strain compared to the control strain, with a delay of 2 hours in TL50 for the Chr_Dam strain (Fig 1B). These data confirm that the Dam overexpression in *P. luminescens* impairs insect virulence. No other major phenotype of *P. luminescens* was impacted by chromosomal Dam overexpression (Table S1).

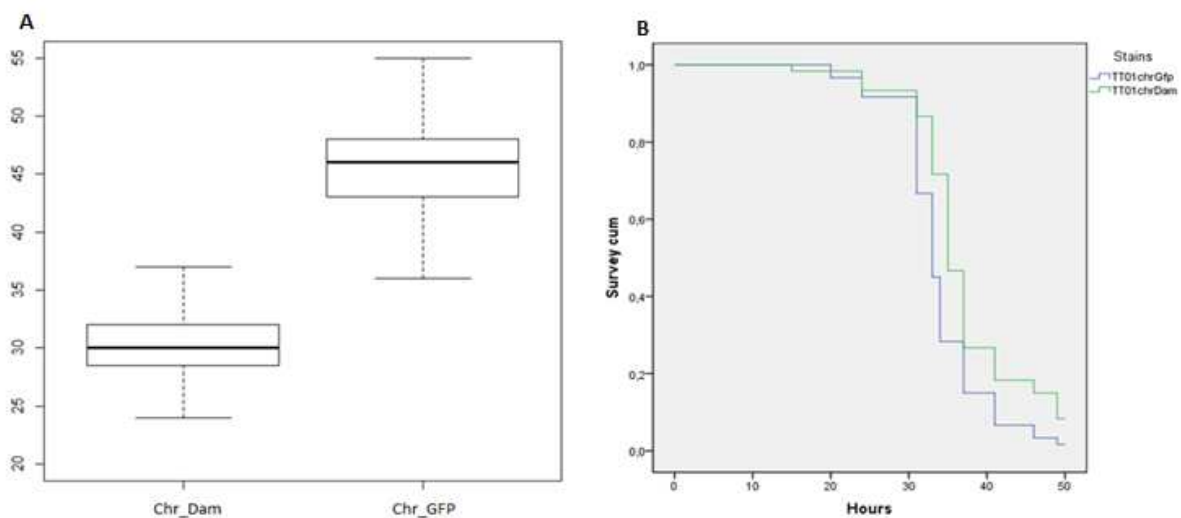


Figure 1 : Motility and pathogenicity of Chr_Dam strain

- A- Boxplot of motility halo size for Chr_Dam and Chr_GFP strain after 36 hours of growth on motility medium. The difference between the two strains is significant (Wilcoxon test, p-value<0.001).
- B- Survival of *S. littoralis* larvae after injection of 10^4 bacteria of each strain, Chr_GFP (in blue) and Chr_Dam (in green). Chr_Dam strain was significantly delayed (2hours) in the time needed to kill 50% of the larvae (Wilcoxon test, p-value<0.001).

Symbiosis establishment

To study Dam involvement in the symbiosis stage of *P. luminescens* cycle, we created a monoxenic symbiosis between *P. luminescens* Chr_Dam strain or Chr_GFP strain with *Heterhorhabditis*. No differences in the number of emerging IJs from the plates of symbiosis setting

could be detected for the three biological replicates (unpublished results). This suggests that the nematode can feed and establish a symbiotic relationship with the Chr_Dam strain in *in vitro* conditions.

Pathogenicity of the EPN complex in *G. mellonella* and *S. littoralis*

To check the involvement of Dam MTase in the pathogenicity of the nematobacterial complex, *G. mellonella* or *S. littoralis* were infested and larvae mortality was monitored over time. Both strains (Chr_Dam and Chr_GFP) were pathogenic as they caused insect death in less than 72 hours. For *G. mellonella*, the time lethal 50 (time needed to kill 50% of the larvae) are 48 and 50.6 hours for Chr_GFP and Chr_Dam, respectively. The slight difference between the two strains was significant (p -value = 0.016) (Fig 2A). In *S. littoralis* the TL50 was delayed of almost 6 hours (48.4h and 54.2h for Chr_GFP and Chr_Dam complexes, respectively) (Fig 2B). This difference was highly significant (p -value <0.001).

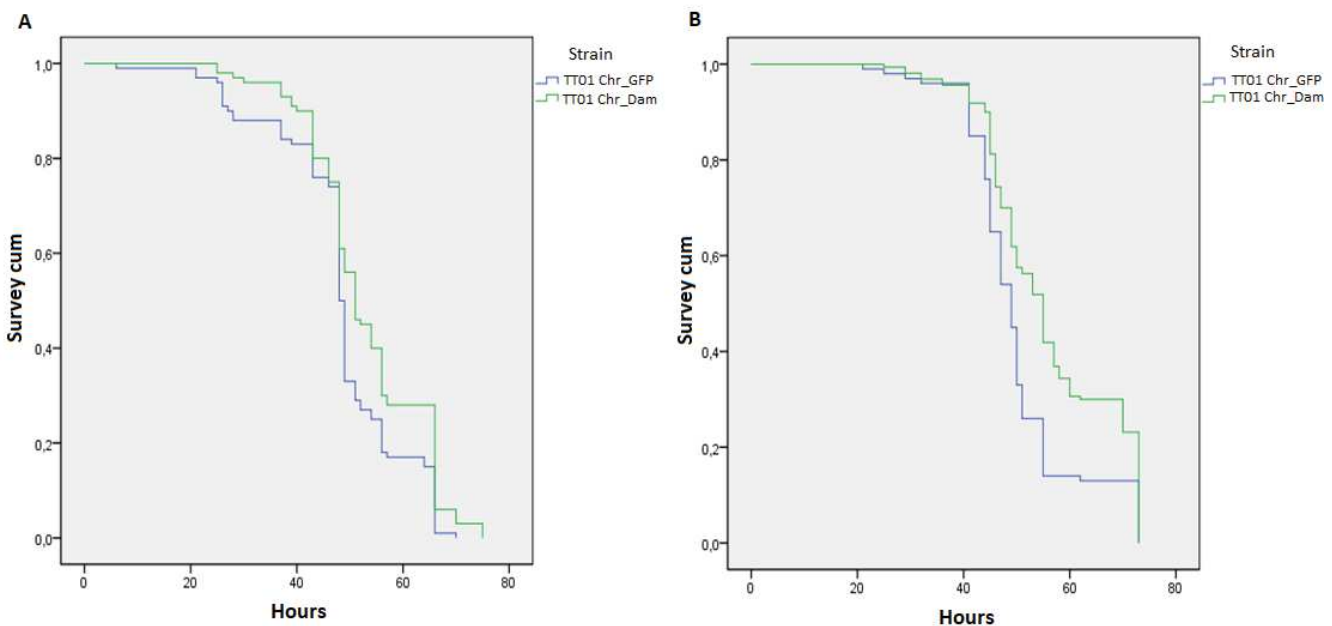


Figure 2 : Nemato-bacterial complex pathogenicity by infestation

- A- Survival of *G. mellonella* larvae after infestation by ~10 nematodes associated with Chr_GFP bacterial strain (Blue) or Chr_Dam strain (Green). A significant difference of 2 hours can be noted for the time needed to kill 50% of the larvae for Chr_Dam strain (Wilcoxon, p -value=0.016).
- B- Survival of *S. littoralis* larvae after infestation by the same strains as in A. A significant difference can be observed with a delay of almost 6 hours for the Chr_Dam strain (Wilcoxon, p -value<0.001).

Emerging IJs from cadavers

To investigate Dam role in the association between nematode and *Photorhabdus*, we quantified IJs emerging from each insect larvae. The amount of emerging IJs exiting from the cadavers of *G. mellonella*, and *S. littoralis* were not different between the 2 nematobacterial complexes used (p-value = 0.991 and p-value = 0.06, respectively) (Fig. 3A).

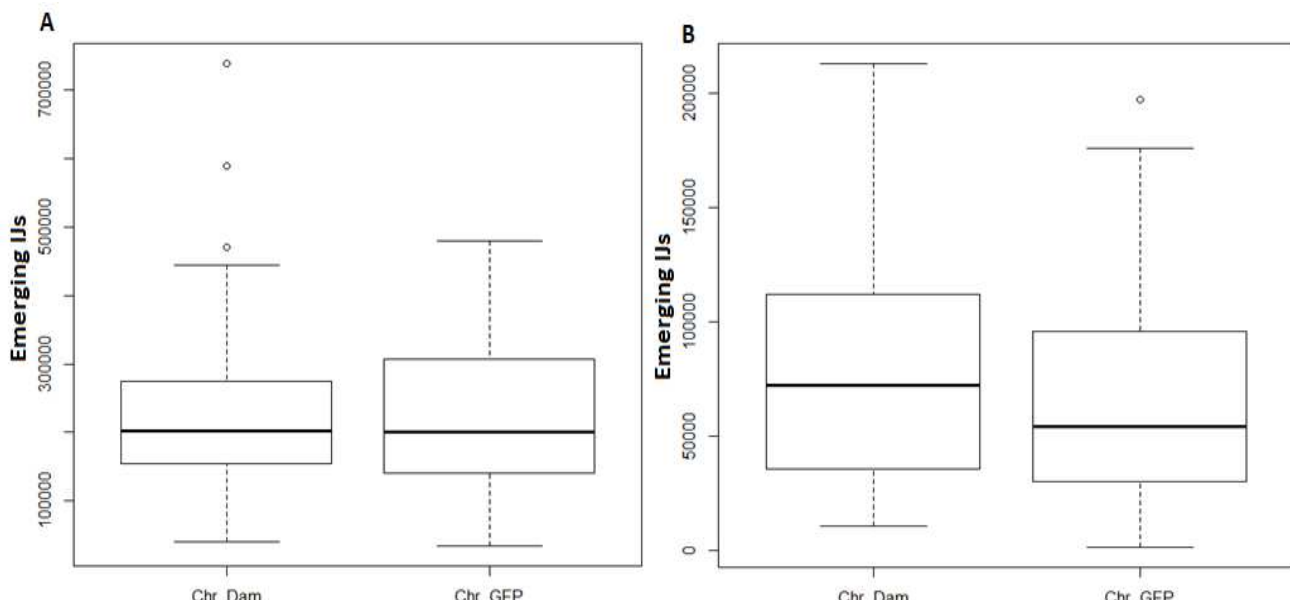


Figure 3 : Number of emerging IJs from each cadaver

- A- Emerging IJs from each *G. mellonella* cadaver for each strain. Equal amount of IJs exits from the cadaver for each strain (Wilcoxon, p-value=0.991).
- B- Emerging IJs from *S. littoralis* larvae cadaver for each strain. The amount of IJs exiting from larvae cadaver are not significantly different (Wilcoxon, p-value=0.06).

Bacterial symbionts numeration in emerging IJs

For each strain, numeration of CFU in emerging IJs was performed after crushing. This experiment revealed that after a cycle in the insect, the nematodes were not monoxenic anymore, with several bacterial colonies which displayed no luminescence indicating that they were not *Photorhabdus*. Therefore, only luminescent colonies were numerated. Results presented in Fig.4 show that there was 50 % more *Photorhabdus* UFC in nematode in symbiosis with the control strain than with Dam overexpressing strain (p-value = 0.03) (Fig.4).

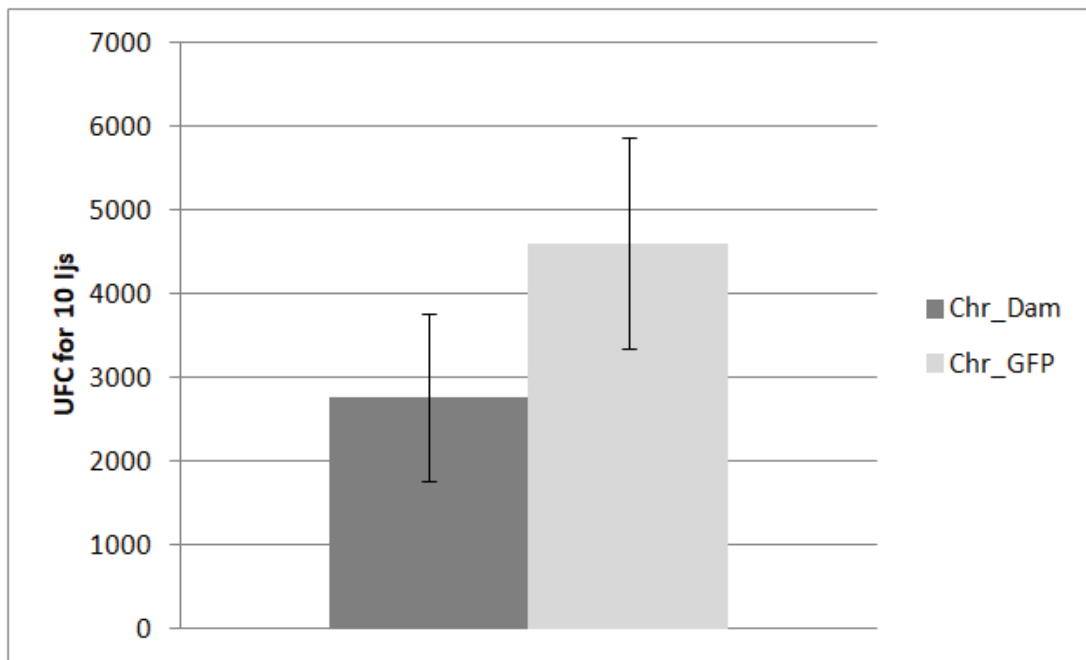


Figure 4 : CFU in IJs for each strain

After 10 IJs crushing and plating of the resulting solution, UFC were counted. A slight but significant difference was observed between the two strains (Wilcoxon, p-value=0.03). Standard deviation is represented.

Discussion

We previously described that Dam overexpression causes a decrease in pathogenicity and motility, and an increase in biofilm formation in *Photorhabdus luminescens* (Payelleville et al., 2017). We also described that Dam methylates most of the 5'-GATC-3' sites in the WT genome (>99%) and that DNA methylation profile was stable during growth (Payelleville, Legrand et al., 2018). Dam DNA methylation is known to be involved in various phenotypes in bacteria, such as pathogenicity in *S. Typhimurium* (Garcia-Del Portillo et al., 1999 ; Heithoff et al., 1999), *H. influenzae* (Watson et al., 2004), *Klebsiella* (Mehling et al., 2007), *Actinobacillus* (Wu et al., 2006), *Y. pestis* and *tuberculosis*

(Robinson et al., 2005; Julio et al., 2002), *V. cholerae* (Julio et al., 2001), *P. multocida* (Chen et al., 2003) and *A. hydrophila* (Erova et al., 2006) but the only studies about DNA methylation involvement in symbiosis are about *Bradyrhizobium* where it is suspected to play a role in the differentiation to symbiotic state (Davis-Richardson et al., 2016) and *Mesorhizobium loti* where it is essential for nodulation (Ichida et al., 2007; 2009). Therefore we checked the involvement of Dam DNA methylation in the symbiotic steps of *P. luminescens* life cycle. We first checked the motility of this strain and confirmed that *dam* overexpression decreases motility compared to control strain (Chr_GFP) as previously described for the plasmid *dam* overexpression (Payelleville et al., 2017).

The *in vitro* monoxenic symbiosis with *Heterorhabditis* nematode led to similar amount of emerging IJs for each strain revealing that the nematodes can feed and establish a symbiotic relation with both strains *in vitro*. We also checked the symbiosis efficiency of both strains after an *in vivo* cycle on two larval models *G. mellonella* and *S. littoralis*. We checked three parameters during the cycle (i) the time needed for the complex to kill 50% of the larvae (TL50) (ii) how many IJs came out from each cadaver and (iii) how many bacteria were in each IJ. Differences between the two insect models were observed. In *G. mellonella*, a slight difference in TL50 between both strains was observed whereas no difference in the number of emerging IJs between both strains could be detected. In *S. littoralis*, a higher difference in TL50 was noted, indeed Chr_Dam took almost 6 hours more than the control to kill half of the larval cohort. The numeration of bacterial CFU in each IJ were slightly different between both strains as IJs in symbiosis with Chr_Dam strain have 50% less bacteria than the control strain. Altogether these results show a decrease in pathogenicity of the nematobacterial complex overexpressing Dam that can be presumably caused by the decrease in pathogenicity of the bacteria alone, as previously described (Payelleville et al., 2017) and confirmed here with the Chr_strain. Even if the differences in TL50 of infestation of *S. littoralis* by nematobacterial complex is stronger than bacterial injection, it might just be because nemato-bacterial complex takes more time to kill insect as described for the closely related bacteria *X. nematophila* (Sicard et al., 2004). The TL50 decrease could also be explained by the lower amount of bacteria found in Chr_Dam IJ because less bacteria are released in the insect. It seems likely to assign a lower pathogenicity to a lower amount of pathogens. However, a decrease of 50%, even if significant is not a strong difference with 270+/- 100 bacteria in Chr_Dam symbiosis against 460+/- 100 in the control strain. Because some *Photorhabdus* mutants are able to support nematode growth without the ability of establish a symbiosis as described for *pbgPE* mutant (Bennett and Clarke, 2005) or for *proQ* mutant (Easom and Clarke, 2010) (see Clarke, 2014 for review), it should be interesting to monitor the evolution of the three parameters analysed here (pathogenicity, emerging IJ amount and UFC per IJ) using emerging IJs to

reinfest larvae for several generations. In this case, the observed differences may increase over generations and may even lead to axenic nematode for Chr_Dam strain.

To conclude, insect pathogenicity is more impacted during infestation by the nematobacterial complex of Chr_Dam strain than after injection of the bacteria alone. Future investigations will have to decipher if this phenotype is due to the symbiotic association or only to bacterial cells. This study also shows that there is no major involvement of Dam MTase in symbiosis establishment even if it could play roles for symbiosis retention over generation.

ETHICS STATEMENT

According to the EU directive 2010/63, this study is exempt from the above requirements because experiments were performed on invertebrates animals (insects).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP performed the experiments and analyzed the data; AL, AG, DB, JB and AP designed the experiments; MC, SP and AP performed statistical analyze; AP, AG and JB draft the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank N. Ginibre and W. Levrat for technical assistance. They are grateful to Anders Løbner-Olesen for gift of *E. coli* strains. The authors thank INRA Plant Health and Environment (SPE) division for financial support (SPE2015-65359) and GAIA doctoral school #584 for supporting AP's PhD.

References

- Bedding, R. A., and A. S. Molyneux. 1982. "Penetration of Insect Cuticle by Infective Juveniles of Heterorhabditis Spp. (Heterorhabditidae : Nematoda)." *Nematologica*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302166764>.
- Bennett, H. P. J., and D. J. Clarke. 2005. "The pbgPE Operon in Photorhabdus Luminescens Is Required for Pathogenicity and Symbiosis." *Journal of Bacteriology* 187 (1): 77–84. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.77-84.2005>.
- Bintrim, S. B., and J. C. Ensign. 1998. "Insertional Inactivation of Genes Encoding the Crystalline Inclusion Proteins of Photorhabdus Luminescens Results in Mutants with Pleiotropic Phenotypes." *Journal of Bacteriology* 180 (5): 1261–69.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst, and R. G. Mourant. 1993. "DNA Relatedness between Xenorhabdus Spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer Xenorhabdus Luminescens to a New Genus, Photorhabdus Gen. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43 (2): 249–55. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249>.
- Bowen, D. J., and J. C. Ensign. 2001. "Isolation and Characterization of Intracellular Protein Inclusions Produced by the Entomopathogenic Bacterium Photorhabdus Luminescens." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4834–41.
- Brillard, Julien, Eric Duchaud, Noël Boemare, Frank Kunst, and Alain Givaudan. 2002. "The PhIA Hemolysin from the Entomopathogenic Bacterium Photorhabdus Luminescens Belongs to the Two-Partner Secretion Family of Hemolysins." *Journal of Bacteriology*

184 (14): 3871–78.

- Casadesús, Josep, and David Low. 2006. “Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 70 (3): 830–56. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-06>.
- Chen, Liang, Daniel B. Paulsen, Daniel W. Scruggs, Michelle M. Banes, Brenda Y. Reeks, and Mark L. Lawrence. 2003. “Alteration of DNA Adenine Methylase (Dam) Activity in *Pasteurella Multocida* Causes Increased Spontaneous Mutation Frequency and Attenuation in Mice.” *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 8): 2283–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26251-0>.
- Ciche, Todd A., and Jerald C. Ensign. 2003. “For the Insect Pathogen *Photorhabdus Luminescens*, Which End of a Nematode Is Out?” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1890–97.
- Ciche, Todd A., Kwi-Suk Kim, Bettina Kaufmann-Daszczuk, Ken C. Q. Nguyen, and David H. Hall. 2008. “Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus Luminescens* Transmission by *Heterorhabditis Bacteriophora* Nematodes.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2275–87. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-07>.
- Clarke, David J. 2008. “*Photorhabdus*: A Model for the Analysis of Pathogenicity and Mutualism.” *Cellular Microbiology* 10 (11): 2159–67. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x>.
- Clarke, David J. 2014. “The Genetic Basis of the Symbiosis between *Photorhabdus* and Its Invertebrate Hosts.” *Advances in Applied Microbiology* 88: 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800260-5.00001-2>.
- Clarke, David J. 2017. “The Regulation of Secondary Metabolism in *Photorhabdus*.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 402: 81–102. https://doi.org/10.1007/82_2016_21.
- Clarke, David J, and Barbara C. A Dowds. 1995. “Virulence Mechanisms of *Photorhabdus* Sp. Strain K122 toward Wax Moth Larvae.” *Journal of Invertebrate Pathology* 66 (2): 149–55. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1078>.
- Davis-Richardson, Austin G., Jordan T. Russell, Raquel Dias, Andrew J. McKinlay, Ronald Canepa, Jennie R. Fagen, Kristin T. Rusoff, et al. 2016. “Integrating DNA Methylation and Gene Expression Data in the Development of the Soybean-*Bradyrhizobium* N2-Fixing Symbiosis.” *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00518>.
- Easom, Catherine A, Susan A Joyce, and David J Clarke. 2010. “Identification of Genes Involved in the Mutualistic Colonization of the Nematode *Heterorhabditis Bacteriophora* by the Bacterium *Photorhabdus Luminescens*.” *BMC Microbiology* 10 (February): 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-45>.
- García-Del Portillo, F., M. G. Pucciarelli, and J. Casadesús. 1999. “DNA Adenine Methylase Mutants of *Salmonella Typhimurium* Show Defects in Protein Secretion, Cell Invasion, and M Cell Cytotoxicity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11578–83.
- Givaudan, A., and A. Lanois. 2000. “*flhDC*, the Flagellar Master Operon of *Xenorhabdus Nematophilus*: Requirement for Motility, Lipolysis, Extracellular Hemolysis, and Full Virulence in Insects.” *Journal of Bacteriology* 182 (1): 107–15.
- Glaeser, Angela, and Ralf Heermann. 2015. “A Novel Tool for Stable Genomic Reporter Gene Integration to Analyze Heterogeneity in *Photorhabdus Luminescens* at the Single-Cell Level.” *BioTechniques* 59 (2): 74–81. <https://doi.org/10.2144/000114317>.
- Han, R., and R. U. Ehlers. 2000. “Pathogenicity, Development, and Reproduction of *Heterorhabditis Bacteriophora* and *Steinernema Carpocapsae* under Axenic in Vivo

- Conditions.” *Journal of Invertebrate Pathology* 75 (1): 55–58.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4900>.
- Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan. 1999. “An Essential Role for DNA Adenine Methylation in Bacterial Virulence.” *Science (New York, N.Y.)* 284 (5416): 967–70.
- Hentschel, U., M. Steinert, and J. Hacker. 2000. “Common Molecular Mechanisms of Symbiosis and Pathogenesis.” *Trends in Microbiology* 8 (5): 226–31.
- Hu, Patrick J. 2007. “Dauer.” *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>.
- Ichida, Hiroyuki, Tomoki Matsuyama, Tomoko Abe, and Takato Koba. 2007. “DNA Adenine Methylation Changes Dramatically during Establishment of Symbiosis.” *The FEBS Journal* 274 (4): 951–62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05643.x>.
- Ichida, Hiroyuki, Katsuyoshi Yoneyama, Takato Koba, and Tomoko Abe. 2009. “Epigenetic Modification of Rhizobial Genome Is Essential for Efficient Nodulation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389 (2): 301–4.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.137>.
- Jubelin, Grégory, Anne Lanois, Dany Severac, Stéphanie Rialle, Cyrille Longin, Sophie Gaudriault, and Alain Givaudan. 2013. “FliZ Is a Global Regulatory Protein Affecting the Expression of Flagellar and Virulence Genes in Individual *Xenorhabdus Nematophila* Bacterial Cells.” *PLoS Genetics* 9 (10): e1003915.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003915>.
- Julio, S. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, K. E. Klose, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan. 2001. “DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Vibrio Cholerae*.” *Infection and Immunity* 69 (12): 7610–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7610-7615.2001>.
- Julio, Steven M., Douglas M. Heithoff, Robert L. Sinsheimer, David A. Low, and Michael J. Mahan. 2002. “DNA Adenine Methylase Overproduction in *Yersinia Pseudotuberculosis* Alters YopE Expression and Secretion and Host Immune Responses to Infection.” *Infection and Immunity* 70 (2): 1006–9.
- Lacey, L. A., D. Grzywacz, D. I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge, and M. S. Goettel. 2015. “Insect Pathogens as Biological Control Agents: Back to the Future.” *Journal of Invertebrate Pathology* 132 (November): 1–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- Mehling, Joanna S., Heather Lavender, and Steven Clegg. 2007. “A Dam Methylation Mutant of *Klebsiella Pneumoniae* Is Partially Attenuated.” *FEMS Microbiology Letters* 268 (2): 187–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00581.x>.
- Nielsen-LeRoux, Christina, Sophie Gaudriault, Nalini Ramarao, Didier Lereclus, and Alain Givaudan. 2012. “How the Insect Pathogen Bacteria *Bacillus Thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* Occupy Their Hosts.” *Current Opinion in Microbiology* 15 (3): 220–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006>.
- Payelleville, Amaury, Anne Lanois, Marie Gislard, Emeric Dubois, David Roche, Stéphane Cruveiller, Alain Givaudan, and Julien Brillard. 2017. “DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression Impairs *Photorhabdus Luminescens* Motility and Virulence.” *Frontiers in Microbiology* 8: 1671.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01671>.
- Robinson, Victoria L., Petra C. F. Oyston, and Richard W. Titball. 2005. “A Dam Mutant of *Yersinia Pestis* Is Attenuated and Induces Protection against Plague.” *FEMS Microbiology Letters* 252 (2): 251–56. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.001>.
- Somvanshi, Vishal S., Bettina Kaufmann-Daszczuk, Kwi-Suk Kim, Shane Mallon, and Todd A. Ciche. 2010. “*Photorhabdus* Phase Variants Express a Novel Fimbrial Locus, Mad,

- Essential for Symbiosis.” *Molecular Microbiology* 77 (4): 1021–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07270.x>.
- Somvanshi, Vishal S., Rudolph E. Sloup, Jason M. Crawford, Alexander R. Martin, Anthony J. Heidt, Kwi-suk Kim, Jon Clardy, and Todd A. Ciche. 2012. “A Single Promoter Inversion Switches *Photorhabdus* between Pathogenic and Mutualistic States.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6090): 88–93. <https://doi.org/10.1126/science.1216641>.
- Watson, Michael E., Justin Jarisch, and Arnold L. Smith. 2004. “Inactivation of Deoxyadenosine Methyltransferase (Dam) Attenuates *Haemophilus Influenzae* Virulence.” *Molecular Microbiology* 53 (2): 651–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04140.x>.
- Watson, Robert J., Susan A. Joyce, Georgette V. Spencer, and David J. Clarke. 2005. “The *exbD* Gene of *Photorhabdus Temperata* Is Required for Full Virulence in Insects and Symbiosis with the Nematode *Heterorhabditis*.” *Molecular Microbiology* 56 (3): 763–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04574.x>.
- Wu, H., J. E. Lippmann, J. P. Oza, M. Zeng, P. Fives-Taylor, and N. O. Reich. 2006. “Inactivation of DNA Adenine Methyltransferase Alters Virulence Factors in *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*.” *Oral Microbiology and Immunology* 21 (4): 238–44. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00284.x>.

Supplementary Data

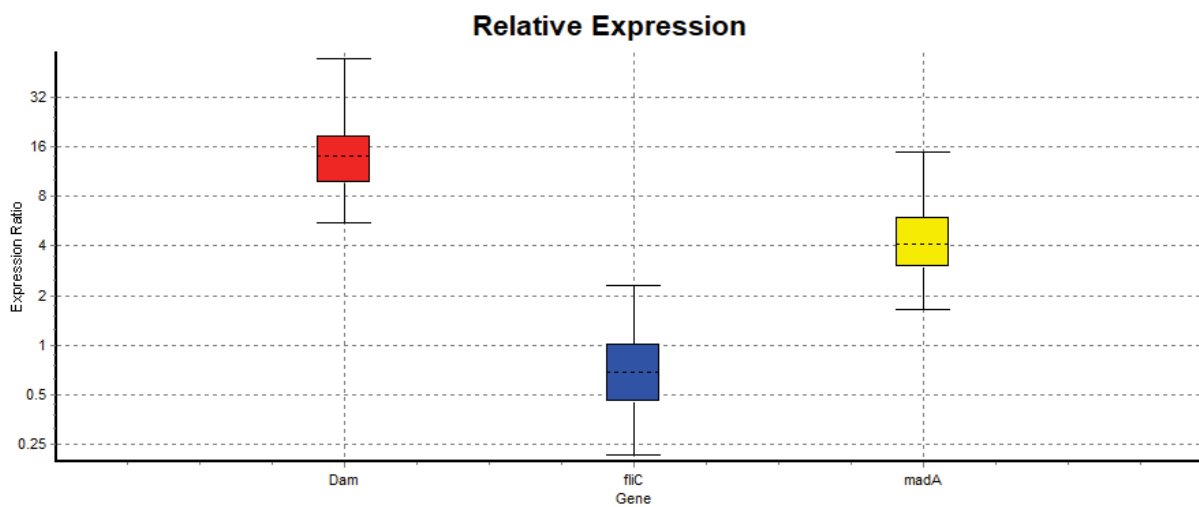


Figure S1 : Relative gene expression of Chr_Dam compared to Chr_GFP strain

qRT-PCR was carried out with exponential growing bacteria (OD=0.8) RNA. Box-plot representing gene expression for *dam*, *madA* and *fliC* were tested using *gyrB* as a reference. *dam* and *madA* gene were significantly overexpressed respectively 14 and 4.3 fold each with p-values <0.001. *fliC* expression was not significant between the 2 strains (p-value = 0.075).

Table S1 : Global phenotypes of Chr_Dam and Chr_GFP strains

Strain	tween 20	tween 40	tween 60	tween 80	tween 85	motility	hemolysis	lécythine	antibiose	NBTA
TT01 Chr_Dam	+	+	+	+	-	3 mm	0	+	12 mm	vert
TT01 Chr_GFP	+	+	+	+	-	12mm	0	+	14 mm	vert

Chapitre III] Analyse du méthylome de *P. luminescens*

Les travaux présentés précédemment nous ont montré que la MTase Dam jouait un rôle dans l'expression de certains gènes de *P. luminescens*. Néanmoins nous n'avons, avec ces résultats, aucun moyen de corréliser cette MTase avec la méthylation directe de l'ADN. Plusieurs techniques permettent de détecter les bases méthylées de l'ADN. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes, d'anticorps ou encore le séquençage au bisulfite qui permet de détecter la méthylation des cytosines m5C. La dernière décennie a vu l'arrivée d'une nouvelle technique de séquençage nommée SMRT pour « Single Molecule Real Time sequencing » qui permet en plus d'un séquençage complet du génome, de détecter les méthylations sur les adénines ainsi que les cytosines.

1) Techniques permettant l'analyse de méthylomes

La détection de la méthylation de l'ADN peut être réalisée par 4 principales techniques. La plus ancienne est l'utilisation d'enzymes sensibles à l'état de méthylation du site qu'elles reconnaissent (technique utilisée dans l'article 1).

1.1 Détection des méthylations par enzymes de restriction

Si nous avons utilisé cette technique afin de vérifier une méthylation globale de l'ADN par Dam il est aussi possible d'utiliser diverses variantes afin de détecter la méthylation de l'ADN de façon plus globale avec cette technique. Je ne détaillerai pas ici toutes les variantes de ces techniques apparues au cours des années mais juste le principe fondateur (Bibikova and Fan, 2010 pour détail). Parmi ces techniques on peut séparer deux catégories.

La première va permettre la détection des méthylations au niveau des îlots CpG⁽¹⁾, très étudiés et retrouvés majoritairement chez les eucaryotes. Il existe des variantes dans cette catégorie mais le principe reste le même. La première étape est la digestion de l'ADN par une enzyme sensible à la méthylation (cette étape peut être parfois précédée par une enzyme fragmentant l'ADN si nécessaire). Ensuite, cet ADN va soit être soumis à une amplification par PCR (spécifique ou non selon si le génome est connu ou pas) ou marqué de façon radioactive (Akama et al., 1997 ; Pearly et al., 2000). À la suite d'une migration électrophoretique et hybridation par Southern, il sera possible de détecter si les fragments d'ADN d'individus différents (par exemple cellules cancéreuses vs cellules saines) ont des profils de migration différents (Akama et al., 1997). Il est aussi possible de réaliser un séquençage des produits de PCR pour détecter lequel de deux sites adjacents est ou non

⁽¹⁾ Les îlots CpG (pour Cytosine-Phosphate-Guanine) correspondent à des zones riches en dinucléotides C-G. Ils sont souvent retrouvés dans les régions 5' des gènes chez les vertébrés et associés plus spécifiquement aux gènes de ménage (housekeeping) (Jabbari and Bernardi, 2004 ; Law and Jacobsen, 2011).

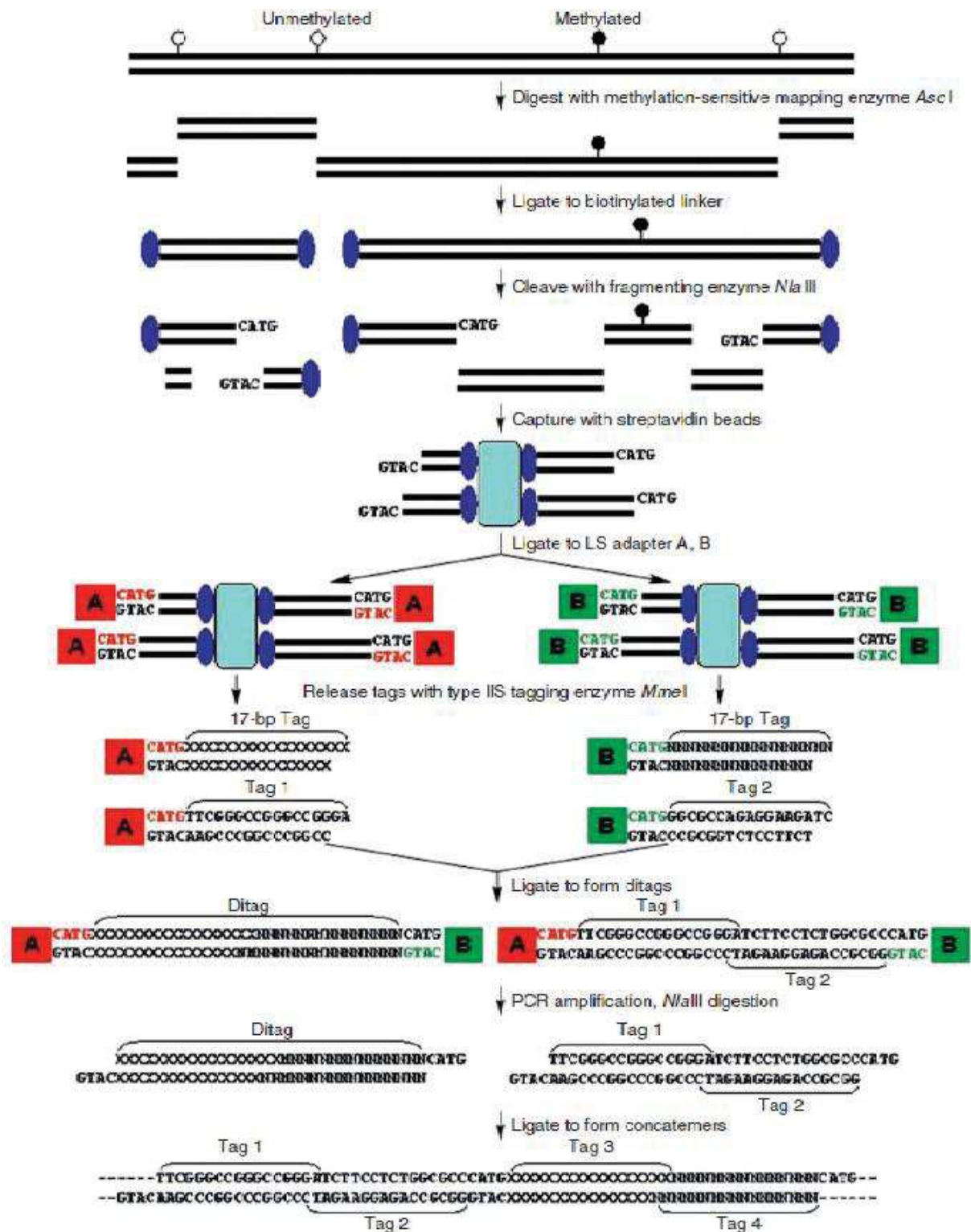


Figure 19 : Représentation schématique du protocole MSDK (Hu et al., 2006).

Les étapes sont: digestion de l'AND avec une enzyme sensible à la méthylation; Ligation pour biotinyler les extrémités; digestion avec un enzyme coupant très fréquemment afin de séparer les régions méthylées des régions non méthylées ; Capture des fragments méthylés avec des billes magnétiques de streptavidine ; Séparer en deux échantillons et lier respectivement à l'adaptateur A ou B avec une extrémité CATG ; Couper avec *MmeI* pour ne garder qu'un tag de 17 paires de bases (exemples sur la figure) ; Ligation pour former des ditags suivi d'une amplification PCR et d'une digestion par *NlaIII* pour enlever les adaptateurs ; les séquences obtenues pourront ensuite être clonées et séquencées.

méthylé (Schumacher et al., 2006). Il est néanmoins à noter que ces techniques n'ont été utilisables que pour l'étude des îlots CpG chez les eucaryotes.

La seconde technique permet la détection des méthylations à l'échelle du génome complet et est nommée MSDK pour « methylation-specific digital karyotyping ». Le principe débute de la même façon avec une digestion de l'ADN par une enzyme sensible à la méthylation. À la suite de cette digestion, une biotine est ajoutée sur les extrémités des fragments au niveau du site de coupure par ligation (biotinylation). Les fragments sont ensuite à nouveau digérés par une enzyme digérant à de très nombreux endroits sur le génome. Les extrémités biotinylées sont ensuite reconnues par des billes et isolés du reste de l'ADN. Ces brins d'ADN pourront ensuite grâce à des PCR être clonés et séquencés (Fig. 19) (voir Hu et al., 2006 pour détail). Dans ce protocole, les seuls brins retenus sont donc ceux qui étaient sensibles à la première enzyme utilisée et on pourra donc connaître les sites méthylés ou non cibles de cette enzyme et les replacer sur le génome (Hu et al., 2006).

Il est important de noter que si ces techniques sont efficaces pour détecter l'état de méthylation de sites cibles d'enzymes, elles restent peu rapides et ne peuvent pas fonctionner si aucune enzyme connue ne cible la zone à vérifier. Pour pallier ces problèmes, d'autres techniques ont été développées comme la détection à l'aide d'anticorps.

1.2 L'immunoprécipitation de l'ADN méthylé

Comme son nom l'indique, la technique de l'immunoprécipitation consiste à utiliser un anticorps marqué ciblant les bases ou motifs méthylés. Cette technique, bien que potentiellement applicable à tout type de méthylation, n'est majoritairement utilisée que pour les m5C et les îlots CpG (Bibikova and Fan, 2010). Ceci est grandement dû à l'absence d'anticorps ciblant de manière sûre et spécifique les m6A car même si certains existent et sont commercialisés (Störl et al., 1979 ; New England Biolabs® ; Diagenode®), ils n'ont été pour le moment utilisés que pour différencier un ADN contenant des m6A d'un ADN non méthylé (Zhang et al., 2012). La majorité des travaux utilisant ces techniques ont donc utilisé des anticorps ciblant soit des bases méthylées m5C (Weber et al., 2005 ; Keshet et al., 2006) ou des zones méthylées en utilisant une protéine ayant une forte affinité pour l'ADN méthylé MBD2b (Rauch et al., 2006 ; Rauch et al., 2008). Ces techniques ont permis de détecter des profils de méthylation différents au niveau du génome complet mais aussi au niveau de promoteurs de gènes.

1.3 Le séquençage au bisulfite (WGBS)

La technique du séquençage au bisulfite est une technique décrite depuis de nombreuses années (Frommer et al., 1992). Elle permet de détecter les modifications m5C mais non les autres

Watson >>AC^mGTTGCTTGAG>> C^m methylated
 Crick <<TGC^mAAGCGAACTC<< C Un-methylated

1) Denaturation ↓

Watson >>AC^mGTTGCTTGAG>> Crick <<TGC^mAAGCGAACTC<<

2) Bisulfite Treatment ↓

BSW >>AC^mGTTUGUTTGAG>> BSC <<TGC^mAAGUGAAUTU<<

3) PCR Amplification ↓

BSW >>AC^mGTTTGTTTGAG>> BSC <<TGC^mAAGTGAATTT<<
 BSWR <<TG CAAACAAACTC<< BSCR >>ACG TTCACCTAAA>>

Figure 20 : Déroulement du séquençage au bisulfite

Les étapes sont : Dénaturation des deux brins d'ADN (Watson and Crick); Traitement au bisulfite qui va convertir les cytosines non-méthylées (bleues) en uraciles, les cytosines méthylées (rouges) ne sont pas changées; Amplification PCR de tous les brins précédemment traités au bisulfite (BS). BSW pour brin Watson; BSC pour brin Crick; BSWR pour brin reverse du brin Watson et BSCR pour brin reverse du brin Crick. Un séquençage classique peut ensuite être réalisé.

a)

ATGCAGCGTTACCATG...

b)

A
 A ATGCA
 ATGCAGCGTTA
 ATGCAGCGTTACCA

C
 ATGC
 ATGCAGC
 ATGCAGCGTTAC
 ATGCAGCGTTACC

G
 ATG
 ATGCAG
 ATGCAGCG
 ATGCAGCGTTACCATG

T
 AT
 ATGCAGCGT
 ATGCAGCGTT
 ATGCAGCGTTACCAT

c)

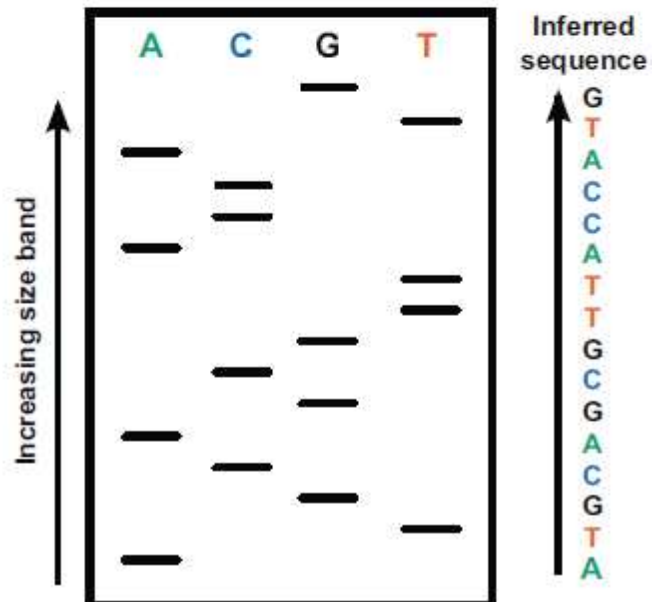


Figure 21 : Fonctionnement du séquençage Sanger avec terminateur de synthèse (Heather and Chain, 2016).

- Exemple d'ADN à séquencer
- Des ddNTP nucléotides marqués radioactivement ou fluorescents d'un type donné sont ajoutés à faible concentration dans la réaction de polymérisation en chaîne. Leur incorporation va arrêter la synthèse. Dans chacune des quatre réactions (avec chacune les 4 dNTP et un ddNTP) on aura des fragments de diverses tailles correspondant à l'incorporation d'un ddNTP (souligné sur la figure).
- Les fragments générés vont ensuite pouvoir être visualisé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide de haute résolution. La séquence ADN pourra être reconstituée en lisant le gel de bas en haut car les séquences courtes migrent plus vite.

modifications. Le principe est simple, l'ADN est extrait puis dénaturé et traité au bisulfite. Ce traitement va modifier les bases de l'ADN, toutes les cytosines vont être changées en uraciles à la seule condition qu'elles ne soient pas méthylées. Si une cytosine est méthylée en m5C, elle restera une cytosine. Une fois ce traitement réalisé, les échantillons sont amplifiés par PCR et séquencés. Grâce à une analyse bioinformatique et une comparaison avec le génome initial ou un séquençage sans traitement bisulfite, on pourra analyser les bases ayant été modifiées et n'étant donc pas méthylées. A l'inverse, les bases cytosines n'ayant pas été modifiées sont méthylées (Fig. 20)(Xi and Li, 2009). Si cette technique permet la détection des m5C sur un génome complet sans autant de difficultés qu'avec les techniques précédemment présentées, elle ne permet pas la détection des m6A ni des m4C.

Les trois techniques de détection des méthylations de l'ADN présentées ci-dessus ont majoritairement été utilisées chez les eucaryotes (Ooi et al., 2009 pour détail). La majeure partie des études ayant publié des méthylomes à l'aide de ces techniques ont dû les coupler (par exemple WGBS suivi de digestions pour vérification) afin d'obtenir des résultats fiables.

L'arrivée de la nouvelle technique de séquençage SMRT a révolutionné la détection des méthylations sur l'ADN, autres que les m5C, notamment chez les bactéries.

1.4 Le SMRT

Diverses techniques de séquençage ont été développées au cours du temps. Je ne les détaillerai pas toutes ici mais uniquement les deux principales (Heather and Chain, 2016 pour revue). En 1977, une grande avancée est faite dans la technologie du séquençage avec la présentation du protocole de séquençage Sanger utilisant des ddNTPs (Sanger et al., 1977). La technique consiste à synthétiser le brin d'ADN à séquencer dans quatre mix différents, chacun contenant les quatre bases naïves (dNTPs) (adénine, thymine, cytosine et guanine) et l'une des quatre bases modifiées en 2',3'-didéoxynucléotide (ddNTP) (Sanger et al., 1977). Si le ddNTP est incorporé, la synthèse s'arrête. Après amplification dans les 4 solutions on aura la possibilité de connaître la séquence ADN après migration sur gel des fragments synthétisés (Fig. 21). Cette technique est assez fiable mais reste fastidieuse pour des séquences longues car la lecture sur gel ainsi que l'incorporation des ddNTPs n'est efficace que sur des séquences courtes et nécessite donc une fragmentation de l'ADN. On nomme les technique de séquençage utilisant des protocoles dérivés ou amenant à des résultats similaires comme le séquençage par coupure chimique (Maxam and Gilbert, 1977) font partie de ce qu'on appelle le séquençage de première génération (Heather and Chain, 2016).

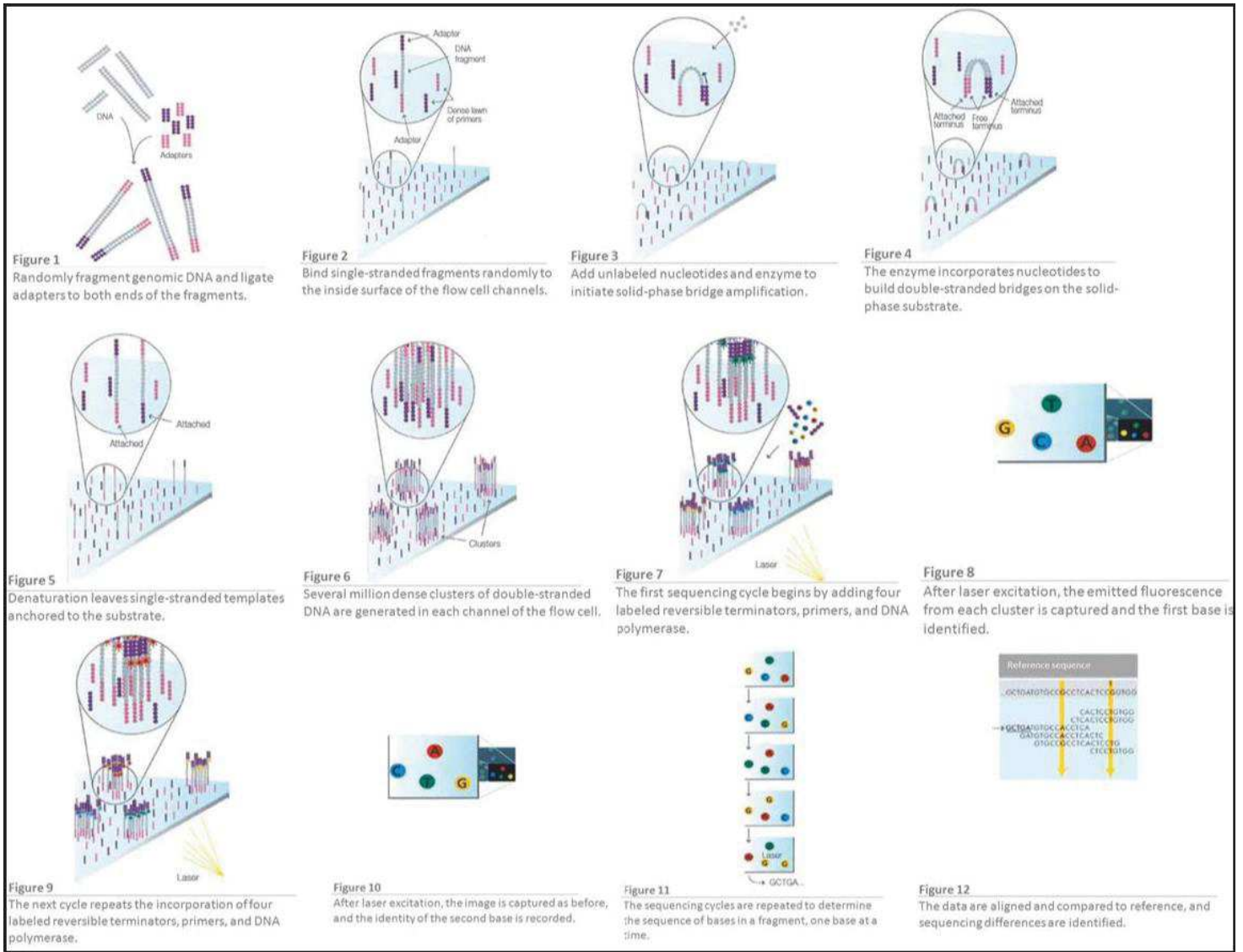


Figure 22 : Fonctionnement du séquençage Illumina (Illumina.com)

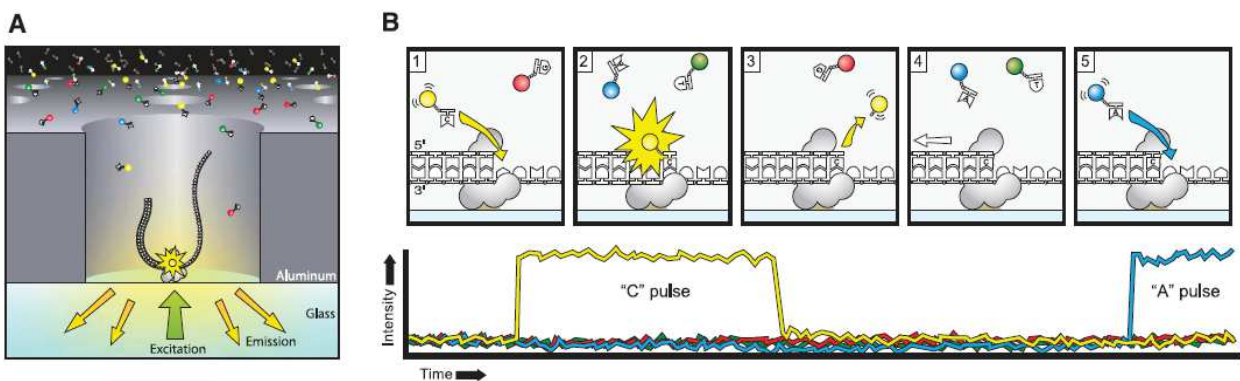


Figure 23 : Principe du séquençage SMRT (Eid et al., 2009).

A - Configuration géométrique de l'expérience. Une molécule unique d'ADN liée à l'ADN polymérase F29Φ est immobilisée au fond d'une structure nanophotonique empêchant tout mouvement (ZMW pour Zero-move waveguide), illuminée par en dessous avec une lumière laser. La structure ZMW va provoquer une excitation suffisante pour détecter l'incorporation de chaque nucléotide phosphomarcqué.

B - Représentation schématique de l'incorporation des nucléotides. (1) Un nucléotide phosphomarcqué va se lier au site actif de la polymérase, (2) cet attachement amène une émission de fluorescence correspondant au nucléotide incorporé. (3) La libération du pyrophosphate amène la disparition du signal fluorescent. (4) La polymérase avance jusqu'au site suivant, et (5) le nucléotide suivant vient se lier à la polymérase de la même façon.

Le séquençage de seconde génération correspond à l'utilisation de dNTPs étant marqués radioactivement ou fluorescents mais aussi en utilisant le pyrophosphate émis lors de l'incorporation d'un nucléotide natif (Ronaghi et al., 1998). Le séquençage Illumina fait partie de cette génération de séquençage mais n'est pas le seul (Heather and Chain, 2016 pour les autres techniques). Le séquençage Illumina fonctionne comme suit (Fig. 22). L'ADN à séquencer est fragmenté en brins d'environ 300 paires de bases et ces fragments sont liés à des adaptateurs. Ces adaptateurs sont ensuite eux-mêmes liés sur des canaux. Plusieurs cycles de polymérisation vont ensuite être réalisés en utilisant des dNTPs natifs afin d'obtenir une banque de chaque fragment d'ADN. Quand la banque est suffisante, on ajoute des nucléotides terminateurs réversibles marqués ainsi que l'ADN polymérase. On excite ensuite grâce à un laser les nucléotides afin de déterminer lequel a été incorporé. On réalise à nouveau l'ajout des nucléotides marqués et de la polymérase et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du fragment complet. L'ensemble des fragments ainsi obtenus sont ensuite alignés sur le génome afin de composer une séquence fiable (Illumina© Sequencing, Illumina.com). Les techniques de deuxième génération de séquençage ont apporté un gain de temps énorme au niveau du séquençage ainsi qu'un gain en fiabilité des séquences obtenues avec un taux d'erreur faible. Malgré cela, du fait des courtes séquences amplifiées, l'assemblage de génomes complet restait un problème. Notamment pour les génomes contenant de nombreuses séquences répétées rarement suffisamment couvertes lors du séquençage. L'autre problème était l'amplification préalable par PCR obligatoire pouvant amener de potentielles erreurs et empêchant la détection de modification sur l'ADN originel.

La troisième génération de séquençage reste sujet à débat quand à sa classification mais je la définirai comme l'ensemble des techniques de séquençage d'une seule molécule d'ADN sans amplification préalable (Heather and Chain, 2016 pour détail). En 2003, Braslavsky présente la possibilité de séquencer à partir d'une seule molécule d'ADN (Braslavsky et al., 2003). Cinq ans plus tard, le premier génome est publié grâce à cette technique (Harris et al., 2008) et en 2009 le « Single Molecule Real Time sequencing » voit le jour (Eid et al., 2009). Le principe de ce séquençage est basé sur les techniques de seconde génération allié à de nouvelles techniques. Une DNA polymérase liée à une molécule d'ADN sont attachées au fond d'un puits. Des nucléotides marqués avec des fluorophores (différents pour chaque base) sont ensuite ajoutés. Chaque incorporation amènera l'émission de fluorescence alors détectée grâce à la microscopie. En mettant bout à bout les images (i.e., film) des émissions de fluorescence, on peut ensuite retranscrire la séquence synthétisée (Fig. 23) (Eid et al., 2009). Son avantage premier est de séquencer toute la molécule d'ADN et donc avec les avancées techniques de séquencer de grands fragments d'ADN qu'il sera plus facile d'aligner pour reconstituer le génome. En plus de cela, la molécule d'ADN séquencée est native, elle ne subit donc

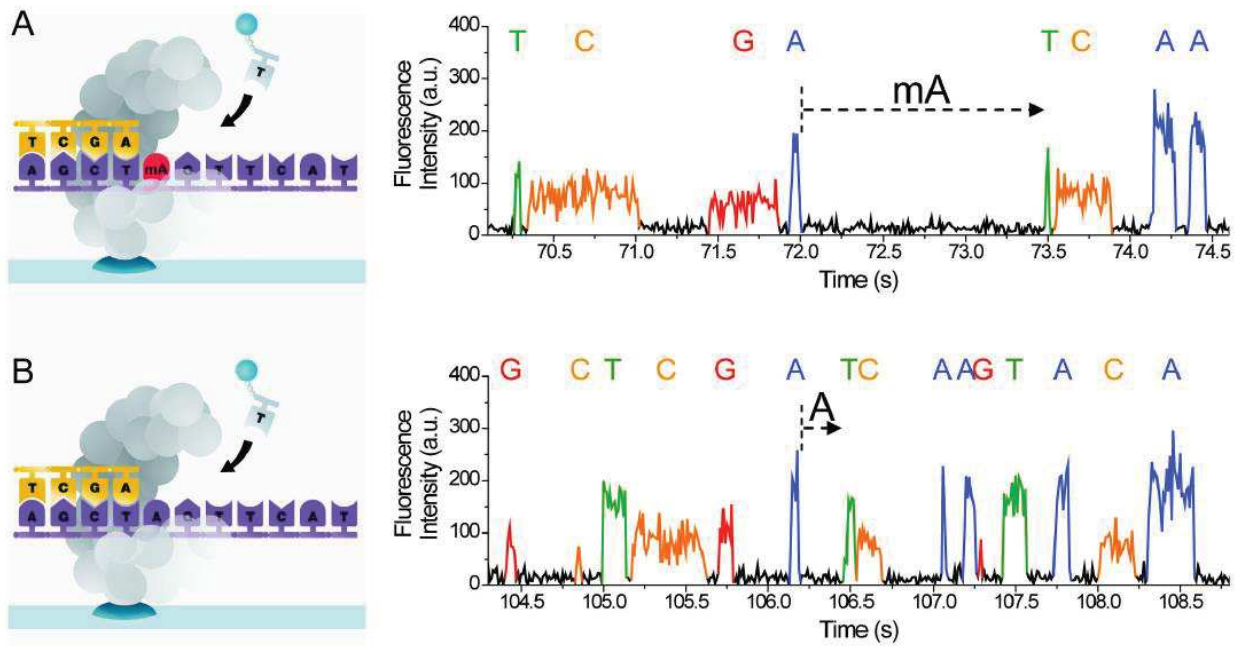


Figure 24 : Détection de la méthylation par SMRT (Flusberg et al., 2010).

- A- Représentation schématique de la polymérisation d'un ADN méthylé (en haut) ou non méthylé (en bas).
- B- Lors d'un séquençage sans méthylation, les temps d'émission de fluorescence sont relativement courts et réguliers. Dans le cas d'une base méthylé le temps d'incorporation est approximativement 5X supérieur à celui d'une base non méthylée.

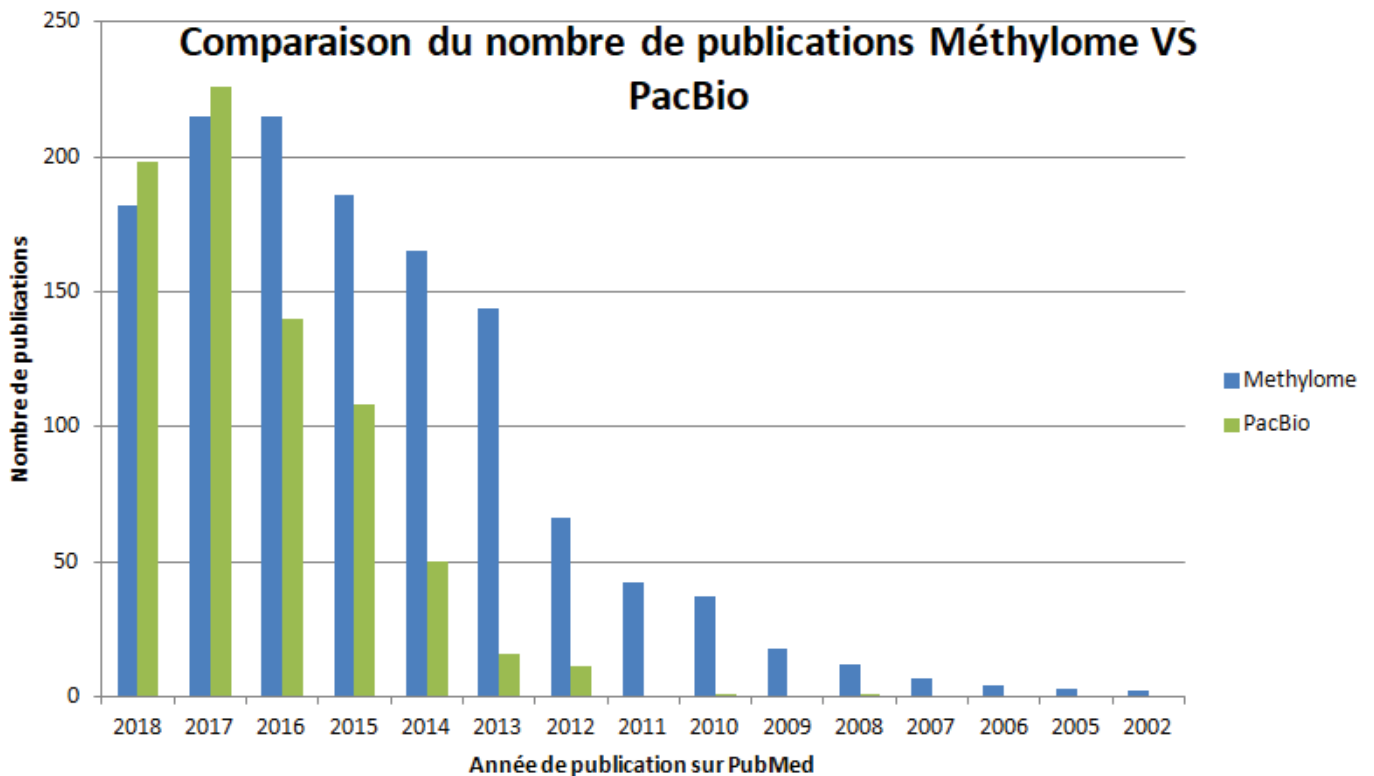


Figure 25 : Evolution du nombre de publications concernant des méthylomes et corrélation avec l'apparition du séquençage PacBio de 2002 à 2018

aucune modification préalable au séquençage (contrairement à ce qui se passe en cas d'étape d'amplification préalable) ce qui amena un an plus tard le protocole de détection de la méthylation de l'ADN par ce séquençage (Flusberg et al., 2010). Le principe de séquençage reste le même que décrit précédemment. La différence réside dans le fait qu'ici on va non seulement mesurer l'émission de fluorescence mais aussi calculer l'IPD (Inter Pulse Duration ou temps séparant chaque émission de fluorescence) correspondant au temps mis par l'ADN polymérase pour incorporer chaque nucléotide. L'ADN polymérase va en effet mettre plus de temps à reconnaître une base méthylée sur le brin d'ADN et donc mettre plus de temps à incorporer le nucléotide correspondant (Fig. 24) (Flusberg et al., 2010). On peut donc, suite au séquençage, déterminer par analyse bioinformatique quelles sont les bases modifiées et sur quel brin d'ADN (ce qui n'est pas possible avec les techniques de digestion). Il est à noter qu'initialement seules les m6A étaient détectées efficacement. Par la suite, la capacité du taux de couverture ainsi que la mise au point de certains tampons et le développement de logiciels d'analyse plus performant, ont permis de détecter aussi les m4C, et de manière moins sûre, les m5C (Davis et al., 2013).

Cette technique a permis la découverte et l'étude des méthylations présentes sur l'ADN à une échelle beaucoup plus importante que ce n'était le cas avant. En 2009, seules 19 articles sur les méthylomes sont publiés, en 2017 on en recense 243 (Fig. 25). Ces informations sont d'autant plus flagrantes si on corrèle l'augmentation des publications sur des méthylomes et l'apparition du séquençage PacBio (SMRT). Chez les bactéries, les premiers méthylomes SMRT paraissent en 2012 pour *E. coli* (Fang et al., 2012), et six autres bactéries comme *Bacillus cereus* ou *Campylobacter jejuni* (Murray et al., 2012). Ces méthylomes révèlent que la grande majorité des sites cibles de MTases (présents sur la base de données REBASE (Roberts et al., 2010)) sont méthylés sur le génome. Il existe dans la majeure partie des bactéries des gènes codant pour des MTases : 94% des plus de 3300 génomes existants en 2013 contenaient des gènes codant pour des MTases (Davis et al., 2013) mais les séquences cibles de ces MTases n'étaient pas décrites. Grâce au SMRT, on peut détecter des sites revenant régulièrement sur le génome contenant une méthylation et donc grâce à une corrélation entre ce méthylome et la base de données REBASE associer une MTase à la séquence qu'elle cible (Davis et al., 2013).

De nombreux méthylomes ont été publiés depuis l'arrivée du SMRT dont celui de nombreuses bactéries pathogènes. On peut notamment citer celui d'*H. pylori* (Krebes et al., 2013) qui associée à d'autres études de la méthylation de l'ADN sur cette bactérie (Kumar et al., 2012 ; Furuta et al., 2014) suggère une forte importance de la méthylation de l'ADN dans les phénotypes de mobilité, adhésion et virulence chez cette bactérie. Divers méthylomes détaillés ont aussi été publiés comme celui de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Wibberg et al., 2016), *Xanthomonas* (Seong et al., 2016),

S. enterica (Pirone-Davies et al., 2015), *Aeromonas hydrophila* (Lim et al., 2016), *Ralstonia solanacearum* (Erill et al., 2017) ou encore *Caulobacter* (Kozdon et al., 2013). Si il existe de nombreux autres méthylomes publiés un récent article a permis d'avoir une compréhension beaucoup plus globale des méthylomes bactériens en publiant 230 méthylomes d'espèces différentes d'un coup (Blow et al., 2016). Grâce à toutes ces études, il a pu être démontré que la méthylation de l'ADN chez les bactéries était un mécanisme très fortement conservé au travers des divers genres et espèces. Si certaines MTases sont spécifiques d'une espèce, d'autres vont être retrouvées au sein de familles bactériennes comme les MTases Dam, Dcm (chez les entérobactéries) et CcrM (chez les alpha-protéobactéries) (Blow et al., 2016). La découverte de nouvelles MTases (orphelines ou non), des motifs qu'elles méthylent et des positions de ces motifs ouvre de nouvelles opportunités dans l'étude de la régulation de la transcription des gènes par la méthylation de l'ADN.

Suite aux travaux présentés dans le chapitre II de cette thèse, nous pouvons donc affirmer que la surexpression de Dam chez *Photobacterium luminescens* amène à des variations dans divers phénotypes. Dans cette partie, nous avons voulu vérifier l'impact de cette surexpression de Dam sur la méthylation globale des sites GATC à l'échelle du génome et la position de ces sites. Nous avons aussi voulu étudier des changements de méthylation au cours de la croissance et dans la sous-population résistante aux peptides antimicrobiens (AMP-R) (Mouammine et al., 2017). Le dernier point a été d'analyser les autres méthylation présentes chez *Photobacterium luminescens* et tenter d'associer les motifs retrouvés méthylés à leurs enzymes respectives. Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des méthylomes de *P. luminescens* grâce à la technique du SMRT en phase exponentielle de croissance (EP) (DO=0.3), phase exponentielle tardive (LE) (DO=0.9), début de phase stationnaire (ES) (DO=1.5) et en phase stationnaire avancée (LS) (DO>3). Nous avons aussi réalisé un méthylome de la souche résistante aux peptides antimicrobiens ainsi que celui de la souche surexprimant Dam (Dam+) et son témoin (Control). La dernière étape clé était de pouvoir détecter les méthylation m5C grâce à la technique du bisulfite, nous avons donc réalisé un séquençage bisulfite (WGBS) en phase exponentielle et stationnaire de croissance.

[2\) Le méthylome complet de la bactérie pathogène d'insecte *P. luminescens* révèle l'existence d'adénines non méthylées](#)

Nous avons pu identifier sur le génome de la souche étudiée, *P. luminescens* TT01, 12 gènes codant pour des MTases dont 7 orphelines. Parmi ces gènes, on note le gène *dam*, le gène *dcm* ainsi que le gène *hsdM* étant les 3 MTases les plus décrites chez les entérobactéries (Table 1, Cf. Chapitre III.3 pour toutes les figures et tables de cette partie).

Les autres MTases retrouvées chez *P. luminescens* TT01 sont retrouvées chez diverses autres entérobactéries à l'exception de *plu1935* (retrouvée uniquement chez d'autres souches de *Photorhabdus*) et de *plu4197* présente uniquement dans notre souche. L'analyse couplée du SMRT et du WGBS a permis d'identifier 52041 bases méthylées sur le génome de *Photorhabdus* en condition de croissance exponentielle. Parmi ces bases la grande majorité sont des adénines (m6A). Ces méthylations ont été retrouvées régulièrement dans 8 motifs différents numérotés de I à VII, car deux sont retrouvés associés et donc numérotés IIIa et IIIb. Parmi ces motifs, 5 contiennent une adénine méthylée en position 6 (m6A), 1 une cytosine méthylée en position 4 (m4C) et 2 contenant une cytosine méthylée en position 5 (m5C) (Table 2 et 3). L'analyse des méthylomes dans les différentes conditions de croissance nous a montré une relative stabilité de la méthylation au cours de la croissance. L'expression de ces MTases dans les différentes conditions de croissance nous a permis de différencier deux catégories (Fig. 2). Celles exprimées 10 à 100 fois moins que le gène de référence *gyrB* et celles exprimées à un niveau supérieur à 0.1 fois l'expression de *gyrB* (Fig. 2). De manière générale toutes les MTases sont exprimées de façon similaire dans les phases de croissance expliquant en partie la faible variation de méthylation au niveau génomique selon les phases de croissance testées. Grâce à l'analyse SMRT et la base de données REBASE, nous avons pu corrélérer la majorité des motifs méthylés avec une MTase le ciblant (Table 1).

Nous avons ensuite étudié ces sites plus en détail et avons pu voir que pour tous les motifs détectés, la grande majorité (>94%) étaient méthylés par rapport au nombre de sites totaux retrouvés dans le génome (Table 2 et 3). Nous avons ensuite regardé la position des différents sites méthylés et non méthylés. Parmi les 7 motifs étudiés, seul le motif GATC est retrouvé significativement plus souvent dans les parties promotrices de gènes lorsqu'ils sont non méthylés (Fig. 3). Ceci indique pour ces sites une potentielle compétition entre un régulateur et la MTase car la liaison d'un régulateur sur cette partie promotrice empêcherait la méthylation.

Le méthylome de la sous-population résistante aux peptides antimicrobiens n'a pas fourni d'indice quant à un potentiel rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation des gènes impliqués dans cette résistance. Le méthylome de la souche surexprimant Dam (Dam+) a par contre fourni des résultats intéressants. En effet, on a pu vérifier que parmi le faible nombre de sites non méthylés chez la souche contrôle (61 sites GATC), seuls 4 restaient non méthylés lors de la surexpression de Dam. Puisque la surexpression de Dam a amené à certains phénotypes, on peut légitimement penser que certains des sites GATC devenant méthylé dans cette souche ont un rôle dans la régulation du gène situé en aval. Nous nous sommes finalement intéressés aux 22 sites GATC retrouvés non méthylés dans toutes les conditions de croissance et nous avons retrouvé que 18 de ces sites

deviennent méthylés chez la souche Dam+ (Fig. 4). Nous avons de plus noté que la majorité de ces sites (20/22) sont situés dans la région promotrice potentielle d'un gène, confortant nos hypothèses sur une implication de la méthylation par Dam dans la régulation de l'expression de certains gènes chez *Photobacterium*. A l'inverse, aucun gène décrit comme directement relié aux phénotypes décrits dans les deux articles précédents n'est présent dans cette liste laissant penser à une régulation indirecte de ces phénotypes.

[3\) Article 3 ; Scientific Reports :](#)

The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines

Amaury Payelleville¹, Ludovic Legrand^{1,2}, Jean-Claude Ogier¹, Céline Roques³, Alain Roulet³, Olivier Bouchez³, Annabelle Mouammine^{1,4}, Alain Givaudan¹ & Julien Brillard¹

DNA methylation can serve to control diverse phenomena in eukaryotes and prokaryotes, including gene regulation leading to cell differentiation. In bacteria, DNA methylomes (i.e., methylation state of each base of the whole genome) have been described for several species, but methylome profile variation during the lifecycle has rarely been studied, and only in a few model organisms. Moreover, major phenotypic changes have been reported in several bacterial strains with a deregulated methyltransferase, but the corresponding methylome has rarely been described. Here we report the first methylome description of an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens*. Eight motifs displaying a high rate of methylation (>94%) were identified. The methylome was strikingly stable over course of growth, but also in a subpopulation responsible for a critical step in the bacterium's lifecycle: successful survival and proliferation in insects. The rare unmethylated GATC motifs were preferentially located in putative promoter regions, and most of them were methylated after Dam methyltransferase overexpression, suggesting that DNA methylation is involved in gene regulation. Our findings bring key insight into bacterial methylomes and encourage further research to decipher the role of loci protected from DNA methylation in gene regulation.

DNA methyltransferases (MTases) are enzymes that catalyze the transfer of a methyl group from the universal methyl donor S-Adenosylmethionine (SAM) to a nucleotide¹. MTases are widespread from eukaryotes to prokaryotes: 5-methylcytosine (m5C) and N⁶-methyladenine (m6A) methylation marks have been described in eukaryotes^{2,3} whereas additional N⁴-methylcytosine (m4C) marks can be detected in bacteria and archaea^{4,5}. For years, DNA methylation studies mostly used whole genome bisulfite sequencing (WGBS), which only detects m5C⁶, until the advent of Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing made it possible to also detect m4C and m6A modifications⁷.

DNA methylation in bacteria is involved in many cellular processes. It provides a defense against foreign DNA in restriction-modification systems (RM), where a restriction endonuclease (REase) acts in coordination with a DNA MTase. The MTase methylates self-DNA whereas exogenous DNA is cleaved by the cognate REase due to different methylation patterns. RM-MTases are classified into 4 different groups based on biochemical properties (e.g. their subunit organization, their recognition of palindromic vs asymmetric target DNA sequences...)⁸. The REBASE database is designed to identify REases and MTases and currently lists thousands of putative RM-MTases⁹.

Many studies, particularly in *Escherichia coli*, have described the role of DNA methylation in discriminating between the parental and newly-synthesized strand using the DNA mismatch repair (MMR) system¹⁰. During replication, errors may occur, and the MMR system excises the wrong base on the newly-synthesized unmethylated DNA strand¹⁰. The MMR system requires Dam (DNA adenine MTase), an MTase that is not coupled with a restriction enzyme and so called "orphan" or "solitary" MTase⁵. In *Gamma*proteobacteria, Dam methylates

¹DGIMI, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France. ²LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, Castanet-Tolosan, France. ³GeT-PlaGe, INRA, US 1426, Genotoul, Castanet-Tolosan, France. ⁴Present address: Department of Fundamental Microbiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Quartier UNIL/Sorge, Lausanne, CH1015, Switzerland. Amaury Payelleville and Ludovic Legrand contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.B. (email: julien.brillard@umontpellier.fr)

5'-GATC-3' motifs. Dam is also involved in epigenetic mechanisms by strongly contributing to the regulation of several genes expression⁵. In *E. coli* for example, the Lrp regulator can bind sites containing GATC sequences in the *pap* operon promoter region¹¹. Lrp has greater affinity to unmethylated sites than fully-methylated (methylation on both strands) sites, and the competition between Dam and Lrp binding gives rise to two sub-populations, one expressing the Pap pilus and the other not¹². Dereglulation by mutation or overexpression of Dam in several bacterial species can lead to drastic phenotypic changes. For example, Dam overexpression leads to a decrease in virulence for *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila* and *Photobacterium luminescens*^{13–18}. Dam mutants have also been described as showing impaired virulence in *S. enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. actinomycetemcomitans* and *Y. pestis*^{19–23}. Dam mutants are not viable in *Y. pseudotuberculosis* and *V. cholera*¹⁶ or suspected to be unviable in other bacterial species¹⁸. DNA cytosine MTase (Dcm) is another solitary MTase that is well conserved in *Gamma*proteobacteria²⁴. The *dcm* gene is associated to *vsr* which encodes the very-short-patch repair system involved in T/G mismatches correction²⁴. Dcm adds a methyl group to the second cytosine of CCWGG motifs. This solitary MTase has been shown to be involved in drug resistance, translation²⁵ and stationary phase gene expression²⁶. In addition to Dam, the best known example of solitary MTase involved in epigenetic mechanisms in bacteria²⁷ is the CcrM (Cell cycle regulated MTase) found in many *Alphaproteobacteria*. Its main role in *Caulobacter crescentus* is regulation of the cell cycle and cell division^{28,29}. It is essential for cell viability in fast-growing conditions³⁰ but not in slow-growing conditions such as minimal media³¹. It has not been described as involved in MMR³¹. Many other solitary MTases are present in many bacterial genomes, but their role has not yet been described³².

SMRT sequencing can now detect all DNA methylation marks in genomes, opening opportunities to detect new methylated motifs⁷. This new-generation sequencing technology has been used to describe the methylome of several microorganisms. In bacteria, there has been a strong focus on animal pathogens, but the methylomes of some plant pathogens have also been reported^{32–41}.

P. luminescens TT01 is an entomopathogenic bacterium member of the *Enterobacteriaceae*. It is found in symbiosis with a soil nematode from the genus *Heterorhabditis*. This nematobacterial complex is able to kill many crop-pest insects and can be used in biocontrol⁴². During its lifecycle, this bacterium has to switch between mutualism (within the nematode's gut) and a pathogenic state (in the insect). This switch is controlled by a promoter inversion that results in Mad pilus expression⁴³. However, phenotypic heterogeneity among a *P. luminescens* clonal population caused by an as-yet-unknown mechanism is also critical during another step of the bacterial lifecycle. It was recently demonstrated that only a minority (<1%) of the whole bacterial population is responsible for virulence in insects, as it is able to resist the antimicrobial peptides (AMPs) produced by the insect host⁴⁴. The fact that this AMP-resistant subpopulation displays no genetic change compared to the wild-type population has raised the hypothesis that an epigenetic mechanism is involved in the occurrence of this subpopulation⁴⁴. Moreover, we recently showed that overexpression of the *P. luminescens* Dam MTase decreases motility and virulence yet enhances biofilm formation¹⁸. However, the impact of this MTase overexpression on DNA methylation pattern remains to be investigated.

The aim of this study was to provide the first description of the full methylome of *P. luminescens* during different growth phases. We also investigated whether changes in DNA methylation pattern occur within the AMP-resistant subpopulation responsible for insect virulence, or after the Dam overexpression that leads to major phenotypic changes in *P. luminescens*. The various methylomes analyzed here led to the identification of eight methylation motifs, and open new fields of investigation into the role of DNA methylation in bacterial gene regulation.

Results

Predicted MTases in *P. luminescens* TT01. The *P. luminescens* TT01 genome harbors 47 genes which are annotated as methyltransferase or methylase, most of them encoding putative RNA MTases or protein MTases. Only 8 genes (plu0087, plu0338, plu0600, plu2710, plu2942, plu3417, plu3449 and plu3462) are annotated as DNA methyltransferase or DNA methylase⁴⁵. Analysis of the *P. luminescens* TT01 genome using REBASE revealed 12 putative DNA MTase-encoding genes, i.e. the 8 genes cited above, plus plu0233, plu1935 and plu4197 which are annotated as encoding CHP (conserved hypothetical proteins) or unknown proteins, and plu4319 which is annotated as encoding a "Type I site-specific deoxyribonuclease HsdM". Prediction of the protein domains revealed an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase domain (Interpro domain IPR029063) in all of the 12 MTases.

The 12 putative DNA MTase-encoding-genes found in *P. luminescens* TT01 are listed in Table 1. While 4 MTases are associated with REases, 7 are solitary MTases, and one is a hybrid MTase. The 12 loci were located all over the chromosome (Fig. 1). One predicted MTase (plu4319) corresponded to a Type I⁹ while the remaining MTases were presumed to classify as Type II. For 8 of them, REBASE analysis proposed a recognition sequence (Table 1)⁹.

Distribution of predicted MTases in Gram-negative bacteria. The genomic context and taxonomic distribution of putative *P. luminescens* TT01 MTase-encoding genes are presented in Fig. S1. Most (n = 10) of the MTases encoding loci were located in the accessory genome and are associated with phagic regions (n = 4), genomic islands (n = 3), or regions of genomic plasticity (n = 3) (Table 1). The *dam* gene is located in the core genome and an ortholog was present in each of the *Photobacterium* and *Xenorhabdus* (a closely related genus, with similar lifestyle⁴⁶) complete available genomes, with a conserved synteny (Fig. S1). *dam* was also broadly distributed among many (>100) organisms of the *Enterobacteriaceae* family (Fig. S1), suggesting that this gene was ancestral in the genome. In contrast, plu0599, encoding M.PluTI⁴⁷, is also located in the core genome (Table 1) but only conserved in two other strains of *Xenorhabdus* and *Photobacterium* (Fig. S1). Other *P. luminescens* TT01 MTase-encoding genes were variably distributed among *Enterobacteriaceae*. For example, plu4197 was only found

Gene name or Label	Protein label	Interpro Domains	MW (Da)	Type	Cognate partner ^a	Target Sequence ^b	Genome Position	Genomic Location ^c
<i>dam</i> (<i>plu0087</i>)	M.PluDam	IPR012327, IPR012263, IPR029063, IPR023095, IPR002052	31567	Solitary		<u>Gm6ATC</u> (motif I)	81849–82661	Core Genome
<i>plu0233</i>	PluTORF233	IPR002052	121133	Hybrid		?	242879–246085	RGP5
<i>dcm</i> (<i>plu0338</i>)	M.PluTORF0338	IPR001525, IPR029063, IPR018117, IPR031303	54918	Solitary	<i>plu0339</i> , Vsr	<u>Cm5CWGG</u> (motif VI)	361215–362651	GI9
<i>plu0599</i>	M.PluTI	IPR001525, IPR029063	42313	II/R-M	<i>plu0600</i> , PluTI	<u>GGm5CGCC</u> (motif VII)	679941–682068	Core Genome
<i>plu1935</i>	M.PluTORF1935	IPR002941, IPR029063, IPR001091, IPR002052	78939	II/R-M	<i>plu1934</i> , PluTORF1935	<u>AGGCm4CT</u> (motif IV)	2301611–2303698	RGP46
<i>plu2709</i>	M.PluTORF2709	IPR029063, IPR025931, IPR025931	27200	II/R-M	<i>plu2710</i> , PluTORF2710	<u>CTCGm6AG</u> (motif V)	3211074–3213464	RGP66
<i>plu2942</i>	M.PluTORF2942	IPR007757, IPR029063	24665	Solitary		Gm6ATC	3452873–3453517	P71
<i>plu3417</i>	M.PluTORF3417	IPR002941, IPR029063, IPR001091	21450	Solitary		?	4034728–4035285	P80
<i>plu3449</i>	M.PluTORF3449	IPR012263, IPR029063, IPR023095	29802	Solitary		?	4059699–4060469	P80
<i>plu3462</i>	M.PluTORF3462	IPR002941, IPR001091, IPR029063, IPR002052	18578	Solitary		?	4068792–4069265	P80
<i>plu4197</i>	M.PluTORF4197	IPR009528, IPR029063	18824	Solitary		CTGCm6AG	4911020–4911514	GI94
<i>hsdM</i> (<i>plu4319</i>)	M.PluTORF4319	IPR003356, IPR022749, IPR004546, IPR029063, IPR002052	57671	I/R-M	<i>hsdS</i> (<i>plu4320</i>), S.PluTORF4319, <i>hsdR</i> (<i>plu4322</i>), PluTORF4319	<u>GGm6AN6RTGA</u> (motif IIIa)/ <u>TCm6AYN6TCC</u> (motif IIIb)	5043966–5044616	GI95

Table 1. List of putative *P. luminescens* TT01 MTase encoding genes. ^aGene name and protein label of cognate partners (if any) is indicated. ^bPredicted target sequence is indicated. Motifs identified in this study are underlined (with their number in brackets). ^cAs described by Ogier *et al.*⁴⁶. GI, genomic islands; RGP, regions of genomic plasticity; P, phagic regions.

in *P. luminescens* TT01 genome whereas putative orthologs of several MTases (*dcm*, *plu2942*, *plu3417*, *plu3449*, *plu3462*, *plu4319*) were found in more than 50 organisms of the *Enterobacteriaceae* family (Fig. S1). The variable taxonomic distributions of MTases encoding genes and their high prevalence in the accessory genome, including an association with phage or DNA recombination genes, suggest that most of these genes have been acquired by horizontal gene transfer.

Identification of Methylation Motifs in *P. luminescens* Genome. In order to have a complete overview of all the existing methylation sites over the *P. luminescens* genome, two complementary sequencing technologies were used: (i) SMRT sequencing by PacBio which can identify m6A and (to a lesser extent) m4C, and (ii) WGBS by Illumina (MiSeq) which can identify m5C.

The methylome analysis was first performed on DNA samples extracted from WT *P. luminescens* cells harvested during the mid-exponential-growth phase (OD = 0.3–0.4, hereafter referred to as EP for exponential phase). The SMRT sequencing yielded an average coverage of 182X allowing the identification of a high number ($n = 41143$) of statistically significant (QV score ≥ 30 , see the Methods section for details) DNA modification marks and the identification of 6 conserved motifs: GATC; TGGCCA; GGANNNNNRTGA; TCAYNNNNNTCC; AGGCCT; CTCGAG (Table 2). Five of them display m6A modifications and one displays an m4C modification. The WGBS approach allowed the discovery of additional m5C modification marks ($n = 10898$), grouped in two motifs: CCWGG and GGCGCC (Table 3). Altogether, we found 52041 methylated nucleotides distributed all over the *P. luminescens* genome (Fig. 1). For convenience, the 8 identified motifs were numbered according to sequencing technology used and their occurrence in the *P. luminescens* TT01 genome, and are hereafter referred to as motifs I to V for SMRT, with partner motifs GGANNNNNRTGA/TCAYNNNNNTCC numbered IIIa and IIIb, respectively, and motifs VI and VII for WGBS (Tables 2 and 3). The number of methylated motifs found in the genome ranged from 28 (motif V) to 37465 (motif I). The proportion of a given motif found methylated in the *P. luminescens* TT01 genome ranged from 94.0% (motif VII) to 100% (motif V).

Methylation motifs are conserved during various growth conditions. In order to determine whether the methylation pattern can evolve over the course of growth, methylome analysis after SMRT sequencing was also performed on bacterial cells harvested during other growth conditions: WT cells harvested during the late exponential-growth phase (OD = 0.9, hereafter referred as LE), stationary phase (overnight growth reaching OD = 1.5, hereafter referred as SP), and late-stationary phase (i.e., after 24 h of growth, with OD > 3, hereafter referred as LS). WGBS was also performed on WT cells harvested during SP (OD = 1.5). Moreover, the SMRT methylome of a previously-identified sub-population that is resistant to a cationic AMPs (i.e., polymyxin B⁴⁴) was also investigated. The 8 identified motifs were found in all the methylomes analyzed. For a given motif, a high (>94%) and similar proportion (coefficient of variation <0.01) of methylated sites was observed (Tables 2 and 3). For a given motif identified by SMRT sequencing, the IPD (interpulse duration) ratio did not drastically change over the course of growth (Table 2). Taken together, these results indicate that in all the tested conditions, a high

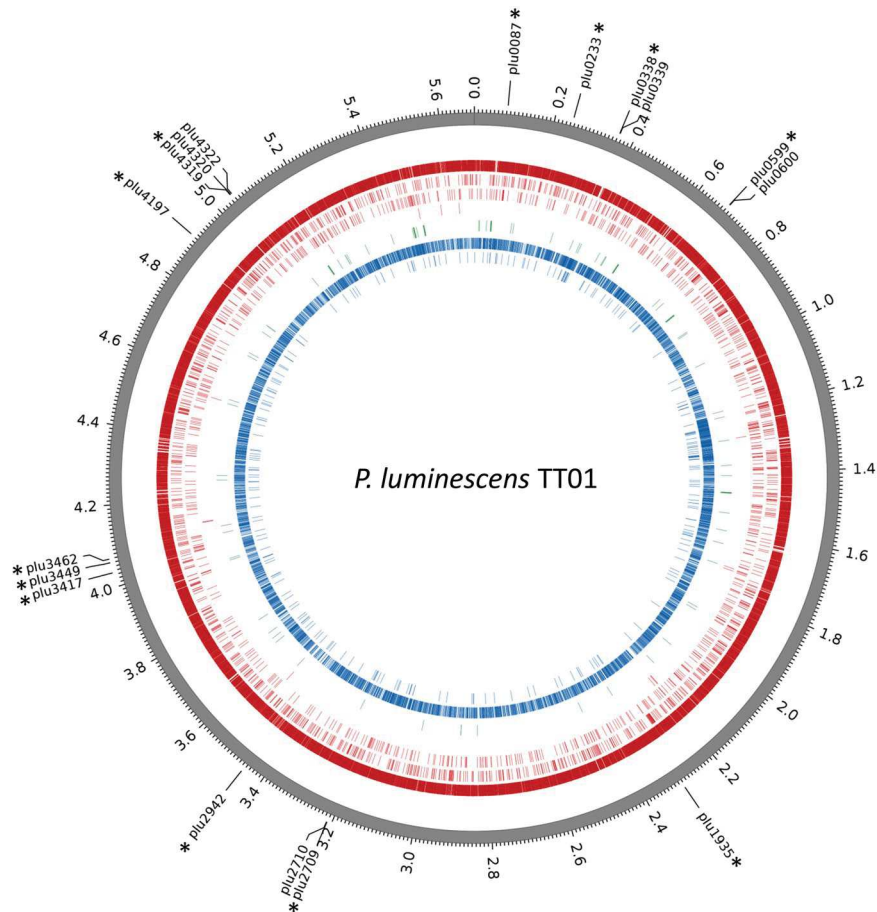


Figure 1. Circos plots displaying the distribution of methylated bases over the *P. luminescens* TT01 chromosome. Outermost track displays the genomic positions in megabases. The colored tracks display the location of the modification marks detected in at least one of the growth conditions tested, for each of the 8 identified motifs. Different colors represent different methylation types. From outer to inner: (red, m6A) GATC, GGANNNNNNRTGA/TCAYNNNNNNTCC, TGGCCA, CTCGAG; (green, m4C) AGGCCT; (blue, m5C) CCWGG, GGCGCC. Tick marks on the outermost track display the genomic positions of the 12 MTase-encoding genes (labelled with an asterisk) and their 5 cognate partners; see Table 1 for details. Note that the *P. luminescens* TT01 strain harbors no plasmid.

rate of methylation was reached for each of the MTases responsible for the methylation of the 8 identified motifs. This suggests that the corresponding MTase-encoding genes were expressed in all these growth conditions.

Expression of predicted MTases. The expression level of the 12 MTase-encoding genes was analyzed by qRT-PCR on mRNA extracted from cells grown in LB and harvested during exponential phase (EP and LE) and stationary phase (SP) relative to *gyrB*, a housekeeping gene. Figure 2 shows that the 12 MTases could be split into two groups: MTases ($n = 7$) encoded by a gene with a low or very low level of expression compared to *gyrB* (less than 10-fold, or 100-fold, respectively) and MTase genes ($n = 5$) that were expressed at a higher level (>0.1 -fold the *gyrB* level of expression). These two groups were identical for the 3 growth conditions tested, revealing that a given MTase gene was expressed at similar levels in the various tested conditions. This is in agreement with the finding that the methylome of TT01 was very similar for all the conditions tested.

Most (5/7) solitary MTase-encoding genes were affiliated to the group with a low level of expression (compared to *gyrB*). Only *dam* and *dcm*, the two broadly conserved solitary MTase-encoding genes, could be assigned to the group with the higher expression (Fig. 2). In contrast, all MTases associated with a RM system except *hsdM* (plu4319), were affiliated to the group with a high level of expression (compared to *gyrB*).

Comparative analysis revealed that none of the 12 MTase-encoding genes was significantly differentially expressed between the LE and EP (Fig. S2A). In contrast, during SP compared to EP, the expression of two and five MTases was significantly downregulated or upregulated, respectively. Among the MTase genes affiliated to the group with a high level of expression, only plu0233 and plu0600 were significantly more expressed during SP compared to EP (Fig. S2B). However, methylome analysis of cells harvested during these two different growth conditions revealed no difference in motif detection, suggesting that a limited increase or decrease in the level of expression of these MTases did not significantly contribute to the genome methylation pattern in *P. luminescens* TT01.

Motif	Fraction	N Detected	Mean Score	Mean IPD Ratio	Mean Coverage
Motif I G<u>A</u>T<u>C</u> (37500)					
EP	0.999	37465	213.9	5.28	148.3
LE	0.999	37445	146.2	5.34	93.4
SP	0.999	37466	109.0	6.18	63.8
LS	0.999	37476	177.0	5.19	120.0
AMP-R	0.999	37444	120.9	5.64	74.6
Control	0.998	37439	136.7	5.61	83.5
DAM+	>0.999	37496	211.2	5.23	141.0
Motif II T<u>G</u>G<u>C</u>C<u>A</u> (1256)					
EP	0.998	1254	205.0	5.37	149.7
LE	0.999	1255	136.0	5.30	94.6
SP	0.998	1254	100.9	6.09	63.9
LS	0.998	1253	161.6	5.04	120.0
AMP-R	0.998	1253	116.0	5.74	75.6
Control	0.998	1254	127.2	5.68	84.6
DAM+	1.000	1256	194.2	5.13	143.8
Motif IIIa/IIIb G<u>G</u>A<u>N</u>N<u>N</u>N<u>N</u>N<u>R</u>T<u>G</u>A (1112)/T<u>C</u>A<u>Y</u>N<u>N</u>N<u>N</u>N<u>N</u>T<u>C</u>C (1112)					
EP	0.997	1109	207.3	5.27	147.2
	0.996	1107	189.8	4.61	145.4
LE	0.994	1105	125.9	4.48	92.3
	0.996	1108	138.1	5.18	93.2
SP	0.994	1105	96.2	5.23	63.1
	0.998	1110	102.4	5.93	63.4
LS	0.988	1099	147.9	4.19	120.2
	0.996	1108	167.6	4.98	121.1
AMP-R	0.993	1104	108.7	4.91	73.7
	0.996	1108	116.0	5.57	74.3
Control	0.994	1105	119.2	4.78	81.5
	0.997	1109	128.8	5.48	83.4
DAM+	0.992	1103	174.0	4.28	139.2
	0.997	1109	194.3	5.01	140.6
Motif IV A<u>G</u>G<u>C</u>C<u>T</u> (184)					
EP	0.978	180	152.0	3.76	154.3
LE	0.978	180	98.6	3.78	93.8
SP	0.978	180	75.4	3.94	61.7
LS	0.973	179	117.4	3.82	110.7
AMP-R	0.962	177	89.6	3.82	78.7
Control	0.984	181	96.4	3.83	87.7
DAM+	0.989	182	143.1	3.69	152.9
Motif V C<u>T</u>C<u>G</u>A<u>G</u> (28)					
EP	1.000	28	200	5.44	151
LE	1.000	28	137	5.26	93.4
SP	1.000	28	99.7	6.65	59.8
LS	1.000	28	160.9	5.21	122.4
AMP-R	1.000	28	77.6	6.25	47
Control	1.000	28	134	5.89	86.1
DAM+	1.000	28	214	5.27	156

Table 2. Motifs detected by SMRT sequencing in *P. luminescens* TT01*. *Methylated base is underlined (m6A or m4C). The number of each motif found in the genome is indicated in brackets. EP, exponential phase; LE, late exponential phase; SP, stationary phase; LS, late stationary phase; AMP-R, polymyxinB-resistant subpopulation; Control, *P. luminescens* TT01 harboring the pBBR1MCS5 empty plasmid; Dam+, Dam overexpressing *P. luminescens* strain harboring the pBB-Dam plasmid. IPD, interpulse duration.

Motif	Fraction	N Detected	Mean Coverage
Motif VI CCWGG (10998)			
EP	0.948	10428	51.9
SP	0.953	10486	49.9
Motif VII GGGCC (500)			
EP	0.940	470	56.8
SP	0.942	471	50.5

Table 3. Motifs detected by bisulfite sequencing in *P. luminescens* TT01*. *Methylated base is underlined (m5C). The number of each motif found in the genome is indicated in brackets. EP, exponential phase; SP, stationary phase.

Gene	EP			LE			SP		
	Expression	Std. Error	95% C.I.	Expression	Std. Error	95% C.I.	Expression	Std. Error	95% C.I.
<i>dam</i> ^s	1.512	1.464 - 1.544	1.461 - 1.597	1.254	0.936 - 1.820	0.765 - 2.092	1.331	1.095 - 1.616	0.961 - 1.893
233	0.236	0.224 - 0.244	0.221 - 0.252	0.253	0.200 - 0.329	0.169 - 0.365	1.194	1.007 - 1.455	0.942 - 1.542
<i>dcm</i> ^s	0.427	0.384 - 0.476	0.383 - 0.476	0.41	0.335 - 0.519	0.293 - 0.572	1.758	1.534 - 2.024	1.440 - 2.192
600	0.585	0.558 - 0.631	0.556 - 0.638	0.926	0.766 - 1.160	0.650 - 1.260	3.497	2.938 - 4.412	2.503 - 4.644
1935	0.022	0.007 - 0.042	0.006 - 0.044	0.099	0.074 - 0.144	0.058 - 0.166	0.003	0.001 - 0.004	0.001 - 0.005
2709	0.474	0.415 - 0.539	0.411 - 0.542	1.027	0.862 - 1.185	0.806 - 1.259	5.638	4.789 - 6.548	4.305 - 7.476
2942 ^s	<0.001	0.000 - 0.000	0.000 - 0.000	0.001	0.001 - 0.002	0.000 - 0.002	0.029	0.025 - 0.036	0.023 - 0.038
3417 ^s	0.004	0.003 - 0.005	0.003 - 0.005	0.004	0.003 - 0.005	0.003 - 0.005	0.006	0.005 - 0.008	0.004 - 0.010
3449 ^s	<0.001	0.000 - 0.000	0.000 - 0.000	<0.001	0.000 - 0.000	0.000 - 0.000	<0.001	0.000 - 0.001	0.000 - 0.002
3462 ^s	0.009	0.008 - 0.011	0.008 - 0.011	0.009	0.007 - 0.011	0.006 - 0.012	0.033	0.023 - 0.048	0.018 - 0.060
4197 ^s	0.005	0.005 - 0.005	0.005 - 0.006	0.006	0.004 - 0.009	0.003 - 0.010	0.015	0.010 - 0.023	0.008 - 0.030
4319	0.006	0.004 - 0.007	0.004 - 0.008	0.006	0.004 - 0.009	0.003 - 0.010	0.015	0.012 - 0.019	0.011 - 0.022

Figure 2. Relative expression levels of MTase genes in *P. luminescens* TT01. The fold difference in expression levels of each MTase gene relative to the gene coding for *gyrB* (plu0004) is indicated. Measurements were performed on RNA extracted from 3 independent experiments. EP, exponential phase; LE, late exponential phase; SP, stationary phase. Various colors represent various ranges of level of expression. Green, >1-fold the *gyrB* gene; light green, >0.1-fold the *gyrB* gene. Orange, <0.1-fold the *gyrB* gene; dark orange, <0.01-fold the *gyrB* gene. ^sSolitary MTase.

Finally, given their very low expression levels (<0.001-fold the *gyrB* gene), five solitary MTases (Plu2942, Plu3417, Plu3449, Plu3462 and Plu4197) could be assumed to be inactive and therefore may not significantly contribute to the genome methylation pattern in *P. luminescens* TT01.

Motif-MTase assignment. Based on *in silico* analysis, 7 of the 8 identified motifs could be assigned to 6 of the MTases found in the genome (Table 1), as follows. The m6A modifications observed in motifs I, III and V could be targeted by the MTases Dam (plu0087, solitary MTase), HsdM (plu4319, RM system) and plu2709 (RM system), respectively; the m4C modifications observed in motif IV could be targeted by plu1935 (RM system); the m5C modifications observed in motifs VI and VII could be targeted by Dcm (plu0338, solitary MTase) and PluTI (plu0599, RM system), respectively (Table 1). Thus, only the m6A modifications observed in motif II could not be associated to an MTase based on *in silico* analysis. Considering the affiliation of plu0233 to the group with the high level of expression (Fig. 2), motif II could be targeted by plu0233 (a hybrid REase-MTase).

Genome-Wide Analysis of Modification Profiles. All of the 52041 methylated nucleotides found in these 8 methylated motifs were distributed across the genome (Fig. 1). A dedicated webpage with a genome browser displaying the precise position of the methylated nucleotides has been generated (access details can be found in the “Data Availability” section below).

The distribution over the TT01 chromosome of the most prevalent methylation motif (GATC) was analyzed using the DistAMO tool and revealed a heterogenic GATC motif distribution (Fig. S3). As regions with a high GATC density are also regions displaying a high DNA methylation rate, their genomic localization was identified, and their distribution in the core and accessory genome of *P. luminescens* was determined. The 38 high-GATC-density regions identified are listed in Table S1. Eighteen were distributed in the core genome, and 20 in the accessory genome as follows: genomic islands (GI, n = 14), regions of genomic plasticity (RGP, n = 4), or phagic regions (n = 2). The major functions associated with these regions were “metabolism” (n = 22), “virulence” (n = 5) and “antibiotic synthesis” (n = 5)⁴⁶.

Methylation pattern of a clonal subpopulation. We previously identified a small fraction of the *P. luminescens* TT01 population that is resistant to cationic AMPs and revealed that this subpopulation is the one responsible for successful infection in insects. Using SMRT sequencing, we showed that this subpopulation was genetically identical to a bacterial population composed of >99% of cells with an AMP-sensitive phenotype⁴⁴.

Here, we analyzed the SMRT data on the methylation pattern of the AMP-resistant subpopulation in order to identify the differences in m4C or m6A modification marks compared to the control sample (EP) corresponding to cells with an AMP-sensitive phenotype. The number of modification marks identified was 41114 in the AMP-resistant subpopulation (Table 2) and 41143 in the control sample (EP). For each of the motifs analyzed, a similar proportion (ranging from 96.2% to 100% depending on motif) of methylated sites was observed (coefficient of variation <0.01) between the AMP-resistant subpopulation and the control sample (Table 2). Altogether, only 37 modification marks differed between the two samples, as follows: 26 in motif I, 3 in motif II, 4 in motif III, and 4 in motif IV (detailed data can be found in the genome browser). None of these differential modification marks was located in the vicinity of the genomic regions harboring the *pbgP* operon (encoding enzymes involved in LPS modification and required for the AMP resistance) or the *phoP/phoQ* genes (encoding a two-component system required for the activation of *pbgP* expression). Thus, the global methylome of the AMP-resistant subpopulation analyzed after SMRT sequencing was highly similar to that of the WT grown during the control condition.

Analysis of the location of unmethylated motifs. For each of the 8 motifs identified, and for the four growth conditions tested, the number of unmethylated motifs are rare in *P. luminescens* (Fig. 3), in agreement with the high fraction of modifications marks identified (Tables 2 and 3). The location of the motif-associated methylation marks was determined relative to the position of neighboring ORFs: either in a putative promoter region (i.e. <200 bp upstream from a start codon), intragenic (inside an ORF), or in other intergenic regions (i.e. >200 bp from a start codon, or downstream of an ORF). For each motif, the fraction of motifs with modification marks (detected in at least one growth condition) mapping to a putative promoter region, as well as the fraction of motif without modification marks (detected in the four growth conditions tested) was calculated. These fractions were compared to the fraction of the corresponding motif mapping to putative promoter regions found in the genome (Fig. 3). For motif II to motif VII, the fraction of unmethylated motifs located in putative promoter regions was not significantly different compared to that observed elsewhere in the genome (i.e. inside an ORF or >200 bp from a start codon, or downstream of an ORF). In contrast, the fraction of unmethylated motif I (in at least one of the four growth conditions tested) located in putative promoter regions was significantly higher than that observed elsewhere in the genome ($p < 0.001$, Fisher's exact test) (Fig. 3).

We therefore focused on the precise location of the conserved unmethylated motifs I (GATC). Unmethylated GATC motifs are rare in *P. luminescens*: only 56 sites out of 37500 were unmethylated in at least one of the 4 growth conditions tested (Fig. 3). Only a limited number ($n = 16$) of these unmethylated GATC motifs were located inside an ORF while the majority of them ($n = 41$) were located either in putative promoter regions, or in other intergenic regions (Fig. 3). As described above, the fraction of these unmethylated GATC motifs located in putative promoter regions was significantly higher than that observed elsewhere in the genome. Among the 56 GATC motifs unmethylated in at least one growth condition, 35 GATC motifs were unmethylated in three or four of the growth conditions tested (detailed data are available in the genome browser). Strikingly, 22 GATC motifs were unmethylated in all four growth conditions tested. Only two were located in a gene body, while the remaining 20 were located in putative promoter regions, with 4 of them mapping to the same promoter region (i.e. upstream *plu1732*) (Fig. 4). These 22 motifs were distributed all over the chromosome (Fig. 4). Interestingly, all these 22 motifs were still unmethylated in the AMP-resistant subpopulation described above (Fig. 4). Taken together, these results suggest the existence of factors (e.g., DNA binding proteins) hindering DNA methylation at these particular sites. Such factors are presumably always present in the various growth conditions tested, including in the AMP-R subpopulation. No conserved motif, recognizable by transcription factors was observed in these 22 loci based on MEME analysis (data not shown).

Methylome modifications by Dam-MTase overexpression. We then investigated whether the high proportion (99.8%, Table 2) of the methylated GATC motifs identified in a reference condition could be increased by Dam MTase overexpression. The methylome of a strain overexpressing the Dam MTase was therefore analyzed and compared to its control strain (harboring an empty plasmid).

The number of modification marks identified in the strain overexpressing the Dam MTase and in the control sample (harboring an empty plasmid) was 41175 and 41119, respectively (Table 2). The 68 modification marks differing between the two samples were distributed as follows: 57 in motif I (GATC) which is recognized by Dam MTase, 2 in motif II, 2 in motif IIIa, 4 in motif IIIb and 3 in motif IV (detailed data can be found in the genome browser). As described above, 22 GATC motifs were unmethylated in all four growth-curve time-points tested and were also unmethylated in the control strain harboring an empty plasmid (Fig. 4). In contrast, most of these motifs ($n = 18$) were found methylated in the strain overexpressing the Dam MTase (Fig. 4). Thus, with only 4 out of 37500 GATC sites found unmethylated in the strain overexpressing the Dam MTase, the proportion of methylated motif I was therefore higher than in the control (99.99% vs 99.83%, respectively). For the other motifs analyzed, a similar proportion of methylated motifs was observed in the strain overexpressing the Dam MTase (coefficient of variation <0.01). Thus, besides an increase in GATC methylation, the global methylome of the strain overexpressing the Dam MTase displayed only a limited number of differences compared to the methylome of the control. These results reveal that Dam overexpression caused a modification of the DNA methylation pattern, which was focused on the unmethylated GATC sites found in the control condition as well as in other various growth conditions tested.

Discussion

There has been a recent surge in bacterial methylomic data released^{32,33,35,37–39,48}. However, in these studies, SMRT sequencing only allowed the analysis of m6A and m4C modification marks, as the thorough identification of the third known DNA methylation mark (i.e. m5C) requires other investigations such as WGBS. Furthermore, most of these studies were performed in only one growth condition. While the genome of *P. luminescens* TT01 was

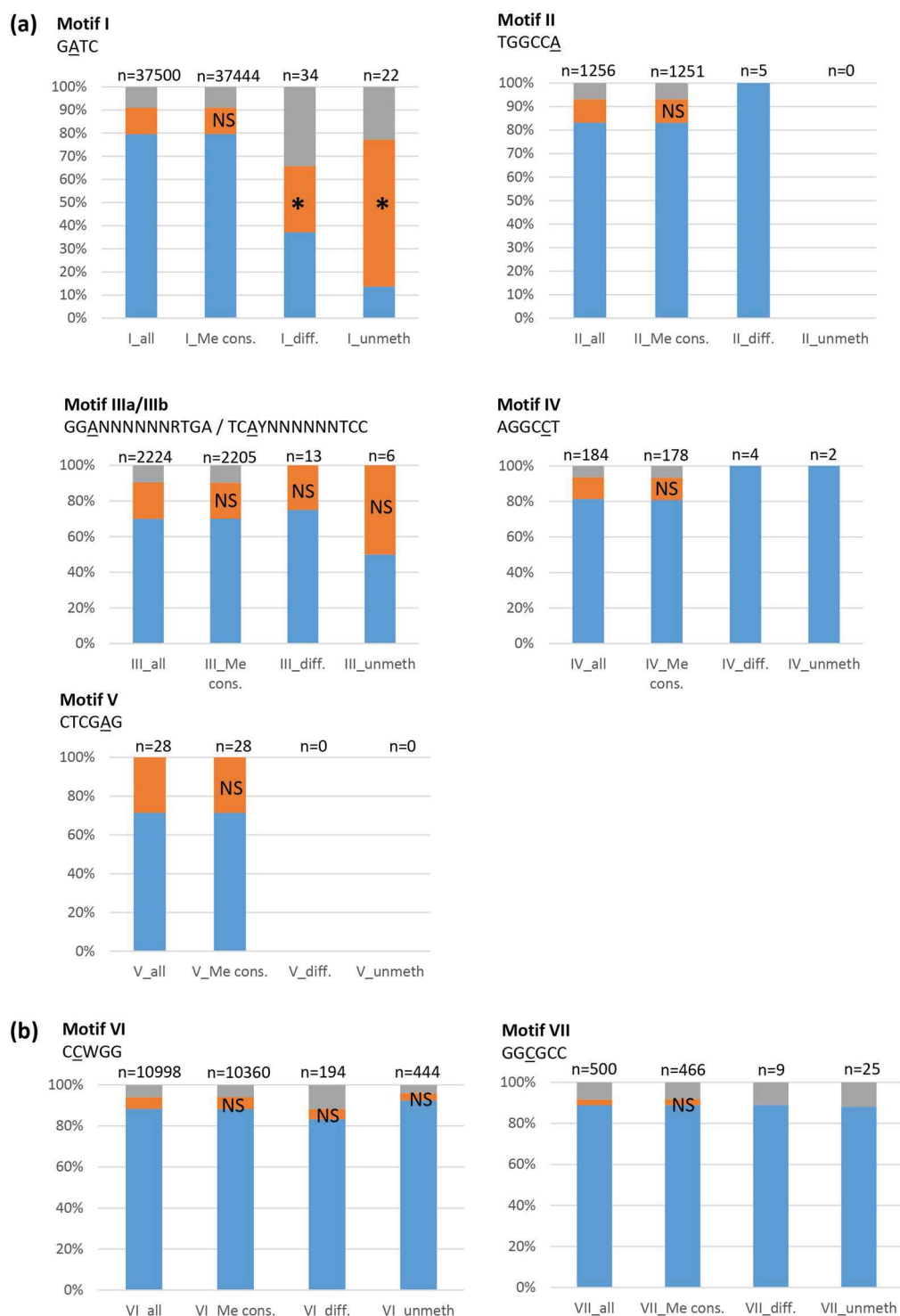


Figure 3. Location of identified motifs in putative gene-regulatory regions. Proportion of motifs identified by SMRT sequencing (a) or by WGBS (b) located in gene body (blue), in putative promoter regions (i.e. <200 bp upstream from a start codon) (orange), or in intergenic regions (grey). (all), all motifs found in the genome; (cons.), methylated motifs conserved in all of the 4 growth conditions tested (SMRT) or in the 2 growth conditions tested (WGBS); (diff.), methylated motifs in one, two or three of the 4 tested growth conditions (SMRT) or in one growth condition (WGBS); (unmeth.), unmethylated motifs conserved in all of the 4 (SMRT) or 2 (WGBS) growth conditions tested. Asterisks indicate that the proportion of motifs located in the upstream region vs gene body is significantly different from the proportion observed in the «all» condition ($p < 0.001$, Fisher's exact test). NS, not significant ($p > 0.05$).

Strand	Genome position	Location relative to ORF	EP	LE	SP	LS	AMP-R	Control	Dam+
+	10531	upstream plu0008	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	10532	upstream plu0008	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	667906	upstream plu0587	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	667907	upstream plu0587	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	1266509	upstream plu1095	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	1266510	upstream plu1095	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	2068092	upstream plu1732	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	2068093	upstream plu1732	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	2068124	upstream plu1732	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
-	2068125	upstream plu1732	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
+	2848496	plu2425 (genebody)	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
-	2848497	plu2425 (genebody)	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
+	3504597	upstream plu3002	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	3504598	upstream plu3002	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	3713794	upstream plu3152	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	3713795	upstream plu3152	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	3720503	upstream plu3159	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	3720504	upstream plu3159	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	4279850	upstream plu3630	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	5288818	upstream plu4529-4528	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
+	5559591	upstream plu4748	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me
-	5559592	upstream plu4748	NON	NON	NON	NON	NON	NON	Me

Figure 4. *P. luminescens* unmethylated GATC motifs. List of the 22 adenines located in GATC sites which were always unmethylated during the 4 growth conditions tested (light grey). The methylation state of these loci is also indicated for the *P. luminescens* AMP-R (i.e. polymyxinB-resistant) subpopulation (white) and for the *P. luminescens* strains harboring a plasmid (dark grey). Twenty unmethylated adenines were located upstream from an ORF, and two in a gene body. Red (NON), no modification mark was detected on the adenine of the GATC motif; Green (Me), a modification mark was detected. Note that Dam overexpression (Dam+) restores the DNA methylation of most (18/22) of the adenines located in GATC.

sequenced in 2003⁴⁵, our study has only now revealed its complete epigenome (m6A, m4C and m5C) and found no major difference between the various growth conditions tested. Up to now, observation of a relatively stable methylome had only been described for *E. coli*^{49,50}.

m4C methylation is restricted to archaea and prokaryotes, but in many bacterial species such as *E. coli*, no m4C-MTase was identified^{32,36,51,52}. In contrast, *P. luminescens* displays a clear motif with m4C modification marks (motif IV), with 184 occurrences in the genome at a high rate of methylation (>96% of the motifs are detected as methylated). Based on our results, this motif is presumably methylated by an MTase for which orthologs are mostly found in the *Photobacterium* genus (plu1935).

Several bacterial variants displaying genetic differences with their ancestor have been analyzed for their DNA methylation pattern (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Helicobacter*, *Campylobacter*)^{53–56}. In *P. luminescens*, we previously described the existence of an AMP-resistant (AMP-R) subpopulation which displays no difference in genome sequence compared to the control population (for which more than 99% of the cells are AMP-sensitive)⁴⁴. The bacterial DNA methylation pattern in a bacterial population grown in presence of antibacterial agents has only been described in *E. coli*⁴⁹. Here, we analyzed the methylome of the *P. luminescens* AMP-R subpopulation and found that it was highly similar to that of the control population. We thus provide evidence that the AMP used here (i.e. polymyxin B) does not drastically modify the DNA methylation pattern in *P. luminescens*. The precise mechanism allowing the AMP-R subpopulation to arise remains unknown, but it requires activation of the expression of the *pbgPE* locus in a PhoPQ-dependent manner^{44,57}. In accordance with the high similarity observed between the methylomes of the AMP-R subpopulation and the wild-type control population, no particular modification mark (focused here on m6A and m4C modification marks) mapping to the loci responsible for the AMP resistance could be identified in the AMP-R subpopulation. In addition, Bisulfite sequencing of the promoter region of *pbgPE* genes revealed no m5C difference between both subpopulations (Mouammine & Brillard, unpublished data), suggesting that DNA methylation is not a mechanism triggering the occurrence of the AMP-R subpopulation.

The most prevalent methylation motifs throughout the *P. luminescens* genome are GATC (motif I) methylated by Dam, followed by CCwGG (motif VI), methylated by Dcm. Out of the 12 MTases found in *P. luminescens* TT01, these two MTases are the only ones for which orthologs are found in numerous bacterial genera other than *Photobacterium* or the closely-related genus *Xenorhabdus*. As both MTases are widely distributed in *Enterobacteria*, they have been extensively studied²⁴. The *P. luminescens* methylome analysis also confirmed the presence of a m5C modification mark in motif VII (GGCGCC), a motif previously described as recognized by an RM system (PluTI)⁴⁷. Five additional motifs were also identified in this study, including two not found in REBASE (motifs IIIa and IIIb)⁹.

Here we also show that the Dam methyltransferase is very efficient in *P. luminescens*, causing the DNA methylation of more than 99% of the GATC sites in the genome, similarly as what was described in *E. coli* or *Salmonella*⁵. Despite this high level of methylation, we identified several loci that were always unmethylated in the tested conditions, suggesting the existence of factors, such as DNA-binding proteins, that hinder these particular GATC sites, as described elsewhere⁵⁸. Strikingly, a significant enrichment of putative promoter regions was observed for these unmethylated motifs but not for the other 6 motifs identified. Dam has been described to act as a regulator of gene expression in *E. coli* and *Salmonella* strains, and is therefore considered as involved in epigenetic mechanisms, but such a role in other bacteria remains to be investigated⁵. Our results suggest that in *P.*

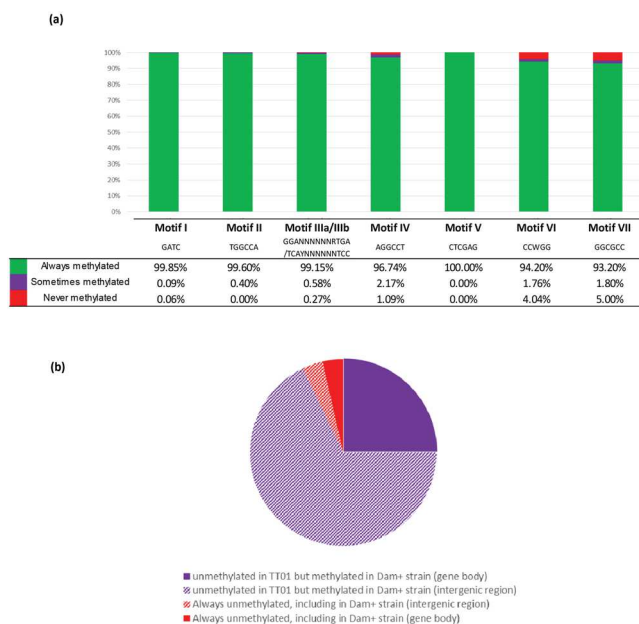


Figure 5. Methylation status of the 8 identified motifs in *P. luminescens* TT01. (a) For each of the 8 identified motifs, the percentage found methylated in all growth conditions tested (green), in some of the growth conditions tested (purple), or the percentage of motifs found always unmethylated (red) is indicated. (b) Location of the 56 GATC motifs which were found unmethylated in at least one of the growth conditions tested in the WT strain (gene body, full color area; intergenic region, hatched area). The methylation status in the *dam*-overexpressing strain is indicated (purple, methylated; red, unmethylated).

luminescens, Dam may be responsible for a similar mechanism. Furthermore, we provide evidence that Dam overexpression can allow the methylation of these usually-unmethylated sites, suggesting a competition between as-yet-unidentified DNA-binding proteins and the Dam MTase.

MTase overexpression is reported to be related to strong phenotype modifications in several bacterial species, but their methylome has never been investigated^{13,15,17,18,59}. In *E. coli*, SMRT sequencing of strains overexpressing 3 MTases, for which no particular phenotype was described, revealed signatures in the kinetic variations of the DNA polymerase that were not detected in the parental strain (i.e. methylation of adenines which were not located in a particular motif), suggesting nonspecific activity of these overexpressed MTases³⁶. In *P. luminescens*, the Dam overexpression was not associated with particular signatures in the kinetic variations of the DNA polymerase compared to the control strain. In contrast, it was associated with an increase in GATC methylation frequency. Further research is required to find out whether this change in the DNA-methylation pattern may be related to the modification of several phenotypes observed in the Dam-overexpressing strain, including impaired motility, impaired virulence in insects, and increased biofilm-forming ability¹⁸.

Conclusion

This study brings the first description of the methylome of an entomopathogenic bacterium, with the identification of eight motifs displaying a high rate of methylation (Fig. 5). The methylome was stable over growth curve, as well as in an antimicrobial peptide-resistant subpopulation responsible for virulence in insects. The rare unmethylated GATC motifs were located preferentially in putative promoter regions, suggesting that DNA methylation is involved in gene regulation. Overexpression of the Dam MTase can lead to a slight modification of the DNA-methylation pattern, including the methylation of 18/22 sites which are usually protected from methylation by a presumed DNA-binding protein. Given the major modification of phenotypes associated with MTase-overexpression in several bacterial species, the strategy employed here can prove a powerful tool to open a new field of investigation to determine the role of loci protected from DNA methylation in gene regulation.

Methods

Strains and growth conditions. The *P. luminescens* TT01 bacterial strains were routinely grown in Luria broth (LB) medium with a 180 rpm agitation at 28 °C. As required, antibiotic concentrations used for bacterial selection were gentamycin at 15 µg mL⁻¹; polymyxin B (polyB), 100 µg mL⁻¹. The AMP-R subpopulation was isolated as previously described⁴⁴. Briefly, addition of polymyxin B to WT cells grown in LB at an OD₅₄₀ of 0.3–0.4 (EP) led to a decrease in OD due to the death of the AMP-sensitive population (about 0.5% of the WT population was found to be AMP-R). The AMP-R cells were then collected when the OD₅₄₀ had returned to 0.3 in the presence of polymyxin B. Genomic DNA was extracted on these cells for methylome analysis.

Genomic analysis of MTases encoding genes. The REBASE database⁹ was used to identify the putative DNA MTases in the *P. luminescens* TT01 genome⁴⁵. The MaGe tool (available at <https://www.genoscope.cns.fr/>)

[agc/microscope/mage/](#)) was used to analyse the genomic context of their encoding genes. The genomic locations were defined in the core or accessory genome (Regions of genomic plasticity (RGP), Genomic Island (GI) and Prophage regions (P)) as previously described (Ogier *et al.*⁴⁶). The *MaGe* tool was also used to analyse gene distribution and their synteny among a panel of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* genomes (27 and 16 strains, respectively, for which a complete genome was available). Distribution of the MTases in other Enterobacterial organisms was performed using a BlastP search on the NCBI non-redundant protein database with default parameters and a maximal target sequences set at 1000.

Single-molecule real-time (SMRT) DNA sequencing. Genomic DNA was extracted from bacteria grown in LB and harvested at an OD₅₄₀ of 0.3–0.4 (EP), OD = 0.9 (LE), OD = 1.5 (SP), and after 24 h of growth (OD > 3, LS) as follows. Bacterial cells corresponding to 2 ml of culture were washed in PBS and pellets were stored at –80 °C. To perform lysis, cells were resuspended in 200 µl of TSE-lysozyme for 15 minutes at 37 °C, followed by addition of 640 µl EDTA pH8 0.5 M and 160 µl SDS 10% and incubated 15 minutes at 60 °C. Lysates were incubated for 1 hour at 56 °C after addition of 20 µl proteinase K (20 mg·ml⁻¹), cooled on ice and incubated 5 minutes at room temperature with 30 µl of RNase A (20 mg·ml⁻¹). Precipitation of contaminants was performed by addition of chilled 350 µl potassium acetate 5 M and a centrifugation step (10,000 × g for 10 min at 4 °C). The genomic DNA was purified with magnetic beads (Sera-Mag Speed beads, Thermo-Scientific) as previously described⁶⁰. The DNA libraries were prepared according to PacBio guidelines: 20-kb Template Preparation Using BluePippin Size-Selection System (15-kb size cutoff); shearing at 40 kb was performed using Megaruptor system (Diagenode); sizing at 17 kb was performed using BluePippin system (Sage). Libraries were sequenced on one or two PacBio SMRT cells at 0.25 nM with the Protocol OneCellPerWell (OCPW), P6C4 chemistry and 360 minutes movies on a Pacific Biosciences RSII instrument (GeT-PlaGe, Toulouse, France). The raw data were processed with the PacBio SMRT Analysis Suite (version v2.3.0 p4). For samples EP, SP and AMP-R, the reads were assembled *de novo*, with the high-quality Hierarchical Genome Assembly Process HGAP.3 algorithm and no rearrangement was observed with progressiveMauve 2.1.0.a1⁶¹. Conserved Synteny LinePlot revealed 100% conservation of synteny groups between the TT01 genomes studied, with a synton size ≥ 3 and the *P. luminescens* TT01 NC_005126 genome as the reference (data not shown).

DNA methylation detection and motifs identification after SMRT sequencing. DNA methylation was determined using the RS_Modification_and_Motif_Analysis protocol within SMRT Portal 2.3.0p4 which uses an *in silico* kinetic reference and a Welch's t-test based kinetic score detection of modified base positions⁶² with parameters set as follow: subread/polymerase read length ≥ 500, polymerase read quality ≥ 80 and modification QV ≥ 30. A score of 30 for the "Modification QV" is the default threshold for calling a position as modified, and corresponds to a p-value of 0.001. Homemade script was used to keep methylated bases for adenine or cytosine with score ≥ 30 and known motifs.

Whole Genome Bisulfite DNA sequencing (WGBS) and DNA methylation detection. Genomic DNA from bacteria grown in EP and SP was extracted as described above and was sequenced using Illumina MiSeq technology as previously described⁶³.

Fastq files were trimmed for adapters and low quality bases with Trim Galore! (v0.4.4)⁶⁴ then mapped to the public reference genome (NC005126) with Bismark (v0.17.0)⁶⁵. Picard tools were used to remove duplicated reads. Then methylation calling was performed with Bismark_methylation_extractor (v0.17.0) for every single cytosine⁶⁵. Positions at which a sequencing coverage reached 25X or more, and where the proportion of instances that was detected as modified (i.e. number of reads detecting a modification/total number of reads at a given position) reached at least 90% were considered as a methylated base. The surrounding sequences (±20 nt) of each methylated cytosine were extracted and analyzed for a motif search using MEME-ChIP (v4.12)⁶⁶. For the 2 motifs identified by WGBS, the mean proportion of reads that was detected as modified at a given position was high (97.3 for motif VI and 96.5 for motif VII). The fraction of motifs methylated was calculated as the number of motifs with a methylated based out of the total number of motifs found in the genome.

Determination of GATC-rich and GATC-poor regions. DistAMO analysis, which calculate a z-score (with value of 2/-2 considered as a significant value)⁶⁷ revealed heterogenic GATC motif distribution over the TT01 chromosome (Supp. Data Fig. S3). However, the large window sizes used for the calculation of the z-scores of the GATC motif distribution range from 500 kb (at the inner ring) to 50 kb (on the outer ring increasing in 50 kb steps, Fig. S3). In order to have a clearer view of the GATC motif distribution over the TT01 chromosome, we used overlapping windows of a size of 1 kb, sliding every 100 bp. The mean proportion of GATC occurrence found per kb of the whole genome was calculated, and regions of 1 kb displaying at least ±2 SEM were considered as GATC-enriched or GATC-depleted regions. Such regions were then compared to the position of regions of genomic plasticity previously described⁴⁶.

RT-qPCR analysis. Total RNA extraction was performed on cells harvested during exponential phase (EP and LE) and stationary phase (SP), from three independent cultures for each strain, using RNeasy miniprep Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. An additional incubation step with DNase I (Qiagen) was performed. The quantity and quality of RNA were assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip kit. Lack of DNA contamination was controlled by carrying out a PCR on each RNA preparation.

Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) were carried out as previously described¹⁸. Briefly, RNA samples from 3 biological replicates for each strain were used for cDNA synthesis. The SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) was used on 1 µg of total RNA with random hexamers (100 ng·µl⁻¹; Roche Diagnostics). qPCR analyses were performed using SYBR green Master kit (Roche Diagnostics) with 1 µl of cDNA and specific

gene primers at 1 μ M (Table S2). The reactions were performed in duplicate at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 5 s, 61 °C for 10 s, and 72 °C for 15 s and monitored in the LightCycler 480 system (Roche). Melting curves were analyzed and always contained a single peak. The data analyzed with the REST software 2009⁶⁸ using the pairwise fixed randomization test with 2,000 permutations are presented as a ratio with respect to the reference housekeeping gene *gyrB*, as previously described¹⁸.

Data Availability. The datasets generated and analysed during the current study are available at <https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/jbrowse/current/?data=data/private/COLLABORATIONS/photorhabdus-APayelleville-2018/data>. SMRT data have also been deposited in REBASE.

References

- Lu, S. C. S-Adenosylmethionine. *The international journal of biochemistry & cell biology* **32**, 391–395 (2000).
- Vanyushin, B. F. Adenine Methylation in Eukaryotic DNA. *Molecular Biology* **39**, 473–481, <https://doi.org/10.1007/s11008-005-0064-2> (2005).
- Vanyushin, B. F., Mazin, A. L., Vasilyev, V. K. & Belozersky, A. N. The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **299**, 397–403, [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(73\)90264-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(73)90264-5) (1973).
- Ehrlich, M. *et al.* DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-methylcytosine, 5-methylcytosine, and N6-methyladenine. *Nucleic Acids Res* **13**, 1399–1412 (1985).
- Casadesus, J. Bacterial DNA Methylation and Methylomes. *Advances in experimental medicine and biology* **945**, 35–61, https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_3 (2016).
- Clark, S. J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P. L. & Frommer, M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols* **1**, 2353–2364, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.324> (2006).
- Flusberg, B. A. *et al.* Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature methods* **7**, 461–465, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1459> (2010).
- Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G. & Murray, N. E. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **42**, 3–19, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990> (2014).
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. & Macelis, D. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **43**, D298–299, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046> (2015).
- Marinus, M. DNA Mismatch Repair. *EcoSal Plus*, <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.7.2.5> (2012).
- Braaten, B. A. *et al.* Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *andf* operons in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 4250–4254, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4250> (1992).
- Braaten, B. A., Nou, X., Kaltenbach, L. S. & Low, D. A. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**, 577–588 (1994).
- Chen, L. *et al.* Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiology* **149**, 2283–2290 (2003).
- Erova, T. E. *et al.* Mutations within the catalytic motif of DNA adenine methyltransferase (Dam) of *Aeromonas hydrophila* cause the virulence of the Dam-overproducing strain to revert to that of the wild-type phenotype. *Infection and Immunity* **74**, 5763–5772, <https://doi.org/10.1128/IAI.00994-06> (2006).
- Heithoff, D. M. *et al.* *Salmonella* DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity. *Infect Immun* **69**, 6725–6730, <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6725-6730.2001> (2001).
- Julio, S. M. *et al.* DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **69**, 7610–7615, <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7610-7615.2001> (2001).
- Julio, S. M., Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A. & Mahan, M. J. DNA adenine methylase overproduction in *Yersinia pseudotuberculosis* alters YopE expression and secretion and host immune responses to infection. *Infect Immun* **70**, 1006–1009 (2002).
- Payelleville, A. *et al.* DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression Impairs *Photorhabdus luminescens* Motility and Virulence. *Frontiers in microbiology* **8**, 1671, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01671> (2017).
- Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A. & Mahan, M. J. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**, 967–970 (1999).
- Mehling, J. S., Lavender, H. & Clegg, S. A Dam methylation mutant of *Klebsiella pneumoniae* is partially attenuated. *FEMS Microbiology Letters* **268**, 187–193, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00581.x> (2007).
- Robinson, V. L., Oyston, P. C. & Titball, R. W. A *dam* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiology Letters* **252**, 251–256, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.001> (2005).
- Watson, M. E. Jr., Jarisch, J. & Smith, A. L. Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (*dam*) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence. *Molecular Microbiology* **53**, 651–664, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04140> (2004).
- Wu, H. *et al.* Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology* **21**, 238–244, <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00284.x> (2006).
- Marinus, M. G. & Lobner-Olesen, A. DNA Methylation. *Eco Sal Plus* **6**, <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013> (2014).
- Militello, K. T., Mandarano, A. H., Varechtchouk, O. & Simon, R. D. Cytosine DNA methylation influences drug resistance in *Escherichia coli* through increased *sugE* expression. *FEMS Microbiology Letters* **350**, 100–106, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12299> (2014).
- Kahramanoglou, C. *et al.* Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription. *Nature communications* **3**, 886, <https://doi.org/10.1038/ncomms1878> (2012).
- Casadesus, J. & Low, D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 830–856, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-06> (2006).
- Collier, J., McAdams, H. H. & Shapiro, L. A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 17111–17116, <https://doi.org/10.1073/pnas.0708112104> (2007).
- Zweiger, G., Marczynski, G. & Shapiro, L. A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell. *J Mol Biol* **235**, 472–485, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1007> (1994).
- Stephens, C., Reisenauer, A., Wright, R. & Shapiro, L. A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1210–1214 (1996).
- Gonzalez, D., Kozdon, J. B., McAdams, H. H., Shapiro, L. & Collier, J. The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach. *Nucleic Acids Res* **42**, 3720–3735, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1352> (2014).
- Blow, M. J. *et al.* The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *Plos Genet* **12**, e1005854, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005854> (2016).
- Chen, P. *et al.* Comparative Genomics Reveals the Diversity of Restriction-Modification Systems and DNA Methylation Sites in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **83**, <https://doi.org/10.1128/AEM.02091-16> (2017).

34. Davis-Richardson, A. G. *et al.* Integrating DNA Methylation and Gene Expression Data in the Development of the Soybean-*Bradyrhizobium* N₂-Fixing Symbiosis. *Frontiers in microbiology* **7**, 518, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00518> (2016).
35. Erill, I. *et al.* Comparative Analysis of *Ralstonia solanacearum* Methylomes. *Frontiers in plant science* **8**, 504, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00504> (2017).
36. Fang, G. *et al.* Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nature biotechnology* **30**, 1232–1239, <https://doi.org/10.1038/nbt.2432> (2012).
37. Lee, W. C. *et al.* The complete methylome of *Helicobacter pylori* UM032. *BMC Genomics* **16**, 424, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1585-2> (2015).
38. Mou, K. T. *et al.* A comparative analysis of methylome profiles of *Campylobacter jejuni* sheep abortion isolate and gastroenteric strains using PacBio data. *Frontiers in microbiology* **5**, 782, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00782> (2014).
39. Zhu, L. *et al.* Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. *Nucleic Acids Res* **44**, 730–743, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1498> (2016).
40. Seong, H. J. *et al.* Methylome Analysis of Two *Xanthomonas* spp. Using Single-Molecule Real-Time Sequencing. *The plant pathology journal* **32**, 500–507, <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.10.2016.0216> (2016).
41. Zautner, A. E. *et al.* SMRT sequencing of the *Campylobacter coli* BfR-CA-9557 genome sequence reveals unique methylation motifs. *BMC Genomics* **16**, 1088, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2317-3> (2015).
42. Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D. & Givaudan, A. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr Opin Microbiol* **15**, 220–231, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006> (2012).
43. Somvanshi, V. S. *et al.* A single promoter inversion switches *Photorhabdus* between pathogenic and mutualistic states. *Science* **337**, 88–93, <https://doi.org/10.1126/science.1216641> (2012).
44. Mouammine, A. *et al.* An antimicrobial peptide-resistant minor subpopulation of *Photorhabdus luminescens* is responsible for virulence. *Scientific reports* **7**, 43670, <https://doi.org/10.1038/srep43670> (2017).
45. Duchaud, E. *et al.* The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature biotechnology* **21**, 1307–1313, <https://doi.org/10.1038/nbt886> (2003).
46. Ogiev, J. C. *et al.* Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics* **11**, 568, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-568> (2010).
47. Khan, F. *et al.* A putative mobile genetic element carrying a novel type IIF restriction-modification system (PluTI). *Nucleic Acids Res* **38**, 3019–3030, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1221> (2010).
48. Doberenz, S. *et al.* Identification of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 DNA Methyltransferase, Its Targets, and Physiological Roles. *mBio* **8**, <https://doi.org/10.1128/mBio.02312-16> (2017).
49. Cohen, N. R. *et al.* A role for the bacterial GATC methylome in antibiotic stress survival. *Nature genetics* **48**, 581–586, <https://doi.org/10.1038/ng.3530> (2016).
50. Westphal, L. L., Sauvey, P., Champion, M. M., Ehrenreich, I. M. & Finkel, S. E. Genomewide Dam Methylation in *Escherichia coli* during Long-Term Stationary Phase. *mSystems* **1**, <https://doi.org/10.1128/mSystems.00130-16> (2016).
51. Forde, B. M. *et al.* Lineage-Specific Methyltransferases Define the Methylome of the Globally Disseminated *Escherichia coli* ST131 Clone. *mBio* **6**, e01602–01615, <https://doi.org/10.1128/mBio.01602-15> (2015).
52. Powers, J. G. *et al.* Efficient and accurate whole genome assembly and methylome profiling of *E. coli*. *BMC Genomics* **14**, 675, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-675> (2013).
53. Anjum, A. *et al.* Phase variation of a Type IIG restriction-modification enzyme alters site-specific methylation patterns and gene expression in *Campylobacter jejuni* strain NCTC11168. *Nucleic Acids Research* **44**, 4581–4594, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw019> (2016).
54. Attack, J. M. *et al.* A biphasic epigenetic switch controls immunoevasion, virulence and niche adaptation in non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Nature communications* **6**, 7828, <https://doi.org/10.1038/ncomms8828> (2015).
55. Gorrell, R. & Kwok, T. In *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori* (eds Nicole Tegtmeyer & Steffen Backert) 105–127 (Springer International Publishing, 2017).
56. Seib, K. L., Jen, F. E., Scott, A. L., Tan, A. & Jennings, M. P. Phase variation of DNA methyltransferases and the regulation of virulence and immune evasion in the pathogenic *Neisseria*. *Pathogens and disease* **75**, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx080> (2017).
57. Derzelle, S. *et al.* The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects. *Journal of bacteriology* **186**, 1270–1279 (2004).
58. Ardisson, S. *et al.* Cell Cycle Constraints and Environmental Control of Local DNA Hypomethylation in α -Proteobacteria. *Plos Genetics* **12**, e1006499, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006499> (2016).
59. Erova, T. E. *et al.* DNA adenine methyltransferase influences the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* **74**, 410–424, <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.410-424.2006> (2006).
60. Mayjonade, B. *et al.* Extraction of high-molecular-weight genomic DNA for long-read sequencing of single molecules. *BioTechniques* **61**, 203–205, <https://doi.org/10.2144/000114460> (2016).
61. Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R. & Perna, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research* **14**, 1394–1403, <https://doi.org/10.1101/gr.2289704> (2004).
62. Murray, I. A. *et al.* The methylomes of six bacteria. *Nucleic Acids Research* **40**, 11450–11462, <https://doi.org/10.1093/nar/gks891> (2012).
63. Luch, J. *et al.* The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline. *Plos One* **10**, e0142334, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142334> (2015).
64. Clark, S. J. *et al.* Genome-wide base-resolution mapping of DNA methylation in single cells using single-cell bisulfite sequencing (scBS-seq). *Nature protocols* **12**, 534–547, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.187> (2017).
65. Krueger, F. & Andrews, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* **27**, 1571–1572, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167> (2011).
66. Machanick, P. & Bailey, T. L. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* **27**, 1696–1697, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr189> (2011).
67. Sobetzko, P. *et al.* DistAMo: A Web-Based Tool to Characterize DNA-Motif Distribution on Bacterial Chromosomes. *Frontiers in microbiology* **7**, 283, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00283> (2016).
68. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36 (2002).

Acknowledgements

The authors thank INRA Plant Health and Environment (SPE) division for financial support (SPE2015-65359 & SPE-IB17-DiscrMet), GAIA doctoral school #584 for supporting AP's PhD, and Alice Guidot for critical review of the manuscript.

Author Contributions

A.P., A.G. and J.B. designed the experiments; A.P. performed the experiments; L.L. and J.C.O. performed bioinformatics analysis; C.R., A.R., O.B. performed the SMRT and WGBS sequencing; A.P., L.L., J.C.O., A.M., A.G. and J.B. analyzed the data; A.P. and J.B. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript and have approved its final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30620-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines

Amaury Payelleville^{1,4}, Ludovic Legrand^{2,4}, Jean-Claude Ogier¹, Céline Roques³, Alain Roulet³, Olivier Bouchez³, Annabelle Mouammine^{1,5}, Alain Givaudan¹, and Julien Brillard¹

¹ DGIMI, INRA, Univ. Montpellier, Montpellier, France

² LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, Castanet-Tolosan, France.

³ GeT-PlaGe, INRA, US 1426, Genotoul, Castanet-Tolosan, France

⁴ contributed equally to this work

⁵ Present address: Department of Fundamental Microbiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Quartier UNIL/Sorge, Lausanne, CH1015, Switzerland.

Supplementary data

Supplemental Fig. S1. Genomic context and taxonomic distribution of the 12 methyltransferase (MTases) encoding genes in *P. luminescens* TT01 genome.

Supplemental Fig. S2. Relative expression of the 12 TT01 MTases encoding genes.

Supplemental Fig. S3. GATC distribution over the *P. luminescens* TT01 genome.

Supplemental Table S1: distribution of the high GATC-methylated density regions over the *P. luminescens* TT01 chromosome

Supplemental Table S2. Primers used in this study.

Fig. S1

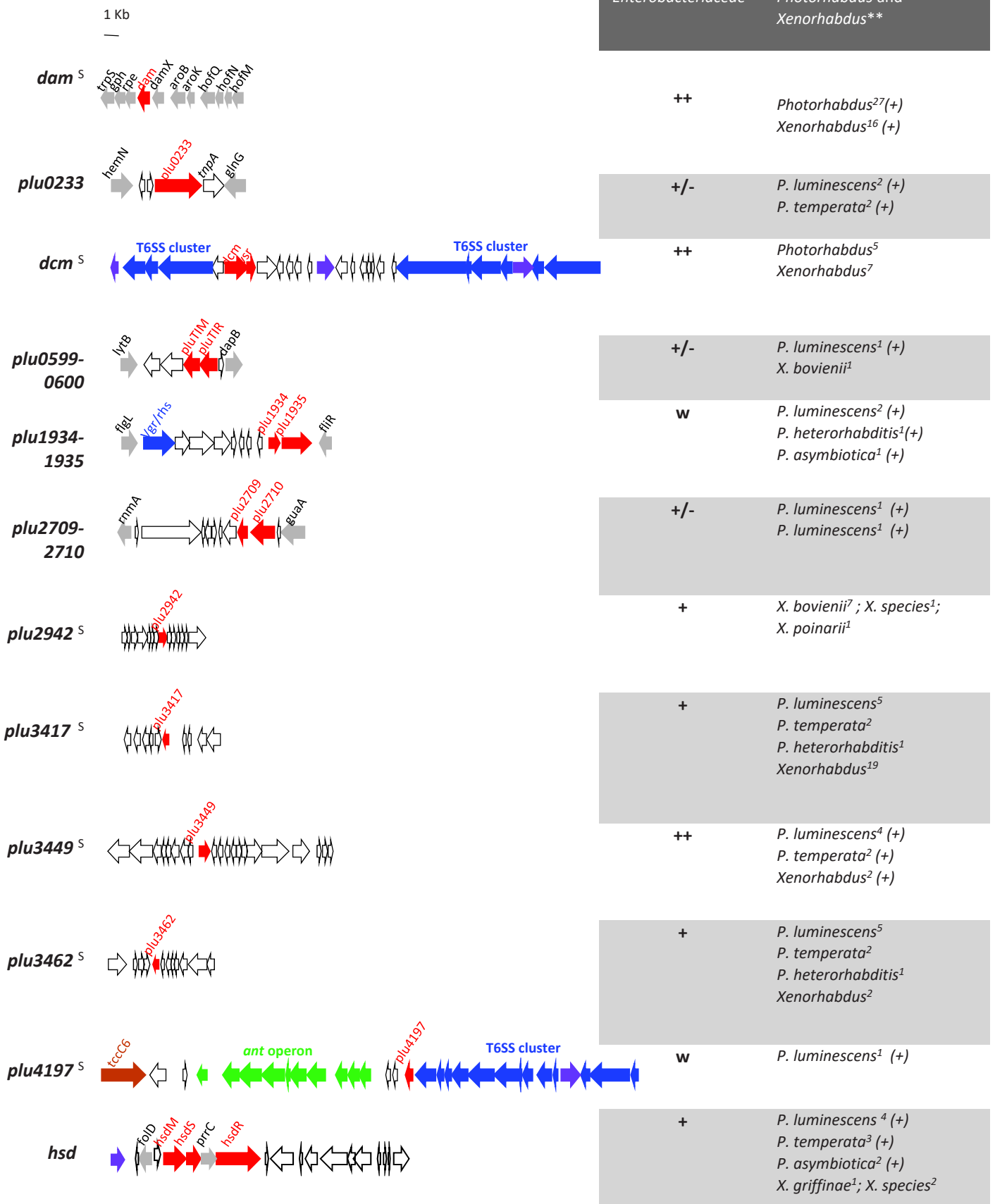
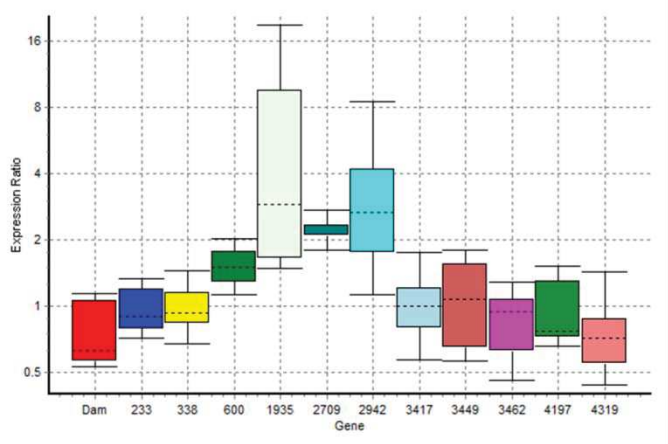


Fig. S1. Genomic context and taxonomic distribution of the 12 methyltransferase (MTases) encoding genes in *P. luminescens* TT01 genome. The gene names (labels) of the MTases are on the left of the figure. ^S solitary MTases. Arrows represent individual ORFs, and the names of the genes (or cluster of genes) are indicated above. Red arrows represent genes encoding MTases proteins or their cognate partners, white arrows represent genes encoding proteins of unknown function, purple arrows represent genes encoding transposases, brown arrow represent a gene encoding insecticidal toxin complex protein, blue arrows represent genes encoding component proteins of type 6 Secretion Systems, green arrows represent genes encoding proteins involved in anthraquinone biosynthesis (type II polyketide synthase) and grey arrows represent housekeeping genes. *Tax BlastP report: the number of Enterobacterial organisms displaying significant hits with the input query is classified as ++>100; 50>+>100; 10>+/->50; w<10. ** The number of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* genomes with orthologous genes is indicated; (+) indicates that orthologous genes are syntenic

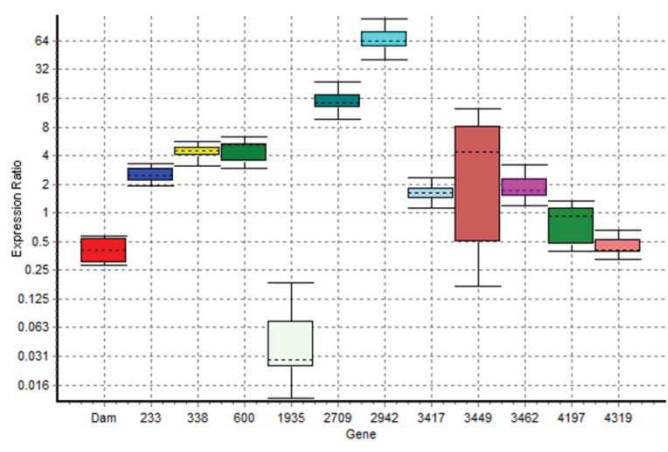
Fig. S2

(A) Differential gene expression between EP (OD 0.3) and LE (OD 0.9) relative to *gyrB*



Gene	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
dam	0.72	0.558 - 1.121	0.536 - 1.137	0.299	NS
plu0233	0.95	0.756 - 1.253	0.719 - 1.323	0.606	NS
dcm	0.97	0.777 - 1.259	0.693 - 1.413	0.813	NS
plu0600	1.51	1.272 - 1.956	1.158 - 2.032	0.088	NS
plu1935	3.66	1.588 - 10.037	1.498 - 17.172	0.063	NS
plu2709	2.25	2.034 - 2.608	1.838 - 2.731	0.092	NS
plu2942	2.95	1.732 - 5.897	1.250 - 8.085	0.081	NS
plu3417	1.00	0.733 - 1.372	0.596 - 1.692	0.846	NS
plu3449	1.03	0.582 - 1.575	0.561 - 1.753	0.732	NS
plu3462	0.85	0.596 - 1.175	0.485 - 1.269	0.648	NS
plu4197	0.92	0.706 - 1.421	0.666 - 1.508	0.738	NS
hsdM	0.74	0.518 - 0.985	0.453 - 1.356	0.207	NS

(B) Differential gene expression between EP (OD 0.3) and SP (OD 1.5) relative to *gyrB*



Gene	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
dam	0.41	0.301 - 0.571	0.289 - 0.580	<0.001	DOWN
plu0233	2.53	2.068 - 3.111	1.965 - 3.285	<0.001	UP
dcm	4.31	3.591 - 5.066	3.199 - 5.508	0.072	NS
plu0600	4.60	3.359 - 6.037	3.058 - 6.271	0.036	UP
plu1935	0.04	0.016 - 0.131	0.012 - 0.181	0.058	NS
plu2709	14.89	11.314 - 19.834	9.868 - 23.018	0.072	NS
plu2942	65.20	45.050 - 82.889	40.628 - 103.054	<0.001	UP
plu3417	1.63	1.343 - 1.994	1.166 - 2.272	<0.001	UP
plu3449	2.58	0.368 - 10.893	0.202 - 12.320	0.295	NS
plu3462	1.85	1.381 - 2.800	1.213 - 3.129	<0.001	UP
plu4197	0.80	0.449 - 1.265	0.410 - 1.343	0.658	NS
hsdM	0.44	0.349 - 0.547	0.330 - 0.645	<0.001	DOWN

Fig. S2. Relative expression of the 12 TT01 MTases encoding genes.

qRT-PCR was performed and analyzed as previously described (Mouammine et al., 2017).

The data for each sample are expressed relative to the level of the control gene (*gyrB*), using REST software 200968. This method quantified the expression of a target gene relative to that of a reference gene, for comparisons between growth conditions. Samples were up- or down-regulated when $P(H1) < 0.05$, and were considered not significantly different (NS) when $P(H1) > 0.05$.

Fig. S3

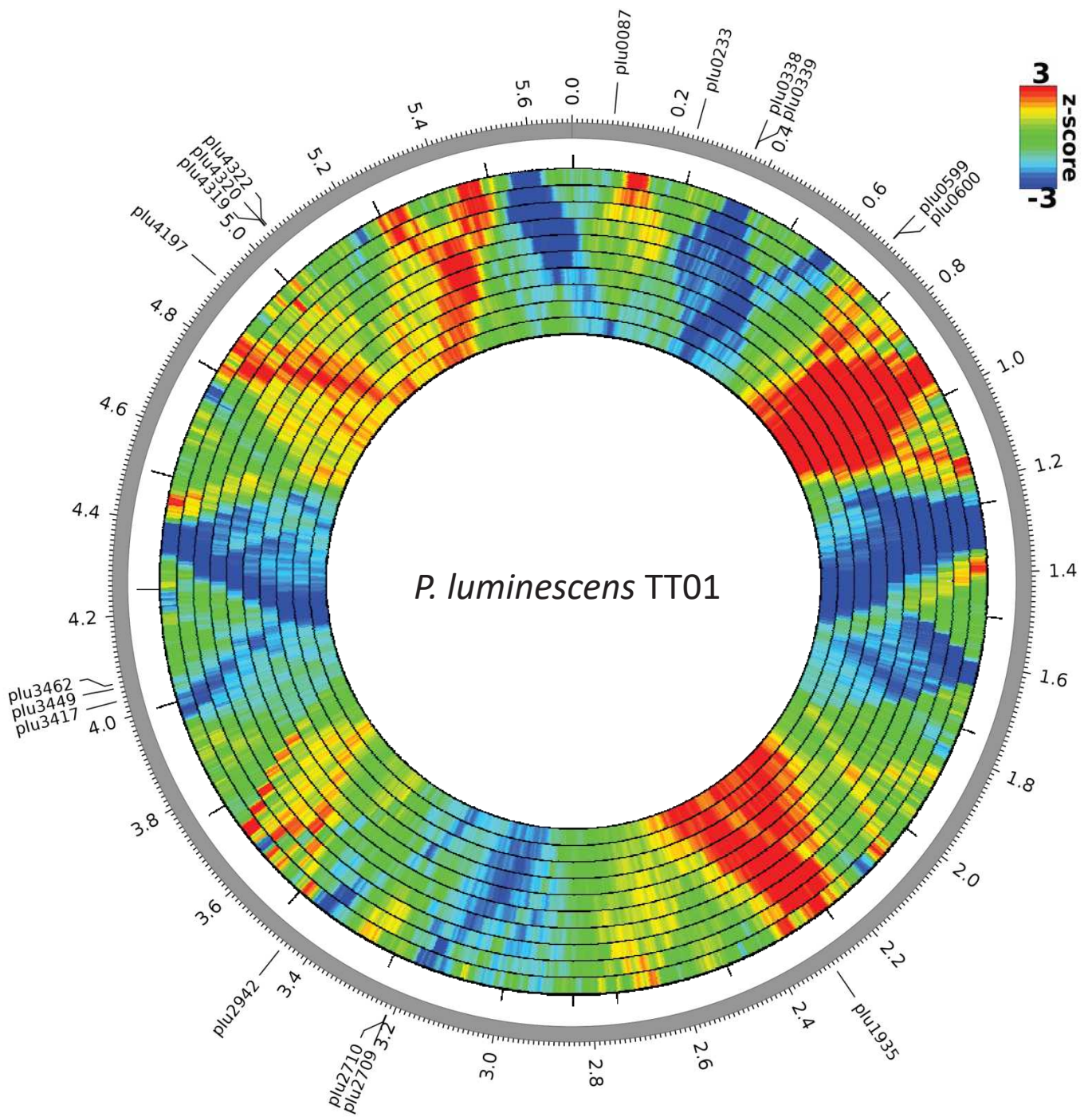


Fig. S3. GATC distribution over the *P. luminescens* TT01 genome. The GATC distribution was analyzed using DistAMO tool (Sobetzko et al., 2016). The motif distribution is color-coded as indicated by the legend on the right. A z-score of 2/-2 is commonly accepted as a significant value. The different rings show the distribution using various window sizes for the calculation of the z-scores ranging from 500 kb at the inner ring to 50kb on the outer ring increasing in 50kb steps.

Supplemental Table S1: distribution of the high GATC-methylated density regions over the *P. luminescens* TT01 chromosome

start	end	Localisation	Associated genes	Functional annotation of the associated genes	Functional role of the associated genomic region
42700	45000	Core genome	<i>gidA</i> <i>mioC</i>	Glucose inhibited division protein A Protein involved in modulation of initiation at oriC	Metabolism
149100	150100	Genomic Island	<i>plu0142</i>	putative NADP-dependent aldehyde dehydrogenase	Metabolism
183400	184400	Genomic Island	<i>yiaO</i> <i>yiaM</i>	Putative permease Putative sugar transporter	Metabolism (transport)
318100	319100	Core genome	<i>dppA</i>	Periplasmic dipeptide transport protein	Metabolism (transport)
319200	320200	Core genome	<i>dppB</i>	Periplasmic dipeptide transport protein	Metabolism (transport)
394200	395400	Genomic Island	<i>plu0367</i>	component of the TSS 6	Microbial Competition / Virulence against insects
505800	506800	Core genome	<i>malP</i> <i>malQ</i>	maltodextrin phosphorylase 4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase)	Metabolism Metabolism
578600	579700	Core genome	<i>deoD</i> <i>plu0523</i>	purine-nucleoside phosphorylase (inosine phosphorylase) (PNP) putative cystathionine gamma-lyase	DNA metabolism
636500	637700	Core genome	<i>thrA</i>	aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I	Metabolism
684500	685500	Core genome	<i>carA</i> , <i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase	Metabolism
692700	693800	Core genome	<i>pdxA</i> <i>surA</i>	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase Survival protein SurA precursor (chaperone)	stress resistance
787800	788900	Core genome	<i>dnaE</i>	DNA polymerase III alpha subunit	DNA metabolism
964100	965500	Genomic Island	<i>agaR</i> <i>kbaZ</i>	Putative <i>aga</i> operon transcriptional repressor D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit KbaZ	Antibiotic resistance Metabolism
972300	973800		<i>plu0840</i> <i>plu0841</i>	putative enterotoxin putative amidase	
1001600	1002600	Core genome	<i>pcnB</i> , <i>yadB</i>	Poly(A) polymerase I Glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase	Metabolism
1009900	1010900	Core genome	<i>mrcB</i>	penicillin-binding protein 1B	Antibiotic resistance
1091700	1092700	Genomic Island	<i>plu0949</i> <i>plu0950</i>	putative transcriptional regulator FAD/FMN-dependent dehydrogenase	Metabolism
1172100	1173100		<i>hpaE</i> <i>hpaG2</i>	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase 4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	
1702400	1703400	Core genome	<i>kdpD</i>	sensor protein (histidine kinase)	Metabolism
1956200	1957200	Core genome	<i>mukB</i> <i>mukE</i>	Chromosome partition protein MukB	Cell division
2034700	2035700	Phagic region	<i>plu1703</i> , <i>plu1704</i> , <i>plu1705</i>	Phagic genes	Phage components
2532200	2533200	Core genome	<i>azoR</i> <i>hrpA</i>	Azoreductase, NADH-dependent ATP-dependent helicase	Metabolism
3096500	3097500	Region of Genomic Plasticity	<i>plu2643</i> <i>plu2644</i>	putative MFS transporter putative peptide synthetase	antibiotic synthesis
3129200	3130300	Region of Genomic Plasticity	<i>plu2670</i>	putative peptide synthetase	antibiotic synthesis
3151500	3152500		<i>plu2670</i>	putative peptide synthetase	
3212900	3213900	Region of Genomic Plasticity	<i>plu2710</i> <i>plu2711</i>	DNA methyltransferase Putative recombinase	Recombination genes
3492300	3493300	Phagic region	<i>cbiH</i> <i>cbiJ</i>	precorrin-3 methyltransferase Synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide	metabolism (vitamin B12 biosynthesis cluster)
3626700	3627700	Genomic Island	<i>astB</i> <i>astE</i>	succinylarginine dihydrolase Succinylglutamate desuccinylase	metabolism
3671000	3672300	Genomic Island	<i>mcf2</i>	Mcf2 cytotoxin (insecticidal toxin)	virulence against insects
3684800	3685800	Genomic Island	<i>plu3130</i>	putative non-ribosomal peptide synthetase	antibiotic synthesis
3860600	3861800	Genomic Island	<i>plu3260</i>	putative Type VI secretion protein	Microbial Competition / virulence against insects
4436100	4437600	Genomic Island	<i>sctO</i> , <i>sctP</i> , <i>sctQ</i>	Type III secretion component proteins	virulence against insects
4516800	4518200	Core genome	<i>plu3845</i> <i>priC</i> <i>ybaM</i>	iron-sulfur binding protein primosomal replication factor N Protein of unknown function	metabolism
4746300	4747300	Core genome	<i>tldD</i>	Metalloprotease	metabolism
4750800	4751800	Core genome	<i>yhdP</i>	Protein of unknown function	unknown
4818600	4819600	Core genome	<i>efp</i> , <i>yjeK</i>	elongation factor P putative L-lysine 2,3-aminomutase	metabolism
4884600	4885600	Genomic Island	<i>plu4179</i>	putative the phenylacetyl-CoA ligase	metabolism (phenylacetic acid catabolic pathway)
4947200	4948300	Genomic Island	<i>plu4226</i> , <i>plu4227</i>	Putative Type VI secretion proteins	Microbial Competition / virulence against insects

Table S2. Primers used in this study.

Oligonucleotides	use	Sequence (5' - 3')
F-0004	qRT-PCR on <i>gyrB</i> gene	ATACACGAAGAAGAAGGTGTTTCAG
R-0004	qRT-PCR on <i>gyrB</i> gene	TACCTGTCTGTTTCAGTTTCTCCAAC
F-0087	qRT-PCR on <i>dam</i> gene	CTGATGAGTTTATAGTCCACACACG
R-0087	qRT-PCR on <i>dam</i> gene	ACCATGAGAATTATAACGACAGAGG
F-0600	qRT-PCR on <i>plu0600</i> gene	ACTCGTCTGATAGCAGAGATGAAAG
R-0600	qRT-PCR on <i>plu0600</i> gene	GAGTAATGGCATCTACAGCATAACC
F-0233	qRT-PCR on <i>plu0233</i> gene	CATGGTGATCAGATTCATACTCAAC
R-0233	qRT-PCR on <i>plu0233</i> gene	AGTAAAGCAAACCATCAGACATAGC
F-0338	qRT-PCR on <i>plu0338</i> gene	AACAGAAGTTGAAGTTGCTATGCTC
R-0338	qRT-PCR on <i>plu0338</i> gene	AATACCAGTTTGCTTTGTAGGTACG
F-1935	qRT-PCR on <i>plu1935</i> gene	AGCTTGAGCAAGTATTATAGGATG
R-1935	qRT-PCR on <i>plu1935</i> gene	ATCGGGAACCATTGTTGTATAGTAG
F-2710	qRT-PCR on <i>plu2710</i> gene	AGACCTTTAAGAGCACCAAAGCTG
R-2710	qRT-PCR on <i>plu2710</i> gene	GGTAACGACTACGATATTCTGCAAG
F-2942	qRT-PCR on <i>plu2942</i> gene	CTTCGATTTAACTAAACTCCCCATC
R-2942	qRT-PCR on <i>plu2942</i> gene	GTTTTTATCTATCCGATCACCAGTC
F-3417	qRT-PCR on <i>plu3417</i> gene	CAATTACCCAATGAAGTGGATTACC
R-3417	qRT-PCR on <i>plu3417</i> gene	CCATATTCCAGACTCAATTCCTCAT
F-3449	qRT-PCR on <i>plu3449</i> gene	GATCTTAATGGTGAGTTGGTGAATC
R-3449	qRT-PCR on <i>plu3449</i> gene	GCCTGCTTTTGGAGATAGTAGAAAC
F-3462	qRT-PCR on <i>plu3462</i> gene	AAAACGTTACCAGACAACCTGCATAG
R-3462	qRT-PCR on <i>plu3462</i> gene	TATATACAAACTGCCGTTGGGTTTC
F-4197	qRT-PCR on <i>plu4197</i> gene	CTAACGTAGCCCCTTTTATGACATC
R-4197	qRT-PCR on <i>plu4197</i> gene	GTTATAGAACTCTCGCACCCAGTTC
F-4319	qRT-PCR on <i>plu4319</i> gene	ATAGATCTGTTTGGTGATGCTTACG
R-4319	qRT-PCR on <i>plu4319</i> gene	TTTTGGCTTGTAATAGCAGAGAGC

4) Résultats complémentaires

Suite aux résultats du méthylome où nous avons trouvé des sites GATC devenant méthylés dans la souche Dam+ dans des régions promotrices de gènes, nous avons décidé d'axer la fin de ma thèse sur la recherche d'un mécanisme de régulation de gène impliquant une compétition entre Dam et un régulateur. Pour trouver des gènes candidats nous avons décidé de comparer les analyses du transcriptome et du méthylome de la souche Dam+, en comparaison de la souche contrôle, afin de détecter les gènes communs à ces deux analyses et si possible les relier aux phénotypes observés. Parmi les gènes ayant un différentiel de méthylation dans leur région promotrice et étant différemment transcrit entre ces deux souches, deux candidats ont attiré notre attention, les gènes *nhaA* et *ogrK*.

4.1 *nhaA* et la méthylation par Dam

Notre premier gène candidat détecté est le gène *plu0587* annoté comme codant pour la protéine NhaA. La fonction de l'orthologue de cette protéine a été décrite chez *E. coli*, c'est un transporteur Na⁺/H⁺ impliqué dans le contrôle de l'osmolarité cellulaire (Padan et al., 1989). Bien que d'autres transporteurs soient présents comme NhaB, leur rôle est moins essentiel que NhaA et ils joueraient un rôle dans les cas où NhaA ne fonctionne pas correctement (Pinner et al., 1992 ; Pinner et al., 1993). De manière générale, ce gène est conservé chez les entérobactéries avec des études le décrivant (comme ayant les mêmes fonctions que chez *E. coli*) chez *S. typhimurium* (Lentes et al., 2014) ; *Vibrio cholerae* (Herz et al., 2003) ou encore *Yersinia pestis* (Ganoth et al., 2011). Si ce gène ne semble pas directement impliqué dans la virulence de par sa fonction, il est pourtant décrit comme impactant ce phénotype chez *Y. pestis* (Minatoo et al., 2013) ou *E. coli* (Lescat et al., 2014). Du fait du changement de pH lors de l'entrée dans l'hôte eucaryote et de la réponse immunitaire il est possible qu'en modifiant l'expression de NhaA on impacte la survie de la bactérie *in vivo*. Chez *E. coli*, l'expression de *nhaA* est régulée par deux protéines nommées NhaR et H-NS (Dover et al., 1996). Dans cette interaction, NhaR peut jouer un rôle d'activateur ou de répresseur en fonction des conditions environnementales et H-NS un rôle répresseur (Dover et al., 1996). La présence ou l'absence de Na⁺ va être le facteur régulant la fonction de NhaR qui va être activatrice en présence de Na⁺ et inhibitrice de la transcription de *nhaA* en l'absence de Na⁺. Ce changement est dû à un changement de conformation amené par la liaison du Na⁺ (Carmel et al., 1997). Les changements de conformation sont une caractéristique commune à plusieurs protéines régulatrices de la famille LysR, comme OxyR (répondant au stress oxydatif), dont certaines régulent la réponse cellulaire à divers stress environnementaux (Schell, 1993). Chez *Photobacterium*, le gène *nhaA* est significativement sous-exprimé lors de la surexpression de Dam (Log2Fold change = -1.52, p-value adj=4x10⁻⁴) et un site

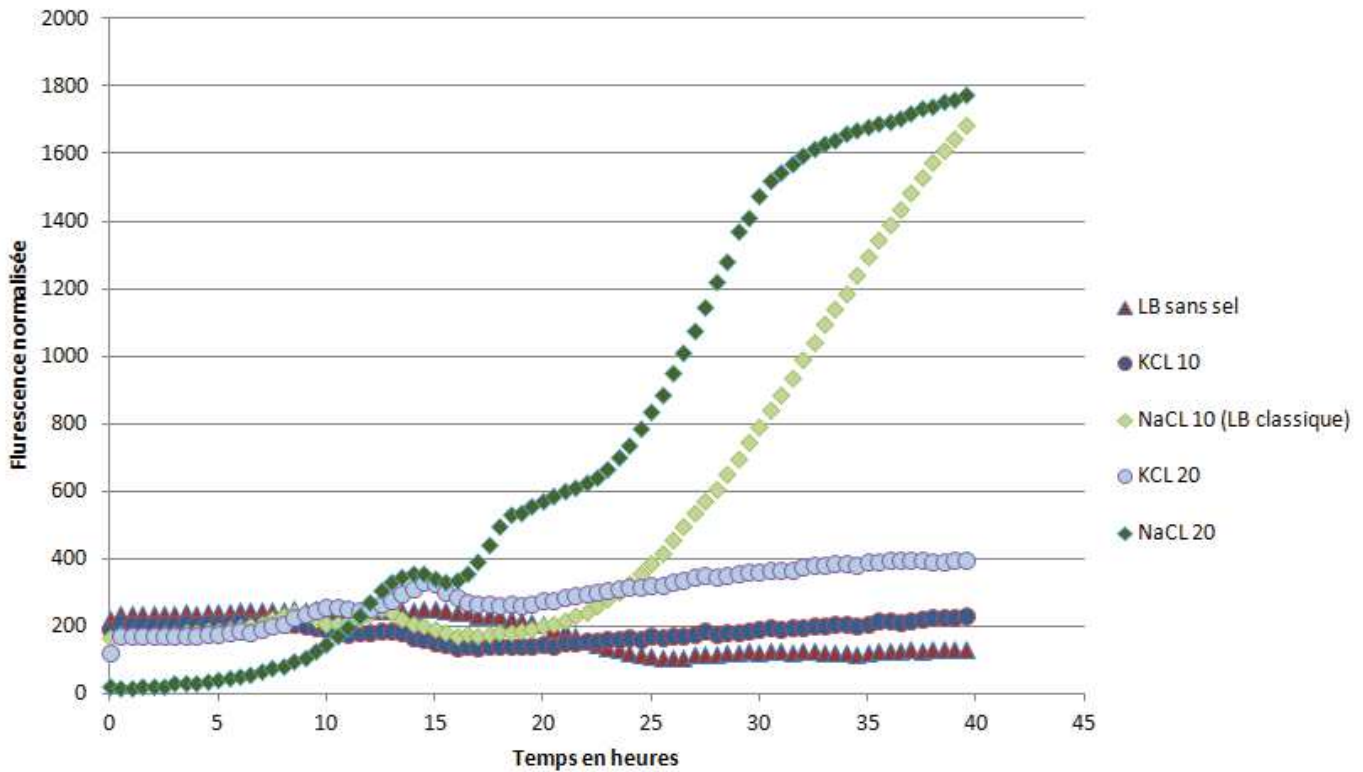


Figure 26 : Expression de la GFP sous contrôle de P_{nhaA} au cours du temps.

L'expression du P_{nhaA} au cours du temps est quantifiée dans un lecteur de microplaque grâce à la fluorescence de la GFP. Les croissances (DO) de chaque condition sont comparables et l'expression de la GFP est normalisée par rapport à ces dernières. Le contrôle LB sans sel est en triangles rouges, les deux concentrations en KCl (10g/L et 20g/L) sont respectivement représentées par des ronds bleu clair et bleu foncés et les deux concentrations en NaCl (10g/L et 20g/L) sont respectivement représentées par des losanges verts clairs et verts foncés.



Figure 27 : Détection du motif de liaison de NhaR dans la région promotrice de *nhaA*.

- A- Séquence consensus chez *E. coli* de la zone de liaison de NhaR dans la région promotrice de *nhaA*.
- B- Alignement de cette séquence consensus sur la région promotrice de *nhaA* chez *Photothabdus luminescens*. D'autres motifs ont aussi été détectés mais avec un score moins bon. Les séquences ont 53% d'identité et 93% de similarité.
- C- La séquence de P_{nhaA} (raccourcie à 121 paires de bases) et les trois sites GATC qu'elle contient (en rouge). Le site GATC retrouvé non méthylé chez le WT et méthylé chez la souche Dam+ est souligné. La zone de fixation potentielle de NhaR correspond à la séquence en vert ajoutée au motif GATC la précédant.

GATC situé dans sa région promotrice devient méthylé lors de cette surexpression. Nous avons donc commencé par regarder l'expression de ce gène afin de voir si son expression suivait le même profil que chez les autres entérobactéries. Nous avons donc cloné la région promotrice putative de *nhaA* (les 300 paires de base précédent l'ATG) en amont du gène rapporteur codant la GFP et transféré ce plasmide chez *Photobacterium luminescens*. L'expression de la GFP a ensuite été suivie dans des milieux contenant plusieurs concentrations en sels et en utilisant le KCl comme témoin d'osmolarité non lié au Na⁺. Chez *E. coli*, la présence de NaCl active l'expression de *nhaA* qui augmente proportionnellement à la concentration de ce sel, à l'inverse le KCl n'active pas la transcription de *nhaA* (Dover et al., 2001). Nous avons pu observer chez *P. luminescens* les mêmes profils d'expression avec une forte expression en présence de NaCl augmentant avec la concentration et à l'inverse aucun effet du KCl sur l'expression de *nhaA* (Fig. 26). Forts de ces résultats nous avons décidé d'étudier plus en détail la région promotrice de ce gène et son potentiel régulateur, NhaR. Nous avons trouvé le gène *nhaR* en amont du gène *nhaA*. Ce gène n'est pas différentiellement exprimé dans la souche Dam⁺. La séquence protéique de NhaR de *Photobacterium luminescens* présente 78.8% d'identité et 93.6% de similarité de séquence avec celle d'*E. coli* suggérant des protéines ayant la même fonction. Les acides aminés essentiels chez *E. coli* sont de plus conservés chez *Photobacterium luminescens*. En nous basant sur la séquence consensus de liaison de NhaR chez *E. coli* (Carmel et al., 1997) nous avons pu déterminer la potentielle zone de liaison chez *Photobacterium luminescens* (Fig. 27). La région promotrice de *nhaA* contient 3 sites GATC dont seul 1 devient méthylé dans la souche Dam⁺, les deux autres étant déjà méthylés chez la souche WT. Nous avons pu grâce à un alignement entre la région promotrice de *Photobacterium luminescens* et la séquence consensus de liaison chez *E. coli* voir que la zone la plus probable de liaison était située au niveau du site GATC différemment méthylé (Fig. 27). Aucune compétition n'a été décrite entre NhaR et Dam à ce jour. Elle ne semble pas probable chez *E. coli* qui n'a pas de site GATC dans la région promotrice de *nhaA*, cible de NhaR, mais un site GTTC. A l'inverse, c'est peut-être le cas chez *Photobacterium luminescens*. On constate donc la corrélation suivante : lorsque le site GATC de la région promotrice de *nhaA* est méthylé, l'expression de ce gène diminue en comparaison de chez la souche contrôle où il n'est pas méthylé. On peut donc formuler l'hypothèse que cette méthylation joue un rôle dans la régulation de l'expression de *nhaA* et ceci est sûrement lié à la liaison de NhaR à cette région promotrice. On peut de plus s'appuyer sur le fait qu'un régulateur de la famille LysR (dont fait partie NhaR) a déjà été décrit comme impacté par la méthylation de l'ADN par Dam chez certaines entérobactéries. Ce régulateur nommé OxyR est par exemple en compétition avec Dam pour la régulation du LPS de *S. enterica* (Broadbent et al., 2010 ; Cota et al., 2016). Notre hypothèse actuelle est que l'expression du gène *nhaA* est liée la méthylation de son promoteur par Dam et NhaR (Fig. 28). Si NhaR est lié à la région promotrice de *nhaA*, le gène n'est pas exprimé et le site GATC n'est pas méthylé. Lors de la surexpression de Dam nous avons déséquilibré le rapport entre NhaR et Dam

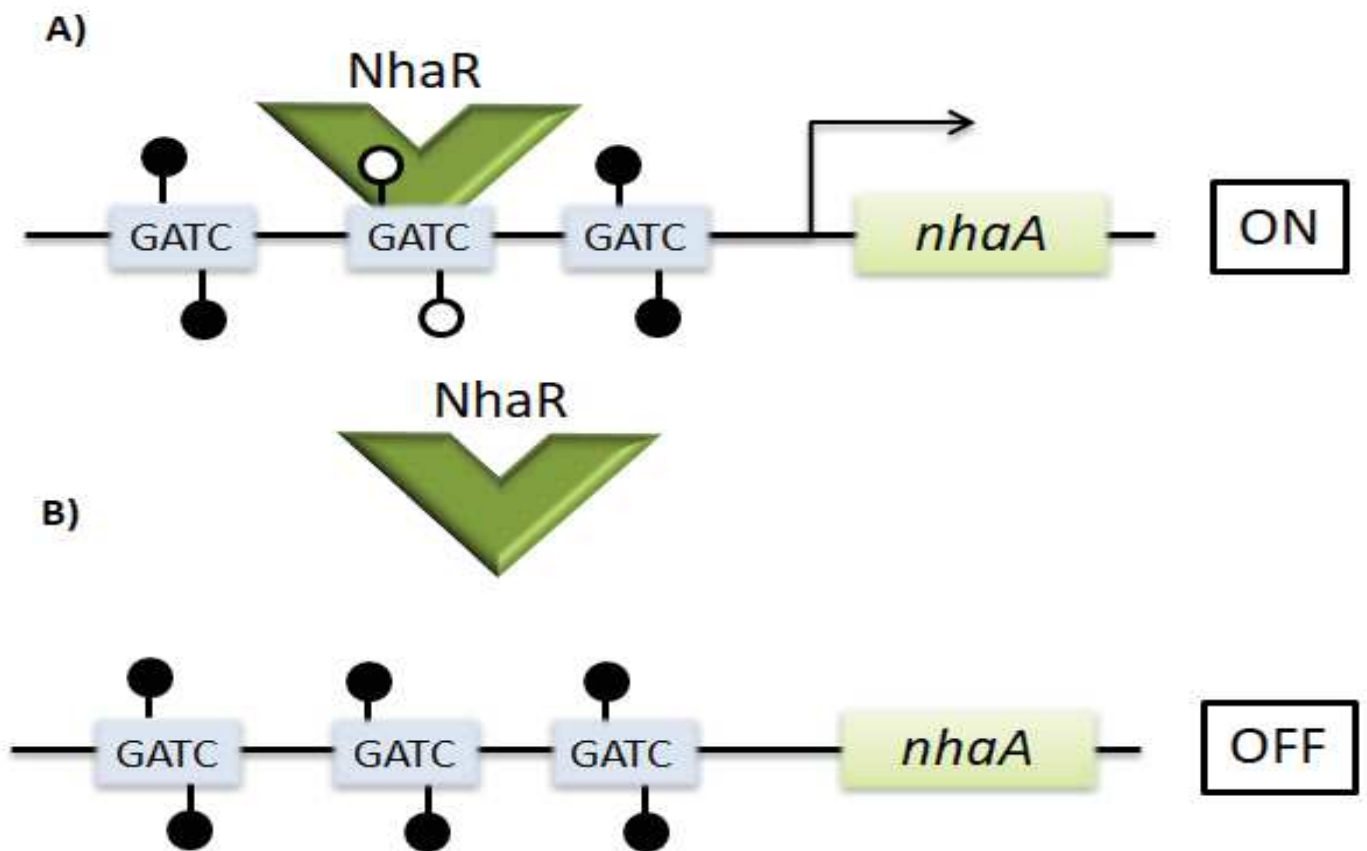


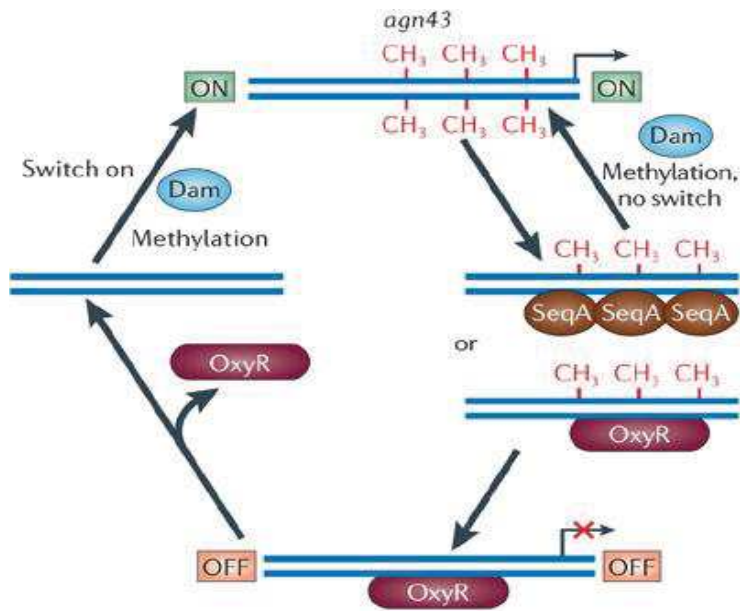
Figure 28 : Hypothèse de la régulation de *nhaA* chez *Photorhabdus*.

- A- Dans la configuration où le gène *nhaA* est exprimé (ON), le régulateur NhaR se lie dans la région promotrice au niveau du site GATC non méthylé (rond blanc).
- B- Lorsque le gène *nhaA* n'est pas ou peu exprimé (OFF), les trois sites GATC dans la région promotrice sont méthylés (ronds noirs, c'est le cas dans la souche Dam+) empêchant la liaison de NhaR sur la région promotrice et donc l'activation de l'expression de *nhaA*.

amenant une méthylation de l'ADN par Dam plus processive et ainsi le site GATC a été méthylé avant la fixation de NhaR, le gène *nhaA* s'est exprimé. Les ions Na⁺ pourraient faire partie de cette régulation hypothétique en diminuant l'affinité de NhaR pour la partie promotrice de *nhaA* ou en changeant sa configuration et le faisant devenir activateur comme chez *E. coli* (sans intervention de la MTase Dam).

4.2 *ogrK* et la méthylation par Dam

Notre second gène candidat est *ogrK* décrit chez *E. coli* comme régulateur de l'expression des gènes du bactériophage P2 (Christie et al., 1986 ; Birkeland et al., 1991). Ce bactériophage est un phage tempéré retrouvé chez plusieurs *γ*-protéobactéries et caractérisé chez *E. coli*. Une revue récente détaillée de ce phage a été réalisée par Gail Christie et Richard Calendar (Christie and Calendar, 2016). Plusieurs points nous ont intéressés, le premier est que le gène *ogrK* chez *Photorhabdus* est suivi de 26 gènes annotés *pts* pour Phage Tail Subunits. Ces sous unités sont des protéines essentielles à la formation de la queue du phage et ont été décrites chez *E. coli* comme régulées par Ogr (Birkeland et al., 1991). Le gène *ogrK* n'est pas différentiellement exprimé chez la souche de *Photorhabdus* Dam⁺, par contre on observe que 7 des gènes *pts* sont surexprimés chez cette souche. Nous avons décidé de regarder plus en détail la région promotrice de ce gène car étant un régulateur, une très faible variation (non détectée par RNAseq) pourrait être à l'origine de cette surexpression des gènes *pts*. En comparant le méthylome de notre souche contrôle (plasmide vide) et celui de la souche Dam⁺, nous avons observé que 2 sites GATC devenaient méthylés lors que la surexpression de Dam. L'expression d'*ogr* chez *E. coli* semble être régulée par l'immunité de l'hôte et le temps de croissance avec une activation en phase stationnaire mais aucune protéine n'a été clairement identifiée comme régulatrice de son expression (Birkeland et al., 1991). Afin d'avoir une idée du régulateur impliqué dans la régulation de ce gène chez *Photorhabdus* nous avons utilisé le site Virtual footprint qui prédit les motifs de liaison de régulateurs sur la base des séquences reconnues par ces régulateurs. D'après cette analyse, le régulateur ayant le plus de chance de reconnaître la région promotrice d'*ogrK* chez *Photorhabdus* est OxyR. Comme mentionné précédemment, cette protéine est décrite comme pouvant entrer en compétition avec Dam dans l'expression de certains gènes comme *opvAB* chez *S. enterica* (Cota et al., 2016) ou *agn43* chez *E. coli* (Henderson and Owen, 1999). La protéine OxyR de *Photorhabdus* a 83% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli*. Afin de tester notre hypothèse nous avons décidé de comparer la région promotrice d'*ogrK* à celle d'*agn43* chez *E. coli* reconnue par OxyR et impliquant une compétition entre Dam et cette protéine. Chez *E. coli*, la régulation d'*agn43* est liée à la méthylation de 3 sites GATC. Si ils sont méthylés, le gène est exprimé et OxyR ne se lie pas à la séquence, à l'inverse si OxyR se lie suite à une réplication du génome (devenant alors hémiméthylé et permettant la liaison d'OxyR), Dam ne peut



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figure 29 : Régulation de la transcription d'*agn43* chez *E. coli* (Wion and Casadesús, 2006).

Si les sites GATC de la région promotrice d'*agn43* sont méthylés, les protéines régulatrices OxyR et SeqA ne peuvent pas se lier et le gène est exprimé. Suite à un cycle de réplication du génome, l'ADN alors hémiméthylé va pouvoir être la cible des protéines régulatrices. Si OxyR se lie, Dam ne pourra pas méthyler l'ADN et le gène ne sera plus exprimé.

```
>PogrK_5'TGGCTCAGGGGCGTGCAGATCCTACCCTGAAATACCAATCAAAGTTACCGGCTTTAAACCAGAA
ATAGATGCTGCCGAATGGACATTAACGACAGTCACTCACACGGTGAATGGATCTGATGGTGG [TTTTACAA
CAGCACTGACTCTGGAATTAATAATTGATGATCTCGATATGAAATAAATGTTCTTCAAATGAGATCTCATT
GCTATATTGTTACATTATGAG] AGTTCATGTTTTAGTTAAGGGTAAGAAAAATATG
```

Figure 30 : Séquence de la région promotrice d'*ogrK* et comparaison au promoteur d'*agn43*.

Les crochets délimitent la partie promotrice partagée avec *agn43*. Les bases en gras dans cette zone sont identiques entre les deux promoteurs. Les sites GATC en jaune sont méthylés chez la souche contrôlée de *Photorhabdus* et les verts ne sont méthylés que chez la souche Dam+. Les bases soulignées correspondent aux emplacements des sites GATC impliqués dans la régulation d'*agn43* chez *E. coli*.

A



B

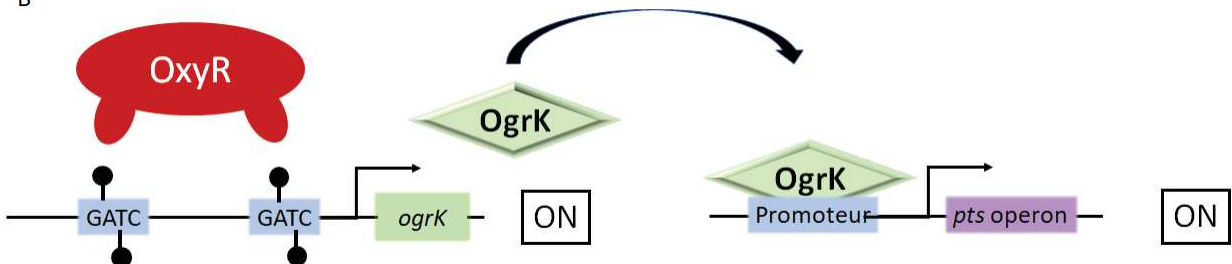


Figure 31 : Hypothèse de régulation d'*ogrK* par OxyR et Dam.

- A- Quand les deux sites GATC retrouvés dans la partie promotrice d'*ogrK* ne sont pas méthylés (ronds blancs), la protéine régulatrice OxyR peut se lier à cette région inhibant ainsi la transcription du gène *ogrK* et la production de cette protéine. OgrK étant l'activateur de la transcription de l'opéron *pts*, ces gènes ne sont alors pas ou peu transcrits. Il est possible que dans ce cas-là une protéine inhibitrice se fixe à leur région promotrice.
- B- Dans le cas où la MTase Dam méthyle les sites GATC (ronds noirs), la protéine OxyR a moins d'affinité pour cette région et n'inhibe donc plus la transcription du gène *ogrK*. La protéine est donc produite et l'opéron *pts* est transcrit.

plus méthyler l'ADN et le gène est réprimé par OxyR (Wion and Casadesús, 2006) (Fig. 29). La région promotrice d'*ogrK* contient 4 sites GATC dont 2 passent de « non méthylés » chez le contrôle à « méthylés » dans la souche Dam+. La région promotrice d'*agn43* est fortement similaire à la région promotrice d'*ogrK* avec 50% de bases identiques après alignement. Il est d'autant plus intéressant de noter que les deux sites GATC non méthylés chez *Photorhabdus* et méthylés chez la souche Dam+ sont présents et conservés dans la région promotrice d'*agn43* (Fig. 30). Notre hypothèse a donc été que la région promotrice d'*ogrK* était cible d'une compétition entre la MTase Dam et le régulateur OxyR. Chez la souche WT, la protéine OxyR se lierait à cette région promotrice et inhiberait la méthylation par Dam des deux sites GATC de la région promotrice. Cette liaison d'OxyR inhiberait la liaison de l'ARN polymérase et donc la production de la protéine OgrK. Cette protéine étant absente, l'opéron phagique *pts* n'est pas ou peu transcrit (Fig. 31A). A l'inverse, lorsque nous avons surexprimé la MTase Dam, l'équilibre s'est inversé, elle a donc eu plus de chances de se lier en premier aux sites GATC de la région promotrice d'*ogrK* et les a méthylé. Cette méthylation a empêché la liaison d'OxyR et le gène *ogrK* est transcrit. La protéine OgrK va ensuite aller se lier à la région promotrice de l'opéron *pts* et activer sa transcription aboutissant aux résultats obtenus en RNAseq (Fig. 31B). Pour vérifier cette théorie, nous avons d'abord voulu voir s'il était possible de purifier la protéine OxyR afin de pouvoir ensuite tester son interaction avec la région promotrice d'*ogrK*. Si OxyR se liait bien à cette région, nous aurions pu ensuite tester si cette liaison se réalisait toujours après méthylation par Dam afin de vérifier notre hypothèse de compétition. Malgré de très nombreux essais et malgré l'aide d'Ignacio Cota et Josep Casadesús (ayant purifié la protéine OxyR de *Salmonella*) nous n'avons pas réussi à purifier la protéine OxyR de *Photorhabdus*. Malgré tout, nous savons maintenant après plusieurs discussions avec le Dr Cota qu'OxyR est une protéine insoluble et que sa purification est un processus complexe.

4.3 Détection des sites GATC méthylés par une approche de digestion

Une approche commune de vérification de l'état de méthylation des promoteurs pour ces deux candidats a été testée au laboratoire. Le but de cette expérience était la mise au point d'un protocole fiable de vérification de l'état de méthylation de sites GATC spécifiques. Ainsi on aurait pu vérifier dans diverses conditions (comme en présence de NaCl pour *nhaA*) l'état de méthylation des sites GATC de certaines régions promotrices à étudier. L'approche consistait à cloner les régions promotrices de ces gènes et de transférer les plasmides chez *P. luminescens*. En faisant croître la bactérie dans les conditions voulues, on pouvait ensuite extraire le plasmide et vérifier l'état de méthylation des sites GATC de la région promotrice en utilisant des enzymes de restriction sensibles à la méthylation comme DpnI et MboI (Fig. 32). Malgré le travail de deux stagiaires, ces travaux n'ont abouti qu'à des résultats partiels. La mise au point de cette expérience a été réalisée chez deux

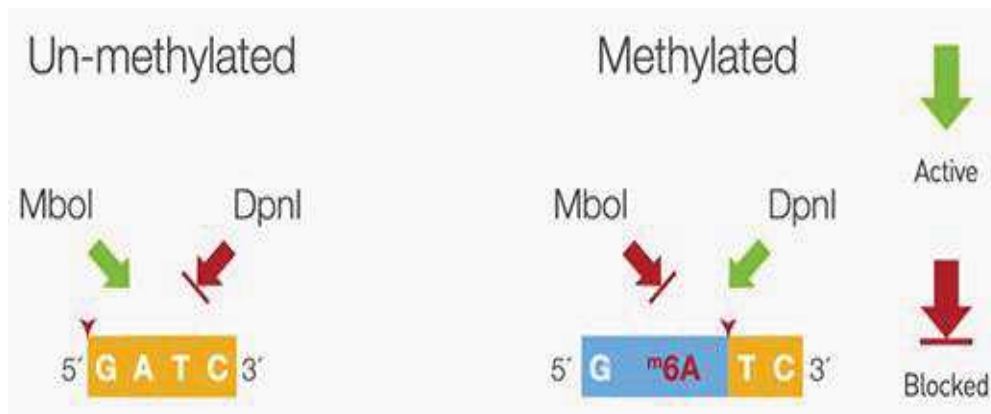


Figure 32 : Représentation du principe de digestion par les enzymes Mbol et DpnI sensibles à la méthylation (Thermofisher.com).

Les deux enzymes Mbol et DpnI reconnaissent les sites 5'-GATC-3'. L'enzyme Mbol ne va pouvoir digérer que les sites non méthylés et à l'inverse, l'enzyme DpnI ne peut digérer que les sites méthylés.

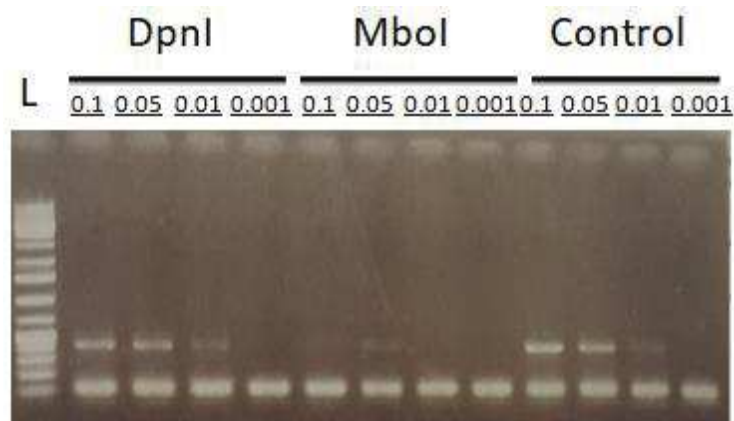


Figure 33 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR post-digestion par DpnI ou Mbol du promoteur P_{plu1752}.

Le marqueur de poids moléculaire est dans le puits de gauche. L'ADN plasmidique a été digéré par les enzymes DpnI ou Mbol avec pour contrôle une digestion par EcoRI. Les concentrations en plasmide lors de la digestion sont indiquées en ng/μL. On observe bien que chez la souche JM110 (Dam-) d'*E. coli*, le site GATC est non méthylé puisqu'il est digéré uniquement par Mbol.

souches d'*E. coli*, l'une exprimant la MTase Dam et l'autre ne l'exprimant pas, en utilisant divers promoteurs de gènes contenant de 1 à 4 sites GATC. L'ADN plasmidique a donc été extrait puis digéré par l'enzyme DpnI (digérant uniquement les sites GATC méthylés) ou MboI (digérant uniquement les sites GATC non méthylés). Il faut savoir que chez *Photorhabdus*, l'extraction de plasmide n'est pas de qualité suffisante pour pouvoir détecter un différentiel directement après digestion de l'ADN. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'amorces encadrant les sites GATC afin de réaliser des PCR après la digestion. Si l'ADN est digéré, la PCR ne fonctionne pas et à l'inverse si une amplification est détectée, c'est que l'ADN n'a pas été digéré. Les premiers essais ont été réalisés sur la région promotrice du gène *plu1752* codant potentiellement pour une porine. Si ce gène a été sélectionné c'est car sa région promotrice ne contenait qu'un seul site GATC sur 374 paires de bases facilitant la détection par PCR et qu'il fait partie des gènes ayant un différentiel de méthylation dans leur région promotrice. Le plasmide contenant ce gène a été extrait puis digéré par DpnI et MboI dans la souche Dam- d'*E. coli* (Fig. 33). Ces résultats préliminaires ont été plutôt encourageant avec une différence nette dans les profils d'amplification PCR post digestion et un site GATC clairement non méthylé dans la souche *E. coli* Dam-. Nous avons donc ensuite décidé de travailler avec la région promotrice d'*ogrK* pour vérifier l'état de méthylation des sites GATC. Malheureusement il nous est vite apparu que les résultats pour cette région promotrice étaient beaucoup moins nets et des profils d'amplification plus ou moins forts mais jamais nuls quelles que soient les enzymes utilisées. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Il est probable que les sites GATC chez la souche Dam+ ne soient pas méthylés à 100%. En effet, le plasmide utilisé étant en nombre de copies intermédiaires (~50/cellules), il est probable que certains ne soient pas méthylés d'autant plus si les régions testées sont cibles de protéines régulatrices. *E. coli* et *Photorhabdus* étant proches phylogénétiquement il y a des chances que des protéines régulatrices d'*E. coli* reconnaissent des régions promotrices de gènes de *Photorhabdus*. Si c'est le cas nous aurions donc une partie des sites digérés dans les deux cas et il est compliqué de discriminer quantitativement en PCR. Un deuxième point est lié aux enzymes de restriction. Nous avons vérifié expérimentalement que ces enzymes, même dans le cas où les sites GATC sont supposés être coupés, n'ont pas une efficacité de 100% et laisseront des sites non digérés et donc une amplification PCR possible. Pour remédier à ces deux problèmes, nous avons décidé de lancer des tests de digestion de l'ADN chromosomique (une seule copie/cellule) suivis de qPCR qui permettent de quantifier la proportion de sites digérés ou non. Ces résultats, bien que très préliminaires, semblent plus prometteurs et seront utilisés dans le futur.

Chapitre IV] Discussions et perspectives

1) *Dam* et le cycle de vie de *P. luminescens*

Photorhabdus luminescens TT01 est une bactérie modèle dans l'alternance entre les phases de pathogénicité et la symbiose durant son cycle de vie. Il est maintenant reconnu que si ces deux phénotypes apparaissent comme des opposés radicaux, ils partagent pourtant de nombreuses caractéristiques génétiques et moléculaires (Goebel and Gross, 2001 ; Pérez-Brocal et al., 2011). Cette caractéristique fait de *P. luminescens* un modèle intéressant pour comprendre les différences existant entre ces deux interactions avec ses hôtes eucaryotes. Une autre caractéristique de *Photorhabdus* est son hétérogénéité phénotypique. Une population isogénique va en fait contenir des bactéries n'exprimant pas les mêmes gènes. C'est par exemple le cas pour les gènes *pbgPE* permettant à une sous-population de résister aux peptides antimicrobiens de l'insecte (Mouammine et al., 2017). Un autre exemple est celui des variants phénotypiques (Cf Chapitre Introduction 4.1), dans ce cas les variants II ont des caractéristiques phénotypiques différentes du WT et ne peuvent notamment pas s'associer avec le nématode (Boemare and Akhurst., 1988, Akhurst, 1980). Il est intéressant de noter que dans le cas de *pbgPE*, un mutant est beaucoup moins virulent chez l'insecte mais aussi incapable d'établir une relation symbiotique avec son hôte nématode (Bennett and Clarke, 2005). Si plusieurs phénotypes globaux reliés à l'hétérogénéité phénotypique chez *Photorhabdus* ont été découverts, seul le pilus Mad a été décrit au niveau mécanistique. Ce pilus est uniquement exprimé lors de la phase symbiotique avec le nématode et son expression est régulée par une inversion de promoteur (Somvanshi et al., 2010 ; Somvanshi et al., 2012). Il reste donc beaucoup de mécanismes moléculaires sous-jacents à cette expression génique hétérogène à expliquer chez *Photorhabdus*.

Chez diverses bactéries, l'hétérogénéité phénotypique peut-être causée par un mécanisme épigénétique comme la méthylation de l'ADN (Casadesús and Low, 2013). Les deux MTases les plus décrites comme impliquées dans cette hétérogénéité phénotypique sont Dam chez les γ -protéobactéries et CcrM chez les α -protéobactéries (Casadesús, 2016). *Photorhabdus* faisant partie des γ -protéobactéries nous nous sommes intéressés à la MTase orpheline Dam. Elle a été notamment décrite pour jouer un rôle important dans les mécanismes de pathogénicité de diverses bactéries comme *E. coli* ou *S. enterica* (Blyn et al., 1990 ; Heithoff et al., 1999) mais à l'inverse peu d'études ont été menées sur son implication dans la symbiose. Nous avons donc décidé d'étudier le rôle de cette MTase dans les divers phénotypes de *P. luminescens* puis au cours de son cycle de vie.

La stratégie choisie était de déréguler Dam, et nous avons observé que la surexpression amenait une diminution de la mobilité et du pouvoir pathogène de la bactérie ainsi qu'une augmentation de

Phénotype bactérien	Effet de la surexpression de Dam	Résultats RNAseq	Résultats méthylome: Sites GATC ≠ méthylés entre Dam+ et contrôle	Hypothèse
Mobilité	--	Gènes de la cascade flagellaire sous-exprimés	Aucun détecté	Impact indirect de Dam ou gène régulateur supérieur à <i>flhDC</i> non décrit impacté
Formation de biofilms	+	Gènes des pili surexprimés	Certains gènes codant pour de potentiels pili	Gènes découverts à tester
Pathogénicité	-	Pas de gènes impliqués dans la pathogénicité transcrits différemment	Pas de gènes majeurs	<i>nhaA</i> semble une piste possible (Cf Chapitre IV; 4.1)
Taux de mutants spontanés et croissance	∅			
Autres (Lipases, NBTA etc...)	∅			

Tableau 7 : Effet de la surexpression de Dam sur les phénotypes de *P. luminescens* TT01 relié aux résultats de RNAseq et de SMRT.

sa capacité à former des biofilms. A l'inverse, le taux de mutants spontanés et la croissance de *P. luminescens* n'ont pas été impactés par cette surexpression. La majeure partie des phénotypes caractéristiques de *P. luminescens* (luminescence, adsorption du bleu de bromothymol, lipases...) ne semblent pas non plus impactés par cette surexpression (Tableau 7). Nous avons ensuite vérifié que lors de la disparition de cette surexpression de Dam (par perte du plasmide) les phénotypes redevenaient identiques, ce qui a été le cas pour la mobilité et la pathogénicité (non testé pour les biofilms). Ces résultats nous ont fortement encouragés à penser que Dam jouait un rôle dans la régulation de gènes liés à ces phénotypes. Nous avons donc ensuite réalisé un RNAseq afin de voir quels gènes voyaient leur expression varier dans la souche Dam+ et couplé ces résultats à l'étude du méthylome discutée ci-après.

La majeure partie des gènes de la cascade flagellaire sont sous-exprimés dans la souche Dam+, cela nous a menés à la conclusion que cette baisse de mobilité était liée à la répression de gènes régulateurs de l'ensemble de cette cascade comme *flhDC*. Nous avons donc ensuite regardé si des gènes liés à cette cascade flagellaire (et notamment *flhDC*) avait un site GATC différemment méthylé dans leur région promotrice. Aucun lien n'a pu être fait à ce niveau avec des sites GATC méthylés dans les deux souches ou pas de sites GATC du tout. La seule hypothèse que nous puissions formuler est donc celle d'un master régulateur non décrit qui jouerait un rôle dans la régulation de la cascade flagellaire et qui serait sujet à régulation par la méthylation de l'ADN (Tableau 7).

Plusieurs clusters de gènes codant pour différents pili sont surexprimés dans la souche Dam+ même si nous ne pouvons déterminer si seul l'un d'entre eux amène au phénotype d'augmentation des biofilms ou si c'est un résultat global. En effet, seul le gène *mad* est clairement décrit chez *P. luminescens*. Un point intéressant est la présence de sites GATC différemment méthylés entre les deux souches dans la partie promotrice de deux gènes codant pour de potentiels pili, *plu1732* et *plu3630*. Le gène *plu1732* n'est pas retrouvé différemment exprimé dans la souche Dam+, rendant l'explication du différentiel en formation de biofilm peu probable. A l'inverse, plusieurs gènes du cluster auquel appartient *plu3630* sont retrouvés surexprimés dans la souche Dam+. Il est donc possible que ce gène soit à l'origine du phénotype observé (Tableau 7).

Aucun gène décrit chez *P. luminescens* comme ayant un rôle dans la pathogénicité n'a été retrouvé différemment transcrit dans la souche Dam+. Tous les gènes reliés à la pathogénicité de *P. luminescens* ne sont pas connus à ce jour et il se peut que certains gènes différemment transcrits soient reliés à une baisse de pathogénicité dans de prochaines études. De plus, certains gènes pouvant avoir un rôle dans la pathogénicité sont retrouvés avec un différentiel de méthylation dans leur région promotrice. On peut notamment citer *nhaA* (relié de manière inconnue au pouvoir

Étape du cycle du complexe	Effet de la surexpression de Dam	Détails	Hypothèse
Infestation	∅	Le complexe est capable d'infester l'insecte	
Pathogénicité	--	Le complexe est moins pathogène que le contrôle	Dam cause une diminution de l'expression de facteurs de virulence
Multiplication du nématode	∅	Le nématode est capable de se nourrir de la bactérie	
Établissement de la symbiose	(-)	Moins de bactéries semblent associées au nématode	Dam diminue la capacité de la bactérie à s'associer au nématode
Emergence	∅	Autant de nématodes émergent du cadavre	

Tableau 8 : Effet de la surexpression de Dam sur les différentes étapes du cycle de *P. luminescens* TT01.

pathogène d'*E. coli* ou d'*Y. pestis*) qui est de plus retrouvé différemment transcrit chez la souche Dam+ (Tableau 7).

Afin de d'étudier l'impact de Dam dans la partie symbiotique du cycle de *P. luminescens*, nous avons réalisé une symbiose nématobactérienne entre la souche Chr_Dam et *Heterorhabditis* ainsi qu'une symbiose contrôle où la bactérie a le gène codant pour la GFP inséré sur le chromosome (Chr_GFP). La diminution de la pathogénicité est encore plus nette lors de l'infestation par le complexe nématobactérien surexprimant Dam que lors de l'injection de la bactérie seule. Nous avons aussi retrouvé moins de bactérie dans les nématodes émergents en symbiose avec la souche Chr_Dam qu'avec la souche Chr_GFP. Par contre, les deux souches sont capables d'infester l'insecte (*G. mellonella* et *S. littoralis*), capables de servir de nourriture et supporter la croissance des nématodes et autant d'IJs émergent du cadavre de l'insecte (Tableau 8).

Si les phénotypes observés lors de la phase symbiotique semblent peu affectés par la surexpression de Dam, cela peut-être dû au fait que la bactérie ne se développe quasiment pas dans le nématode. A l'inverse, *Photorhabdus* est en phase exponentielle au cours de l'infection chez l'insecte. Il n'existe pas chez les bactéries d'enzymes capables de déméthyliser l'ADN : si un promoteur est cible d'une compétition entre une MTase et un régulateur, il faudra donc deux cycles de réplication pour obtenir un promoteur non-méthylé et donc une variation dans l'expression du gène cible. Ce cas de figure est facilement envisageable en phase de croissance exponentielle où la bactérie se multiplie beaucoup mais il est logique qu'en l'absence de multiplication, l'état de méthylation reste inchangé et rende l'observation d'un phénotype plus complexe. La diminution du nombre de bactéries dans les nématodes ayant pour symbiotes les bactéries Dam+ nous a amené à formuler l'hypothèse que certains gènes jouant un rôle mineur dans l'établissement de la symbiose soient réprimés dans la souche surexprimant Dam. Ce phénotype peut expliquer le phénotype plus marqué de baisse de pathogénicité lors de l'utilisation du complexe nématobactérien. En effet, c'est la bactérie qui cause la mort de l'insecte par septicémie, il est donc logique que si le nématode en véhicule moins, on observe un effet sur la pathogénicité lié à la dose dépendance. Pour vérifier cela, il aurait été intéressant de réaliser des infestations, non plus en utilisant le même nombre de NEPs entre les deux souches mais en utilisant un même nombre de bactéries approximatif (estimation tirées du nombre de bactéries moyen de chaque souche retrouvée en symbiose dans les nématodes). Si l'écart de TL50 diminue dans ces conditions, on aurait pu conclure à une corrélation directe entre le nombre de bactéries par nématode et cette baisse du pouvoir pathogène. Il aurait aussi été intéressant de pouvoir réaliser des infestations récurrentes en utilisant les IJs émergent de chaque infestation avec la souche surexprimant Dam. Si en renouvelant cette expérience sur plusieurs générations les phénotypes observés devenaient de plus en plus marqués nous aurions pu conclure

que le nombre de bactéries par nématode diminuait au cours des générations et aboutissant *in fine* à une diminution drastique de la virulence, voire à des nématodes aposymbiotiques.

2) Méthylomes et transcriptomes de *P. luminescens*

Le principal axe de cette thèse a été l'étude de Dam pour des raisons bibliographiques mettant en évidence son rôle dans la régulation de l'expression de nombreux gènes et pouvant amener de l'hétérogénéité au sein d'une population. Les travaux réalisés durant cette thèse n'ont pas mis en évidence de lien entre Dam et l'hétérogénéité observée chez *Photorhabdus*. En effet le profil de méthylation des sites GATC entre la souche WT et la sous population résistante aux peptides antimicrobiens est identiques. Si quelques sites GATC ont des profils de méthylation différents, nous n'avons pas trouvé de lien avec l'expression de *pbgPE*. La surexpression de Dam n'a pas non plus eu d'impact sur les proportions de variants observés chez *P. luminescens* et ne semble donc pas avoir de rôle dans cette hétérogénéité non plus (Résultats non publiés). Malgré cela, l'hypothèse de la méthylation de l'ADN pour expliquer l'hétérogénéité sur d'autres phénotypes non testés chez *P. luminescens* ne peut pas être écartée. Par ailleurs, si les autres MTases de *Photorhabdus* ne semblent pas ou peu exprimées dans les conditions testées, il faut garder à l'esprit qu'elles ont sûrement une utilité pour la bactérie, car dans le cas inverse, elles auraient été supprimées du génome (à l'exception d'une acquisition récente). Un point intéressant est celui des MTases espèces-spécifiques voire souche-spécifique. On retrouve chez diverses bactéries (Blow et al., 2016) des MTases présentes chez une seule espèce bactérienne et la MTase orpheline codée par le gène *plu4197* en est un exemple chez *P. luminescens*.TT01. Aucun motif méthylé n'a pu être relié à cette MTase mais ceci peut fortement être corrélé à son expression très faible dans les conditions testées. Il est possible que son expression soit essentielle à un moment précis du cycle de *Photorhabdus* tout comme l'expression de CcrM chez *Caulobacter* est finement régulée durant le cycle cellulaire. L'avancée des technologies permettra sûrement un jour de faire des méthylomes bactérien dans n'importe quelles conditions (comme les phases d'infection ou de symbiose chez *Photorhabdus*) et il est très fortement probable que l'état de méthylation de certains promoteurs varie durant ces étapes du cycle de vie. Il est même possible que des profils de méthylation globaux à l'échelle du génome varient également afin de permettre à la bactérie de s'adapter aux différents environnements qu'elle rencontre.

Le dernier point de cette thèse est l'analyse couplée des résultats SMRT et RNAseq pour la souche Dam+ et son contrôle. De nombreuses études ont utilisé la surexpression ou des mutants *dam* pour voir les phénotypes impactés et essayé ensuite de décrire le mécanisme sous-jacent aux phénotypes observés, à notre connaissance, seule une étude chez *P. aeruginosa* a couplé les analyses

Dam+	Control	gene	name	Function	Nb of GATC sites	OxyR	Lrp
Methylated	Non Methylated	plu0008	ogrK	Phage regulator	4	Yes	
Methylated	Non Methylated						
Methylated	Non Methylated	plu0587	nhaA	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	3	NhaR	Yes
Methylated	Non Methylated	plu1095/1096	/	Transcriptional regulators	1/1		
Methylated	Non Methylated	plu1276	emrA	Multidrug resistant protein A	3	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu1732	/	Similar to type IV prepilin.	2	Yes	
Hemimethylated	Non Methylated						
Methylated	Hemimethylated	plu 1752	/	Probable porin OmpN	1	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu2816	isnA	Rhabduscin biosynthesis	1	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu3002	/	Putative HigA from plasmid Rts1	1	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu3013	/	Similar bacteriophage tail fiber	1	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu3039	/	Similar to Unknown protein	2	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu3152	/	Similar to stress response protein	1	Yes	
Methylated	Non Methylated	plu3159	pdl	Similar to lipase of <i>P. luminescens</i>	2		
Methylated	Non Methylated	plu3630	/	Putative type I fimbriae	2	Yes	
Methylated	Non Methylated						
Methylated	Non Methylated	plu4778	/	Similar to Gp49 of Bacteriophage N15	2	Yes	

Tableau 9 : Bilan des promoteurs de gènes différentiellement méthylés couplé à un test d'interaction hypothétique avec OxyR et/ou Lrp (Virtual Footprint).

Les sites GATC listés ici sont ceux retrouvés différemment méthylés entre la souche contrôle (plasmide vide) et la souche surexprimant Dam et étant situés dans une région promotrice de gène. Les noms des gènes sont présentés sous leur plu ou leur nom si ils sont annotés, leur fonction hypothétique est aussi décrite. Le nombre total de sites GATC présents dans la partie promotrice est aussi donné. Chaque région promotrice a indépendamment été testée pour une potentielle reconnaissance par les deux protéines régulatrices OxyR (NhaR pour *nhaA*) et Lrp d'*E. coli* K12. En noir aucune interaction potentielle, en gris clair interaction potentielle mais pas au niveau du/des sites GATC, en gris intermédiaire interaction au niveau d'un site GATC mais score faible (<2 Cf. Virtual footprint), en gris foncé interaction au niveau du/des sites GATC avec un score de 14 pour P_{ogrK}/OxyR, 10 pour P_{plu3630}/OxyR et 12 pour P_{nhaA}/NhaR.

globales de RNAseq et de SMRT afin de regarder directement les gènes impactés dans leur expression dans ces souches et les relier à un différentiel de méthylation (Doberenz et al., 2017). Nous avons commencé par rechercher les sites GATC situés dans des régions de promoteurs putatifs étant différentiellement méthylés entre la souche Dam+ et son contrôle (Tableau 9). Sachant que Dam ne régule pas directement l'expression des gènes mais modifie (de par son activité de méthylation) l'affinité de protéines régulatrices pour les régions promotrices, nous avons recherché *in silico* des sites potentiels de liaison des régulateurs OxyR et Lrp (régulateurs les plus décrits comme étant en compétition avec Dam) sur ces régions promotrices (Tableau 9). Cette analyse nous a révélé que certaines régions avaient un fort potentiel en tant que cibles de la protéine régulatrice OxyR (ou NhaR pour *nhaA*). Les gènes les plus intéressants étant *ogrK*, *nhaA* et *plu3630* ayant tous les trois des zones de forte liaison potentielle avec OxyR au niveau du ou des sites GATC différentiellement méthylés. Un point encore plus intéressant est que l'analyse couplée du RNAseq et du méthylome a mis en évidence les gènes *nhaA* et *plu3630* qui sont retrouvés différentiels dans les deux analyses. Le gène *ogrK* code pour une protéine régulatrice de gènes phagiques chez *E. coli* et de façon intéressante, l'opéron phagique situé en aval d'*ogrK* est significativement surexprimé chez la souche Dam+. Nous nous sommes principalement intéressé aux gènes *nhaA* et *ogrK*, décrits chez d'autres bactéries, contrairement au gène *plu3630* qui reste malgré tout un excellent candidat. Après vérification de la fonctionnalité du gène *nhaA* nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine régulatrice NhaR (décrit chez *E. coli*) et Dam sont en compétition au niveau de la région promotrice de ce gène. De même, la région promotrice d'*ogrK* ayant un fort pourcentage d'homologie avec la région promotrice d'*agn43* (cible d'une compétition entre Dam et OxyR chez *E. coli*) nous pouvons émettre la même hypothèse pour ce gène. L'étude de ces régions promotrices en utilisant des approches de footprint, pour vérifier une liaison des protéines régulatrices différente selon leur état de méthylation, ainsi que des approches de digestion d'ADN (sensible à la méthylation), pour vérifier l'état de méthylation de ces régions *in vivo*, font partie des perspectives les plus prometteuses de cette thèse.

3) Conclusion

Les résultats de cette thèse ont permis de démontrer l'importance de la méthylation de l'ADN (notamment par Dam) chez une bactérie pathogène d'insecte, *P. luminescens* TT01. Si la méthylation de l'ADN par la MTase Dam ne semble pas impliquée dans l'hétérogénéité phénotypique observée chez *P. luminescens*, elle semble jouer un rôle important dans le cycle de vie de cette bactérie. Aucun mécanisme de régulation direct n'a pu être mis à jour pour expliquer

les phénotypes observés mais plusieurs gènes candidats ont été identifiés grâce à une approche novatrice couplant les analyses de RNAseq et SMRT qui sera peut-être réutilisée dans d'autres études. Pour finir, ce travail aura permis d'amener une pierre à l'édifice de la découverte des mécanismes régulant les interactions permettant aux bactéries d'alterner entre la symbiose et la virulence.

Bibliographie :

- Acharya, Samir, Patricia L. Foster, Peter Brooks, and Richard Fishel. 2003. "The Coordinated Functions of the E. Coli MutS and MutL Proteins in Mismatch Repair." *Molecular Cell* 12 (1): 233–46.
- Akama, T. O., Y. Okazaki, M. Ito, H. Okuizumi, H. Konno, M. Muramatsu, C. Plass, W. A. Held, and Y. Hayashizaki. 1997. "Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS-M)-Based Genome-Wide Scanning of Mouse Liver Tumors for Alterations in DNA Methylation Status." *Cancer Research* 57 (15): 3294–99.
- Akhurst, R. J. 1980. "Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* Spp., Bacteria Symbiotically Associated with the Insect Pathogenic Nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*." *Microbiology* 121 (2): 303–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-121-2-303>.
- Sanger F., et. n.d. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. - PubMed - NCBI." Accessed September 13, 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>.
- Aloui, Amine, Abdelwaheb Chatty, Alya El May, and Ahmed Landoulsi. 2007. "The Effect of Methylation on DNA Replication in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium." *Comptes Rendus Biologies* 330 (8): 576–80. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.06.001>.
- Au, K. G., K. Welsh, and P. Modrich. 1992. "Initiation of Methyl-Directed Mismatch Repair." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (17): 12142–48.
- Aya Castañeda, María del Rosario, Sebastián Hernán Sarnacki, Mariángel Noto Llana, Adriana Gabriela López Guerra, Mónica Nancy Giacomodonato, and María Cristina Cerquetti. 2015. "Dam Methylation Is Required for Efficient Biofilm Production in *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis." *International Journal of Food Microbiology* 193 (January): 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.003>.
- Båga, M., M. Norgren, and S. Normark. 1987. "Biogenesis of E. Coli Pap Pili: papH, a Minor Pilin Subunit Involved in Cell Anchoring and Length Modulation." *Cell* 49 (2): 241–51.
- Bager, Ragnhild, Mohammad Roghanian, Kenn Gerdes, and David J. Clarke. 2016. "Alarmone (p)ppGpp Regulates the Transition from Pathogenicity to Mutualism in *Photobacterium luminescens*." *Molecular Microbiology* 100 (4): 735–47. <https://doi.org/10.1111/mmi.13345>.
- Balbontín, Roberto, Gary Rowley, M. Graciela Pucciarelli, Javier López-Garrido, Yvette Wormstone, Sacha Lucchini, Francisco García-Del Portillo, Jay C. D. Hinton, and Josep Casadesús. 2006. "DNA Adenine Methylation Regulates Virulence Gene Expression in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium." *Journal of Bacteriology* 188 (23): 8160–68. <https://doi.org/10.1128/JB.00847-06>.
- Band, Victor I., and David S. Weiss. 2015. "Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 4 (1): 18–41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4010018>.
- Bedding, R. A., and A. S. Molyneux. 1982. "Penetration of Insect Cuticle by Infective Juveniles of *Heterorhabditis* Spp. (*Heterorhabditidae* : *Nematoda*)." *Nematologica*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302166764>.
- Bennett, H. P. J., and D. J. Clarke. 2005. "The pbgPE Operon in *Photobacterium luminescens* Is Required for Pathogenicity and Symbiosis." *Journal of Bacteriology* 187 (1): 77–84. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.77-84.2005>.
- Berdis, Anthony J., Irene Lee, James K. Coward, Craig Stephens, Rachel Wright, Lucy

- Shapiro, and Stephen J. Benkovic. 1998. "A Cell Cycle-Regulated Adenine DNA Methyltransferase from *Caulobacter Crescentus* Processively Methylates GANTC Sites on Hemimethylated DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 2874–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2874>.
- Bibikova, Marina, and Jian-Bing Fan. 2010. "Genome-Wide DNA Methylation Profiling." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 2 (2): 210–23. <https://doi.org/10.1002/wsbm.35>.
- Bickle, T. A., and D. H. Krüger. 1993. "Biology of DNA Restriction." *Microbiological Reviews* 57 (2): 434–50.
- Bintrim, S. B., and J. C. Ensign. 1998. "Insertional Inactivation of Genes Encoding the Crystalline Inclusion Proteins of *Photobacterium Luminescens* Results in Mutants with Pleiotropic Phenotypes." *Journal of Bacteriology* 180 (5): 1261–69.
- Birkeland, N. K., B. H. Lindqvist, and G. E. Christie. 1991. "Control of Bacteriophage P2 Gene Expression: Analysis of Transcription of the *Ogr* Gene." *Journal of Bacteriology* 173 (21): 6927–34.
- Blow, Matthew J., Tyson A. Clark, Chris G. Daum, Adam M. Deutschbauer, Alexey Fomenkov, Roxanne Fries, Jeff Froula, et al. 2016. "The Epigenomic Landscape of Prokaryotes." *PLoS Genetics* 12 (2): e1005854. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005854>.
- Blyn, L B, B A Braaten, and D A Low. 1990. "Regulation of Pap Pilin Phase Variation by a Mechanism Involving Differential Dam Methylation States." *The EMBO Journal* 9 (12): 4045–54.
- Boemare, N.E., Akhurst, R.J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology*, 134, 751-761.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst, and R. G. Mourant. 1993. "DNA Relatedness between *Xenorhabdus* Spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer *Xenorhabdus Luminescens* to a New Genus, *Photobacterium* Gen. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43 (2): 249–55. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249>.
- Boemare, N., J. O. Thaler, and A. Lanois. 1997. "Simple Bacteriological Tests for Phenotypic Characterization of *Xenorhabdus* and *Photobacterium* Phase Variants." *Symbiosis* 22, 22 (August). <https://prodinra.inra.fr/?locale=en#!ConsultNotice:131058>.
- Bonifield, Heather R., and Kelly T. Hughes. 2003. "Flagellar Phase Variation in *Salmonella* Enterica Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism." *Journal of Bacteriology* 185 (12): 3567–74.
- Bowen, D. J., and J. C. Ensign. 2001. "Isolation and Characterization of Intracellular Protein Inclusions Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium Luminescens*." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4834–41.
- Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low. 1994. "Methylation Patterns in Pap Regulatory DNA Control Pyelonephritis-Associated Pili Phase Variation in *E. Coli*." *Cell* 76 (3): 577–88.
- Braslavsky, Ido, Benedict Hebert, Emil Kartalov, and Stephen R. Quake. 2003. "Sequence Information Can Be Obtained from Single DNA Molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 3960–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230489100>.
- Brillard, Julien, Eric Duchaud, Noël Boemare, Frank Kunst, and Alain Givaudan. 2002. "The PhlA Hemolysin from the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium Luminescens* Belongs to the Two-Partner Secretion Family of Hemolysins." *Journal of Bacteriology* 184 (14): 3871–78.

- Broadbent, S E, M R Davies, and M W van der Woude. 2010. "Phase Variation Controls Expression of Salmonella Lipopolysaccharide Modification Genes by a DNA Methylation-Dependent Mechanism." *Molecular Microbiology* 77 (2): 337–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07203.x>.
- Brugirard-Ricaud, Karine, Eric Duchaud, Alain Givaudan, Pierre Alain Girard, Frank Kunst, Noel Boemare, Michel Brehélin, and Robert Zumbihl. 2005. "Site-Specific Antiphagocytic Function of the *Photobacterium luminescens* Type III Secretion System during Insect Colonization." *Cellular Microbiology* 7 (3): 363–71. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00466.x>.
- Brunet, Yannick R., Christophe S. Bernard, Marthe Gavioli, Roland Llobès, and Eric Cascales. 2011. "An Epigenetic Switch Involving Overlapping Fur and DNA Methylation Optimizes Expression of a Type VI Secretion Gene Cluster." *PLoS Genetics* 7 (7): e1002205. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002205>.
- Burdett, V., C. Baitinger, M. Viswanathan, S. T. Lovett, and P. Modrich. 2001. "In Vivo Requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in Methyl-Directed Mismatch Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6765–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.121183298>.
- Carmel, O., O. Rahav-Manor, N. Dover, B. Shaanan, and E. Padan. 1997. "The Na⁺-Specific Interaction between the LysR-Type Regulator, NhaR, and the nhaA Gene Encoding the Na⁺/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*." *The EMBO Journal* 16 (19): 5922–29. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5922>.
- Casadesús, Josep. 2016. "Bacterial DNA Methylation and Methylomes." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 945: 35–61. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_3.
- Casadesús, Josep, and David Low. 2006. "Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 70 (3): 830–56. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-06>.
- Casadesús, Josep, and David A. Low. 2013. "Programmed Heterogeneity: Epigenetic Mechanisms in Bacteria." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (20): 13929–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472274>.
- Cascales, Eric. 2008. "The Type VI Secretion Toolkit." *EMBO Reports* 9 (8): 735–41. <https://doi.org/10.1038/embo.2008.131>.
- Castagnola, Anaïs, Geraldine Mulley, Nathaniel Davis, Nicholas Waterfield, and S. Patricia Stock. 2016. "Transcript Abundance of *Photobacterium* Insect-Related (Pir) Toxin in *Manduca sexta* and *Galleria mellonella* Infections." *Toxins* 8 (10). <https://doi.org/10.3390/toxins8100287>.
- Cerenius, Lage, Bok Luel Lee, and Kenneth Söderhäll. 2008. "The proPO-System: Pros and Cons for Its Role in Invertebrate Immunity." *Trends in Immunology* 29 (6): 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>.
- Chang, Dong-Eun, Shelly Leung, Mariette R. Atkinson, Aaron Reifler, Daniel Forger, and Alexander J. Ninfa. 2010. "Building Biological Memory by Linking Positive Feedback Loops." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (1): 175–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908314107>.
- Chavez, Carolina Varela, Grégory Jubelin, Gabriel Courties, Aurélie Gomard, Nadège Ginibre, Sylvie Pages, Frédéric Taïeb, et al. 2010. "The Cyclomodulin Cif of *Photobacterium luminescens* Inhibits Insect Cell Proliferation and Triggers Host Cell Death by Apoptosis." *Microbes and Infection* 12 (14–15): 1208–18. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.006>.
- Chen, Liang, Daniel B. Paulsen, Daniel W. Scruggs, Michelle M. Banes, Brenda Y. Reeks, and Mark L. Lawrence. 2003. "Alteration of DNA Adenine Methylase (Dam) Activity

- in *Pasteurella Multocida* Causes Increased Spontaneous Mutation Frequency and Attenuation in Mice.” *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 8): 2283–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26251-0>.
- Cheng, Lin, and Kenneth C. Keiler. 2009. “Correct Timing of *dnaA* Transcription and Initiation of DNA Replication Requires Trans Translation.” *Journal of Bacteriology* 191 (13): 4268–75. <https://doi.org/10.1128/JB.00362-09>.
- Chiang, Sarah M., and Herb E. Schellhorn. 2012. “Regulators of Oxidative Stress Response Genes in *Escherichia Coli* and Their Functional Conservation in Bacteria.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525 (2): 161–69. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>.
- Christie, G. E., E. Haggård-Ljungquist, R. Feiwell, and R. Calendar. 1986. “Regulation of Bacteriophage P2 Late-Gene Expression: The *Ogr* Gene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10): 3238–42.
- Christie, Gail E., and Richard Calendar. 2016. “Bacteriophage P2.” *Bacteriophage* 6 (1): e1145782. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1145782>.
- Ciche, Todd A., Scott B. Bintrim, Alexander R. Horswill, and Jerald C. Ensign. 2001. “A Phosphopantetheinyl Transferase Homolog Is Essential for *Photorhabdus Luminescens* To Support Growth and Reproduction of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis Bacteriophora*.” *Journal of Bacteriology* 183 (10): 3117–26. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3117-3126.2001>.
- Ciche, Todd A., Creg Darby, Ralf-Udo Ehlers, Steven Forst, and Heidi Goodrich-Blair. 2006. “Dangerous Liaisons: The Symbiosis of Entomopathogenic Nematodes and Bacteria.” *Biological Control*, Third International Symposium on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria, 38 (1): 22–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.016>.
- Ciche, Todd A., and Jerald C. Ensign. 2003. “For the Insect Pathogen *Photorhabdus Luminescens*, Which End of a Nematode Is Out?” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1890–97.
- Ciche, Todd A., Kwi-Suk Kim, Bettina Kaufmann-Daszczuk, Ken C. Q. Nguyen, and David H. Hall. 2008. “Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus Luminescens* Transmission by *Heterorhabditis Bacteriophora* Nematodes.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2275–87. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-07>.
- Clarke, David J. 2008. “*Photorhabdus*: A Model for the Analysis of Pathogenicity and Mutualism.” *Cellular Microbiology* 10 (11): 2159–67. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x>.
- Clarke, David J. 2014. “The Genetic Basis of the Symbiosis between *Photorhabdus* and Its Invertebrate Hosts.” *Advances in Applied Microbiology* 88: 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800260-5.00001-2>.
- Clarke, David J. 2017. “The Regulation of Secondary Metabolism in *Photorhabdus*.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 402: 81–102. https://doi.org/10.1007/82_2016_21.
- Clarke, David J., and Barbara C. A Dowds. 1995. “Virulence Mechanisms of *Photorhabdus* Sp. Strain K122 toward Wax Moth Larvae.” *Journal of Invertebrate Pathology* 66 (2): 149–55. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1078>.
- Collier, Justine, Harley H. McAdams, and Lucy Shapiro. 2007. “A DNA Methylation Ratchet Governs Progression through a Bacterial Cell Cycle.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (43): 17111–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708112104>.

- Collier, Justine, Sean Richard Murray, and Lucy Shapiro. 2006. "DnaA Couples DNA Replication and the Expression of Two Cell Cycle Master Regulators." *The EMBO Journal* 25 (2): 346–56. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600927>.
- Constant, Richard H. ffrench-, Andrea Dowling, and Nicholas R. Waterfield. 2007. "Insecticidal Toxins from Photorhabdus Bacteria and Their Potential Use in Agriculture." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 49 (4): 436–51. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.019>.
- Cook, Simon M, and Jason D McArthur. 2013. "Developing Galleria Mellonella as a Model Host for Human Pathogens." *Virulence* 4 (5): 350–53. <https://doi.org/10.4161/viru.25240>.
- Cota, Ignacio, Anne Béatrice Blanc-Potard, and Josep Casadesús. 2012. "STM2209-STM2208 (opvAB): A Phase Variation Locus of Salmonella Enterica Involved in Control of O-Antigen Chain Length." *PLoS ONE* 7 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036863>.
- Cota, Ignacio, Boyke Bunk, Cathrin Spröer, Jörg Overmann, Christoph König, and Josep Casadesús. 2016. "OxyR-Dependent Formation of DNA Methylation Patterns in OpvABOFF and OpvABON Cell Lineages of Salmonella Enterica." *Nucleic Acids Research* 44 (8): 3595–3609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1483>.
- Cota, Ignacio, María Antonia Sánchez-Romero, Sara B. Hernández, M. Graciela Pucciarelli, Francisco García-Del Portillo, and Josep Casadesús. 2015. "Epigenetic Control of Salmonella Enterica O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance." *PLoS Genetics* 11 (11): e1005667. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005667>.
- Crawford, Jason M., Cyril Portmann, Xu Zhang, Maarten B. J. Roeffaers, and Jon Clardy. 2012. "Small Molecule Perimeter Defense in Entomopathogenic Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27): 10821–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201160109>.
- Daborn, P. J., N. Waterfield, C. P. Silva, C. P. Y. Au, S. Sharma, and R. H. Ffrench-Constant. 2002. "A Single Photorhabdus Gene, Makes Caterpillars Floppy (Mcf), Allows Escherichia Coli to Persist within and Kill Insects." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10742–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.102068099>.
- Dalebroux, Zachary D., and Samuel I. Miller. 2014. "Salmonellae PhoPQ Regulation of the Outer Membrane to Resist Innate Immunity." *Current Opinion in Microbiology* 17 (February): 106–13. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.12.005>.
- Dao, V., and P. Modrich. 1998. "Mismatch-, MutS-, MutL-, and Helicase II-Dependent Unwinding from the Single-Strand Break of an Incised Heteroduplex." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (15): 9202–7.
- Davies, Graham P, Ina Martin, Shane S Sturrock, Andrew Cronshaw, Noreen E Murray, and David T. F Dryden. 1999. "On the Structure and Operation of Type I DNA Restriction enzymes" Edited by J. Karn." *Journal of Molecular Biology* 290 (2): 565–79. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2908>.
- Davis, Brigid M., Michael C. Chao, and Matthew K. Waldor. 2013. "Entering the Era of Bacterial Epigenomics with Single Molecule Real Time DNA Sequencing." *Current Opinion in Microbiology* 16 (2): 192–98. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.011>.
- Davis-Richardson, Austin G., Jordan T. Russell, Raquel Dias, Andrew J. McKinlay, Ronald Canepa, Jennie R. Fagen, Kristin T. Rusoff, et al. 2016. "Integrating DNA Methylation and Gene Expression Data in the Development of the Soybean-Bradyrhizobium N2-Fixing Symbiosis." *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00518>.

- Deans, Carrie, and Keith A. Maggert. 2015. "What Do You Mean, 'epigenetic'?" *Genetics* 199 (4): 887–96. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- Delbrück, M. 1945. "The Burst Size Distribution in the Growth of Bacterial Viruses (Bacteriophages)1." *Journal of Bacteriology* 50 (2): 131–35.
- Demarre, Gaëlle, and Dhruva K. Chattoraj. 2010. "DNA Adenine Methylation Is Required to Replicate Both *Vibrio Cholerae* Chromosomes Once per Cell Cycle." *PLoS Genetics* 6 (5): e1000939. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000939>.
- Derzelle, Sylviane, Saravuth Ngo, Evelyne Turlin, Eric Duchaud, Abdelkader Namane, Frank Kunst, Antoine Danchin, Philippe Bertin, and Jean-François Charles. 2004. "AstR-AstS, a New Two-Component Signal Transduction System, Mediates Swarming, Adaptation to Stationary Phase and Phenotypic Variation in *Photobacterium luminescens*." *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 4): 897–910. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26563-0>.
- Derzelle, Sylviane, Evelyne Turlin, Eric Duchaud, Sylvie Pages, Frank Kunst, Alain Givaudan, and Antoine Danchin. 2004. "The PhoP-PhoQ Two-Component Regulatory System of *Photobacterium luminescens* Is Essential for Virulence in Insects." *Journal of Bacteriology* 186 (5): 1270–79.
- Diepold, Andreas, and Judith P. Armitage. 2015. "Type III Secretion Systems: The Bacterial Flagellum and the Injectisome." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370 (1679). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0020>.
- Doberenz, D. Eckweiler, O. Reichert, V. Jensen, B. Bunk, C. Spröer, A. Kordes, E. Frangipani, K. Luong, J. Korfach, S. Heeb, J. Overmann, V. Kaefer, S. Häussler. *mBio* Feb 2017, "Identification of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 DNA Methyltransferase, Its Targets, and Physiological Roles." 8 (1) e02312-16; doi : 10.1128/mBio.02312-16
- Dover, N., C. F. Higgins, O. Carmel, A. Rimon, E. Pinner, and E. Padan. 1996. "Na⁺-Induced Transcription of *nhaA*, Which Encodes an Na⁺/H⁺ Antiporter in *Escherichia coli*, Is Positively Regulated by *nhaR* and Affected by *Hns*." *Journal of Bacteriology* 178 (22): 6508–17.
- Dover, N., and E. Padan. 2001. "Transcription of *nhaA*, the Main Na⁺/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*, Is Regulated by Na⁺ and Growth Phase." *Journal of Bacteriology* 183 (2): 644–53. <https://doi.org/10.1128/JB.183.2.644-653.2001>.
- Dowling, A. J., P. J. Daborn, N. R. Waterfield, P. Wang, C. H. Streuli, and R. H. French-Constant. 2004. "The Insecticidal Toxin Makes Caterpillars Floppy (Mcf) Promotes Apoptosis in Mammalian Cells." *Cellular Microbiology* 6 (4): 345–53.
- Dowling, A. J., N. R. Waterfield, M. C. Hares, G. Le Goff, C. H. Streuli, and R. H. French-Constant. 2007. "The Mcf1 Toxin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway and Apoptosis Is Attenuated by Mutation of the BH3-like Domain." *Cellular Microbiology* 9 (10): 2470–84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00974.x>.
- Dryden, D. T., L. P. Cooper, P. H. Thorpe, and O. Byron. 1997. "The in Vitro Assembly of the EcoKI Type I DNA Restriction/modification Enzyme and Its in Vivo Implications." *Biochemistry* 36 (5): 1065–76. <https://doi.org/10.1021/bi9619435>.
- Duchaud, E., C. Rusniok, L. Frangeul, C. Buchrieser, A. Givaudan, S. Taourit, S. Bocs, et al. 2003. "The Genome Sequence of the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium luminescens*." *Nature Biotechnology* 21 (11): 1307–13. <https://doi.org/10.1038/nbt886>.
- Dybvig, K. 1993. "DNA Rearrangements and Phenotypic Switching in Prokaryotes." *Molecular Microbiology* 10 (3): 465–71.
- Easom, C. A., and D. J. Clarke. 2008. "Motility Is Required for the Competitive Fitness of Entomopathogenic *Photobacterium luminescens* during Insect Infection." *BMC*

- Microbiology* 8 (October): 168. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-168>.
- Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, et al. 2009. "Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules." *Science (New York, N.Y.)* 323 (5910): 133–38. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>.
- Eleftherianos, I., S. Boundy, S. A. Joyce, S. Aslam, J. W. Marshall, R. I. J. Cox, T. J. Simpson, D. J. Clarke, R. H. French-Constant, and S. E. Reynolds. 2007. "An Antibiotic Produced by an Insect-Pathogenic Bacterium Suppresses Host Defenses through Phenoloxidase Inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7): 2419–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610525104>.
- Erill, Ivan, Marina Puigvert, Ludovic Legrand, Rodrigo Guarischi-Sousa, Céline Vandecasteele, João C. Setubal, Stephane Genin, Alice Guidot, and Marc Valls. 2017. "Comparative Analysis of *Ralstonia Solanacearum* Methylomes." *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00504>.
- Erova, Tatiana E., Amin A. Fadl, Jian Sha, Bijay K. Khajanchi, Lakshmi L. Pillai, Elena V. Kozlova, and Ashok K. Chopra. 2006. "Mutations within the Catalytic Motif of DNA Adenine Methyltransferase (Dam) of *Aeromonas Hydrophila* Cause the Virulence of the Dam-Overproducing Strain To Revert to That of the Wild-Type Phenotype." *Infection and Immunity* 74 (10): 5763–72. <https://doi.org/10.1128/IAI.00994-06>.
- Escolar, L., J. Pérez-Martín, and V. de Lorenzo. 1999. "Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein." *Journal of Bacteriology* 181 (20): 6223–29.
- Fälker, S., J. Schilling, M. A. Schmidt, and Gerhard Heusipp. 2007. "Overproduction of DNA Adenine Methyltransferase Alters Motility, Invasion, and the Lipopolysaccharide O-Antigen Composition of *Yersinia Enterocolitica*." *Infection and Immunity* 75 (10): 4990–97. <https://doi.org/10.1128/IAI.00457-07>.
- Fang, Gang, Diana Munera, David I. Friedman, Anjali Mandlik, Michael C. Chao, Onureena Banerjee, Zhixing Feng, et al. 2012a. "Genome-Wide Mapping of Methylated Adenine Residues in Pathogenic *Escherichia Coli* Using Single-Molecule Real-Time Sequencing." *Nature Biotechnology* 30 (12): 1232–39. <https://doi.org/10.1038/nbt.2432>.
- Felsenstein, J. 1988. "Phylogenies and Quantitative Characters." *Annual Review of Ecology and Systematics* 19 (1): 445–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.002305>.
- Ferrell, J. E. 2002. "Self-Perpetuating States in Signal Transduction: Positive Feedback, Double-Negative Feedback and Bistability." *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2): 140–48.
- Fioravanti, A., C. Fumeaux, S. S. Mohapatra, C. Bompard, M. Brillì, A. Frandi, V. Castric, V. Villeret, P. H. Viollier, and E. G. Biondi. 2013. "DNA Binding of the Cell Cycle Transcriptional Regulator GcrA Depends on N6-Adenosine Methylation in *Caulobacter Crescentus* and Other Alphaproteobacteria." *PLoS Genetics* 9 (5): e1003541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003541>.
- Flusberg, B. A., Dale R. Webster, J. H. Lee, K. J. Travers, E. C. Olivares, T. A. Clark, J. Korlach, and S. W. Turner. 2010. "Direct Detection of DNA Methylation during Single-Molecule, Real-Time Sequencing." *Nature Methods* 7 (6): 461–65. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1459>.
- Forst, S., and D. Clake. 2002. "Bacteria-Nematode Symbiosis." In *Entomopathogenic Nematology*, 57. Gaugler, R. <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20023023442>.
- Forst, S., and K. Neilson. 1996. "Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* Spp. and *Photorhabdus* Spp." *Microbiological Reviews* 60 (1): 21–43.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul. 1992. "A Genomic Sequencing Protocol That Yields a

- Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5): 1827–31.
- Furuta, Yoshikazu, and Ichizo Kobayashi. 2013. *Restriction-Modification Systems as Mobile Epigenetic Elements*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK63963/>.
- Furuta, Yoshikazu, Hiroe Namba-Fukuyo, Tomoko F. Shibata, Tomoaki Nishiyama, Shuji Shigenobu, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Mitsuyasu Hasebe, and Ichizo Kobayashi. 2014. “Methylome Diversification through Changes in DNA Methyltransferase Sequence Specificity.” *PLoS Genetics* 10 (4): e1004272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004272>.
- Ganoth, Assaf, Raphael Alhadeff, Dovrat Kohen, and Isaiah T. Arkin. 2011. “Characterization of the Na⁺/H⁺ Antiporter from *Yersinia Pestis*.” *PLOS ONE* 6 (11): e26115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026115>.
- García-Del Portillo, F., M. G. Pucciarelli, and J. Casadesús. 1999. “DNA Adenine Methylase Mutants of *Salmonella Typhimurium* Show Defects in Protein Secretion, Cell Invasion, and M Cell Cytotoxicity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11578–83.
- Gerritsen, L.J.M., and P.H. Smits. 1997. “The Influence of *Photorhabdus Luminescens* Strains and Form Variants on the Reproduction and Bacterial Retention of *Heterorhabditis Megidis*.” *Fundamental and Applied Nematology* 20 (4): 317–22.
- Givaudan, A., and A. Lanois. 2000. “flhDC, the Flagellar Master Operon of *Xenorhabdus Nematophilus*: Requirement for Motility, Lipolysis, Extracellular Hemolysis, and Full Virulence in Insects.” *Journal of Bacteriology* 182 (1): 107–15.
- Givaudan, Alain, and Anne Lanois. 2017. “Flagellar Regulation and Virulence in the Entomopathogenic Bacteria-*Xenorhabdus Nematophila* and *Photorhabdus Luminescens*.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 402: 39–51. https://doi.org/10.1007/82_2016_53.
- Glaeser, Angela, and Ralf Heermann. 2015. “A Novel Tool for Stable Genomic Reporter Gene Integration to Analyze Heterogeneity in *Photorhabdus Luminescens* at the Single-Cell Level.” *BioTechniques* 59 (2): 74–81. <https://doi.org/10.2144/000114317>.
- Glazar, Itamar, Sergio Galper, and Edna Sharon. 1991. “Virulence of the Nematode (Steinernematids and *Heterorhabditis*)-Bacteria (*Xenorhabdus* Spp.) Complex to the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera Littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae).” *Journal of Invertebrate Pathology* 57 (1): 94–100. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90045-R](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90045-R).
- Glickman, Barry W. n.d. “SPONTANEOUS MUTAGENESIS IN *Escherichia Coli* STRAINS LACKING 6-METHYLADENINE RESIDUES IN THEIR DNA.” *Mutation Research*.
- Goebel, W., and R. Gross. 2001. “Intracellular Survival Strategies of Mutualistic and Parasitic Prokaryotes.” *Trends in Microbiology* 9 (6): 267–73.
- Gonzalez, Diego, and Justine Collier. 2013. “DNA Methylation by CcrM Activates the Transcription of Two Genes Required for the Division of *Caulobacter Crescentus*.” *Molecular Microbiology* 88 (1): 203–18. <https://doi.org/10.1111/mmi.12180>.
- Gonzalez, Diego, Jennifer B. Kozdon, Harley H. McAdams, Lucy Shapiro, and Justine Collier. 2014. “The Functions of DNA Methylation by CcrM in *Caulobacter Crescentus*: A Global Approach.” *Nucleic Acids Research* 42 (6): 3720–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1352>.
- Gorbatyuk, B., and G. T. Marczynski. 2001. “Physiological Consequences of Blocked *Caulobacter Crescentus dnaA* Expression, an Essential DNA Replication Gene.”

- Molecular Microbiology* 40 (2): 485–97.
- Haagmans, W., and M. van der Woude. 2000. “Phase Variation of Ag43 in Escherichia Coli: Dam-Dependent Methylation Abrogates OxyR Binding and OxyR-Mediated Repression of Transcription.” *Molecular Microbiology* 35 (4): 877–87.
- Hallet, B. 2001. “Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: Combined Mechanisms of Phase Variation in Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 4 (5): 570–81.
- Han, R., and R. U. Ehlers. 2000. “Pathogenicity, Development, and Reproduction of Heterorhabditis Bacteriophora and Steinernema Carpopapsae under Axenic in Vivo Conditions.” *Journal of Invertebrate Pathology* 75 (1): 55–58.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4900>.
- Han, R., and R.-U. Ehlers. 2001. “Effect of Photorhabdus Luminescens Phase Variants on the in Vivo and in Vitro Development and Reproduction of the Entomopathogenic Nematodes Heterorhabditis Bacteriophora and Steinernema Carpopapsae.” *FEMS Microbiology Ecology* 35 (3): 239–47.
- Harris, Timothy D., Phillip R. Buzby, Hazen Babcock, Eric Beer, Jayson Bowers, Ido Braslavsky, Marie Causey, et al. 2008. “Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome.” *Science (New York, N.Y.)* 320 (5872): 106–9.
<https://doi.org/10.1126/science.1150427>.
- He, Gui-Xin, Chu Zhang, Robert R. Crow, Conner Thorpe, Huizhong Chen, Sanath Kumar, Tomofusa Tsuchiya, and Manuel F. Varela. 2011. “SugE, a New Member of the SMR Family of Transporters, Contributes to Antimicrobial Resistance in Enterobacter Cloacae.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (8): 3954–57.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00094-11>.
- Heather, James M., and Benjamin Chain. 2016. “The Sequence of Sequencers: The History of Sequencing DNA.” *Genomics* 107 (1): 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>.
- Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan. 1999. “An Essential Role for DNA Adenine Methylation in Bacterial Virulence.” *Science (New York, N.Y.)* 284 (5416): 967–70.
- Henderson, Ian R., and Peter Owen. 1999. “The Major Phase-Variable Outer Membrane Protein of Escherichia Coli Structurally Resembles the Immunoglobulin A1 Protease Class of Exported Protein and Is Regulated by a Novel Mechanism Involving Dam and OxyR.” *Journal of Bacteriology* 181 (7): 2132–41.
- Herman, G E, and P Modrich. 1981. “Escherichia Coli K-12 Clones That Overproduce Dam Methylase Are Hypermutable.” *Journal of Bacteriology* 145 (1): 644–46.
- Herman, G. E., and P. Modrich. 1982. “Escherichia Coli Dam Methylase. Physical and Catalytic Properties of the Homogeneous Enzyme.” *Journal of Biological Chemistry* 257 (5): 2605–12.
- Hernday, Aaron D., Bruce A. Braaten, and David A. Low. 2003. “The Mechanism by Which DNA Adenine Methylase and PapI Activate the Pap Epigenetic Switch.” *Molecular Cell* 12 (4): 947–57.
- Hernday, Aaron, Margareta Krabbe, Bruce Braaten, and David Low. 2002. “Self-Perpetuating Epigenetic Pili Switches in Bacteria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 4 (December): 16470–76.
<https://doi.org/10.1073/pnas.182427199>.
- Herz, Katia, Sophie Vimont, Etana Padan, and Patrick Berche. 2003. “Roles of NhaA, NhaB, and NhaD Na⁺/H⁺ Antiporters in Survival of Vibrio Cholerae in a Saline Environment.” *Journal of Bacteriology* 185 (4): 1236–44.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1236-1244.2003>.
- Hill, Stuart A., and John K. Davies. 2009. “Pilin Gene Variation in Neisseria Gonorrhoeae:

- Reassessing the Old Paradigms.” *FEMS Microbiology Reviews* 33 (3): 521–30.
- Holtzendorff, Julia, Dean Hung, Peter Brende, Ann Reisenauer, Patrick H. Viollier, Harley H. McAdams, and Lucy Shapiro. 2004. “Oscillating Global Regulators Control the Genetic Circuit Driving a Bacterial Cell Cycle.” *Science (New York, N.Y.)* 304 (5673): 983–87. <https://doi.org/10.1126/science.1095191>.
- Howell-Adams, B., and H. S. Seifert. 2000. “Molecular Models Accounting for the Gene Conversion Reactions Mediating Gonococcal Pilin Antigenic Variation.” *Molecular Microbiology* 37 (5): 1146–58.
- Hu, Changkun, Yunqi Zhao, Huiyun Sun, and Yixin Yang. 2017. “Synergism of Dam, MutH, and MutS in Methylation-Directed Mismatch Repair in *Escherichia Coli*.” *Mutation Research* 795: 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.12.002>.
- Hu, K., and J. M. Webster. 2000. “Antibiotic Production in Relation to Bacterial Growth and Nematode Development in *Photorhabdus*--*Heterorhabditis* Infected *Galleria Mellonella* Larvae.” *FEMS Microbiology Letters* 189 (2): 219–23.
- Hu, Min, Jun Yao, and Kornelia Polyak. 2006. “Methylation-Specific Digital Karyotyping.” *Nature Protocols* 1 (3): 1621–36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.278>.
- Hu, Patrick J. 2007. “Dauer.” *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, August, 1–19. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>.
- Hultgren, Scott J., and Staffan Normark. 1991. “Biogenesis of the Bacterial Pilus.” *Current Opinion in Genetics & Development* 1 (3): 313–18. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80293-X](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80293-X).
- Ichida, Hiroyuki, Tomoki Matsuyama, Tomoko Abe, and Takato Koba. 2007. “DNA Adenine Methylation Changes Dramatically during Establishment of Symbiosis.” *The FEBS Journal* 274 (4): 951–62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05643.x>.
- Ichida, Hiroyuki, Katsuyoshi Yoneyama, Takato Koba, and Tomoko Abe. 2009. “Epigenetic Modification of Rhizobial Genome Is Essential for Efficient Nodulation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389 (2): 301–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.137>.
- Iyer, Ravi R., Anna Pluciennik, Vickers Burdett, and Paul L. Modrich. 2006. “DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms.” *Chemical Reviews* 106 (2): 302–23. <https://doi.org/10.1021/cr0404794>.
- Jabbari, Kamel, and Giorgio Bernardi. 2004. “Cytosine Methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA Frequencies.” *Gene* 333 (May): 143–49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.043>.
- Johnigk, S.-A., F. Ecke, M. Poehling, and R.-U. Ehlers. 2004. “Liquid Culture Mass Production of Biocontrol Nematodes, *Heterorhabditis Bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): Improved Timing of Dauer Juvenile Inoculation.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5): 651–58. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1519-9>.
- Johnson, A. D., A. R. Poteete, G. Lauer, R. T. Sauer, G. K. Ackers, and M. Ptashne. 1981. “Lambda Repressor and Cro--Components of an Efficient Molecular Switch.” *Nature* 294 (5838): 217–23.
- Jonson, Ann-Beth, Staffan Normark, and Mikael Rhen. 2005. “Fimbriae, Pili, Flagella and Bacterial Virulence.” *Contributions to Microbiology* 12: 67–89. <https://doi.org/10.1159/000081690>.
- Josenhans, Christine, and Sebastian Suerbaum. 2002. “The Role of Motility as a Virulence Factor in Bacteria.” *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 291 (8): 605–14. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>.
- Joyce, Susan A., Alexander O. Brachmann, Itamar Glazer, Lea Lango, Gertrud Schwär, David J. Clarke, and Helge B. Bode. 2008. “Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene.” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 47 (10): 1942–45.

- <https://doi.org/10.1002/anie.200705148>.
- Joyce, Susan A., and David J. Clarke. 2003. "A hexA Homologue from *Phototrhhabdus* Regulates Pathogenicity, Symbiosis and Phenotypic Variation." *Molecular Microbiology* 47 (5): 1445–57.
- Joyce, Susan A, Robert J Watson, and David J Clarke. 2006. "The Regulation of Pathogenicity and Mutualism in *Phototrhhabdus*." *Current Opinion in Microbiology, Cell Regulation* / Edited by Werner Goebel and Stephen Lory, 9 (2): 127–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.004>.
- Jubelin G, Lanois A, Severac D, et al. FliZ Is a Global Regulatory Protein Affecting the Expression of Flagellar and Virulence Genes in Individual *Xenorhabdus nematophila* Bacterial Cells. Tan M-W, ed. *PLoS Genetics*. 2013;9(10):e1003915. doi:10.1371/journal.pgen.1003915.
- Jubelin, Grégory, Carolina Varela Chavez, Frédéric Taieb, Mark J. Banfield, Ascel Samba-Louaka, Rika Nobe, Jean-Philippe Nougayrède, et al. 2009. "Cycle Inhibiting Factors (CIFs) Are a Growing Family of Functional Cyclomodulins Present in Invertebrate and Mammal Bacterial Pathogens." *PloS One* 4 (3): e4855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004855>.
- Julio, S. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, K. E. Klose, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan. 2001. "DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Vibrio Cholerae*." *Infection and Immunity* 69 (12): 7610–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7610-7615.2001>.
- Julio, Steven M., Douglas M. Heithoff, Robert L. Sinsheimer, David A. Low, and Michael J. Mahan. 2002. "DNA Adenine Methylase Overproduction in *Yersinia Pseudotuberculosis* Alters YopE Expression and Secretion and Host Immune Responses to Infection." *Infection and Immunity* 70 (2): 1006–9.
- Kahramanoglou, Christina, Ana I. Prieto, Supriya Khedkar, Bettina Haase, Ankur Gupta, Vladimir Benes, Gillian M. Fraser, Nicholas M. Luscombe, and Aswin S. N. Seshasayee. 2012. "Genomics of DNA Cytosine Methylation in *Escherichia Coli* Reveals Its Role in Stationary Phase Transcription." *Nature Communications* 3 (June): 886. <https://doi.org/10.1038/ncomms1878>.
- Kaltenbach, L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low. 1995. "Specific Binding of PapI to Lrp-Pap DNA Complexes." *Journal of Bacteriology* 177 (22): 6449–55.
- Katayama, Tsutomu, Shogo Ozaki, Kenji Keyamura, and Kazuyuki Fujimitsu. 2010. "Regulation of the Replication Cycle: Conserved and Diverse Regulatory Systems for DnaA and oriC." *Nature Reviews. Microbiology* 8 (3): 163–70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2314>.
- Kennaway, Christopher K., James E. Taylor, Chun Feng Song, Wojciech Potrzebowski, William Nicholson, John H. White, Anna Swiderska, et al. 2012. "Structure and Operation of the DNA-Translocating Type I DNA Restriction Enzymes." *Genes & Development* 26 (1): 92–104. <https://doi.org/10.1101/gad.179085.111>.
- Keshet, Ilana, Yeshayahu Schlesinger, Shlomit Farkash, Eyal Rand, Merav Hecht, Eran Segal, Eli Pikarski, et al. 2006. "Evidence for an Instructive Mechanism of de Novo Methylation in Cancer Cells." *Nature Genetics* 38 (2): 149–53. <https://doi.org/10.1038/ng1719>.
- Kozdon, Jennifer B., Michael D. Melfi, Khai Luong, Tyson A. Clark, Matthew Boitano, Susana Wang, Bo Zhou, et al. 2013. "Global Methylation State at Base-Pair Resolution of the *Caulobacter* Genome throughout the Cell Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (48): E4658-4667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319315110>.

- Krebes, Juliane, Richard D. Morgan, Boyke Bunk, Cathrin Spröer, Khai Luong, Raphael Parusel, Brian P. Anton, et al. 2014. "The Complex Methylome of the Human Gastric Pathogen *Helicobacter Pylori*." *Nucleic Acids Research* 42 (4): 2415–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1201>.
- Kumar, Ritesh, Asish K. Mukhopadhyay, Prachetash Ghosh, and Desirazu N. Rao. 2012a. "Comparative Transcriptomics of *H. Pylori* Strains AM5, SS1 and Their hpyAVIBM Deletion Mutants: Possible Roles of Cytosine Methylation." *PloS One* 7 (8): e42303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042303>.
- Kumar, Ritesh, Varatharajan Sabareesh, Asish K. Mukhopadhyay, and Desirazu N. Rao. 2012b. "Mutations in hpyAVIBM, C5 Cytosine DNA Methyltransferase from *Helicobacter Pylori* Result in Relaxed Specificity." *The FEBS Journal* 279 (6): 1080–92. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08502.x>.
- Kumar, Sumith, Bipul C. Karmakar, Deepesh Nagarajan, Asish K. Mukhopadhyay, Richard D. Morgan, and Desirazu N. Rao. 2018. "N4-Cytosine DNA Methylation Regulates Transcription and Pathogenesis in *Helicobacter Pylori*." *Nucleic Acids Research* 46 (7): 3429–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gky126>.
- Lacey, L. A., D. Grzywacz, D. I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge, and M. S. Goettel. 2015. "Insect Pathogens as Biological Control Agents: Back to the Future." *Journal of Invertebrate Pathology* 132 (November): 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- Lahue, R. S., K. G. Au, and P. Modrich. 1989. "DNA Mismatch Correction in a Defined System." *Science (New York, N.Y.)* 245 (4914): 160–64.
- Lang, Alexander E., Sonja Kühn, and Hans Georg Mannherz. 2017. "Photobacterium Luminescens Toxins TccC3 and TccC5 Affect the Interaction of Actin with Actin-Binding Proteins Essential for Treadmilling." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 399: 53–67. https://doi.org/10.1007/82_2016_43.
- Langer, Angela, Adriana Moldovan, Christian Harmath, Susan A. Joyce, David J. Clarke, and Ralf Heermann. 2017. "HexA Is a Versatile Regulator Involved in the Control of Phenotypic Heterogeneity of *Photobacterium Luminescens*." *PloS One* 12 (4): e0176535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176535>.
- Lango, Lea, and David J. Clarke. 2010. "A Metabolic Switch Is Involved in Lifestyle Decisions in *Photobacterium Luminescens*." *Molecular Microbiology* 77 (6): 1394–1405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07300.x>.
- Lanois, A., S. Pages, S. Bourot, A.-S. Canoy, A. Givaudan, and S. Gaudriault. 2011. "Transcriptional Analysis of a *Photobacterium* Sp. Variant Reveals Transcriptional Control of Phenotypic Variation and Multifactorial Pathogenicity in Insects." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (3): 1009–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01696-10>.
- Laub, Michael T., Swaine L. Chen, Lucy Shapiro, and Harley H. McAdams. 2002. "Genes Directly Controlled by CtrA, a Master Regulator of the *Caulobacter* Cell Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4632–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.062065699>.
- Law, Julie A., and Steven E. Jacobsen. 2010. "Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals." *Nature Reviews. Genetics* 11 (3): 204–20. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Le, Tu N., Yuji Miyazaki, Shohei Takuno, and Hidetoshi Saze. 2015. "Epigenetic Regulation of Intragenic Transposable Elements Impacts Gene Transcription in *Arabidopsis Thaliana*." *Nucleic Acids Research* 43 (8): 3911–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv258>.
- Lee, Jae Young, Judy Chang, Nimesh Joseph, Rodolfo Ghirlando, Desirazu N. Rao, and Wei

- Yang. 2005. "MutH Complexed with Hemi- and Unmethylated DNAs: Coupling Base Recognition and DNA Cleavage." *Molecular Cell* 20 (1): 155–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.019>.
- Lentes, Christopher J., Syed H. Mir, Marc Boehm, Constanta Ganea, Klaus Fendler, and Carola Hunte. 2014. "Molecular Characterization of the Na⁺/H⁺-Antiporter NhaA from *Salmonella Typhimurium*." *PLOS ONE* 9 (7): e101575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101575>.
- Lescat, Mathilde, Florence Reibel, Coralie Pintard, Sara Dion, Jérémy Glodt, Cecile Gateau, Adrien Launay, et al. 2014. "The Conserved nhaAR Operon Is Drastically Divergent between B2 and Non-B2 *Escherichia Coli* and Is Involved in Extra-Intestinal Virulence." *PloS One* 9 (9): e108738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108738>.
- Li, Mei, Guofeng Wu, Changkun Liu, Yongqiang Chen, Lihong Qiu, and Yi Pang. 2009. "Expression and Activity of a Probable Toxin from *Photobacterium Luminescens*." *Molecular Biology Reports* 36 (4): 785–90. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9246-z>.
- Lim, Yan-Lue, Richard J. Roberts, Robson Ee, Wai-Fong Yin, and Kok-Gan Chan. 2016. "Complete Genome Sequence and Methylome Analysis of *Aeromonas Hydrophila* Strain YL17, Isolated from a Compost Pile." *Genome Announcements* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00060-16>.
- Lin, Shin-Jen, Kai-Cheng Hsu, and Hao-Ching Wang. 2017. "Structural Insights into the Cytotoxic Mechanism of *Vibrio Parahaemolyticus* PirAvp and PirBvp Toxins." *Marine Drugs* 15 (12). <https://doi.org/10.3390/md15120373>.
- Loenen, Wil A. M., David T. F. Dryden, Elisabeth A. Raleigh, Geoffrey G. Wilson, and Noreen E. Murray. 2014. "Highlights of the DNA Cutters: A Short History of the Restriction Enzymes." *Nucleic Acids Research* 42 (1): 3–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>.
- Loenen, Wil A. M., and Elisabeth A. Raleigh. 2014. "The Other Face of Restriction: Modification-Dependent Enzymes." *Nucleic Acids Research* 42 (1): 56–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt747>.
- López-Garrido, Javier, and Josep Casadesús. 2012. "Crosstalk between Virulence Loci: Regulation of *Salmonella Enterica* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) by Products of the *Std* Fimbrial Operon." *PloS One* 7 (1): e30499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030499>.
- Machado, Ricardo A. R., Daniel Wüthrich, Peter Kuhnert, Carla C. M. Arce, Lisa Thönen, Celia Ruiz, Xi Zhang, et al. 2018. "Whole-Genome-Based Revisit of *Photobacterium* Phylogeny: Proposal for the Elevation of Most *Photobacterium* Subspecies to the Species Level and Description of One Novel Species *Photobacterium Bodei* Sp. Nov., and One Novel Subspecies *Photobacterium Laumondii* Subsp. *Clarkei* Subsp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (8): 2664–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002820>.
- Malacarne, Giulia, Urska Vrhovsek, Luca Zulini, Alessandro Cestaro, Marco Stefanini, Fulvio Mattivi, Massimo Delledonne, Riccardo Velasco, and Claudio Moser. 2011. "Resistance to *Plasmopara Viticola* in a Grapevine Segregating Population Is Associated with Stilbenoid Accumulation and with Specific Host Transcriptional Responses." *BMC Plant Biology* 11 (August): 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-114>.
- Marczynski, G. T. 1999. "Chromosome Methylation and Measurement of Faithful, Once and Only Once per Cell Cycle Chromosome Replication in *Caulobacter Crescentus*." *Journal of Bacteriology* 181 (7): 1984–93.
- Marinus, M. G., A. Poteete, and J. A. Arraj. 1984. "Correlation of DNA Adenine Methylase

- Activity with Spontaneous Mutability in Escherichia Coli K-12.” *Gene* 28 (1): 123–25.
- Marinus, Martin G. 2010. “DNA Methylation and Mutator Genes in Escherichia Coli K-12.” *Mutation Research* 705 (2): 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.05.001>.
- Marinus, Martin G., and Josep Casadesús. 2009. “Roles of DNA Adenine Methylation in Host-Pathogen Interactions: Mismatch Repair, Transcriptional Regulation, and More.” *FEMS Microbiology Reviews* 33 (3): 488–503. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00159.x>.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1977. “A New Method for Sequencing DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (2): 560–64.
- Mehling, Joanna S., Heather Lavender, and Steven Clegg. 2007. “A Dam Methylation Mutant of Klebsiella Pneumoniae Is Partially Attenuated.” *FEMS Microbiology Letters* 268 (2): 187–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00581.x>.
- Meslet-Cladiere, L. M., A. Pimenta, E. Duchaud, I. B. Holland, and M. A. Blight. 2004. “In Vivo Expression of the Mannose-Resistant Fimbriae of Photorhabdus Temperata K122 during Insect Infection.” *Journal of Bacteriology* 186 (3): 611–22. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.611-622.2004>.
- Messer, W, U Bellekes, and H Lothar. 1985. “Effect of Dam Methylation on the Activity of the E. Coli Replication Origin, oriC.” *The EMBO Journal* 4 (5): 1327–32.
- Militello, Kevin T., Alexandra H. Mandarano, Olga Varechtchouk, and Robert D. Simon. 2014. “Cytosine DNA Methylation Influences Drug Resistance in Escherichia Coli through Increased sugE Expression.” *FEMS Microbiology Letters* 350 (1): 100–106. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12299>.
- Militello, Kevin T., Robert D. Simon, Mehr Qureshi, Robert Maines, Michelle L. VanHorne, Stacy M. Hennick, Sangeeta K. Jayakar, and Sarah Pounder. 2012. “Conservation of Dcm-Mediated Cytosine DNA Methylation in Escherichia Coli.” *FEMS Microbiology Letters* 328 (1): 78–85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02482.x>.
- Minato, Yusuke, Amit Ghosh, Wyatt J. Faulkner, Erin J. Lind, Sara Schesser Bartra, Gregory V. Plano, Clayton O. Jarrett, et al. 2013. “Na⁺/H⁺ Antiport Is Essential for Yersinia Pestis Virulence.” *Infection and Immunity* 81 (9): 3163–72. <https://doi.org/10.1128/IAI.00071-13>.
- Mohapatra, Saswat S., Antonella Fioravanti, and Emanuele G. Biondi. 2014. “DNA Methylation in Caulobacter and Other Alphaproteobacteria during Cell Cycle Progression.” *Trends in Microbiology* 22 (9): 528–35. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.003>.
- Mott, Melissa L., and James M. Berger. 2007. “DNA Replication Initiation: Mechanisms and Regulation in Bacteria.” *Nature Reviews. Microbiology* 5 (5): 343–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1640>.
- Mouammine, Annabelle, Sylvie Pages, Anne Lanois, Sophie Gaudriault, Gregory Jubelin, Maurine Bonabaud, Stéphane Cruveiller, et al. 2017. “An Antimicrobial Peptide-Resistant Minor Subpopulation of Photorhabdus Luminescens Is Responsible for Virulence.” *Scientific Reports* 7: 43670. <https://doi.org/10.1038/srep43670>.
- Mulley, Geraldine, Michael L. Beeton, Paul Wilkinson, Isabella Vlisidou, Nina Ockendon-Powell, Alexia Hapeshi, Nick J. Tobias, et al. 2015. “From Insect to Man: Photorhabdus Sheds Light on the Emergence of Human Pathogenicity.” *PloS One* 10 (12): e0144937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144937>.
- Murray, Iain A., Tyson A. Clark, Richard D. Morgan, Matthew Boitano, Brian P. Anton, Khai Luong, Alexey Fomenkov, Stephen W. Turner, Jonas Korlach, and Richard J. Roberts. 2012. “The Methylomes of Six Bacteria.” *Nucleic Acids Research* 40 (22): 11450–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gks891>.

- Murray, N. E. 2000. "Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle)." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 64 (2): 412–34.
- Nielsen-LeRoux, Christina, Sophie Gaudriault, Nalini Ramarao, Didier Lereclus, and Alain Givaudan. 2012. "How the Insect Pathogen Bacteria *Bacillus Thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* Occupy Their Hosts." *Current Opinion in Microbiology* 15 (3): 220–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006>.
- Nievera, Christian, Julien J.-C. Torgue, Julia E. Grimwade, and Alan C. Leonard. 2006. "SeqA Blocking of DnaA-oriC Interactions Ensures Staged Assembly of the *E. Coli* Pre-RC." *Molecular Cell* 24 (4): 581–92. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.016>.
- Notti, Ryan Q., and C. Erec Stebbins. 2016. "The Structure and Function of Type III Secretion Systems." *Microbiology Spectrum* 4 (1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0004-2015>.
- Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and D. Low. 1993. "Regulation of Pyelonephritis-Associated Pili Phase-Variation in *Escherichia Coli*: Binding of the PapI and the Lrp Regulatory Proteins Is Controlled by DNA Methylation." *Molecular Microbiology* 7 (4): 545–53.
- O'Hanley, P., D. Lark, S. Falkow, and G. Schoolnik. 1985. "Molecular Basis of *Escherichia Coli* Colonization of the Upper Urinary Tract in BALB/c Mice. Gal-Gal Pili Immunization Prevents *Escherichia Coli* Pyelonephritis in the BALB/c Mouse Model of Human Pyelonephritis." *The Journal of Clinical Investigation* 75 (2): 347–60. <https://doi.org/10.1172/JCI111707>.
- Ooi, Steen K. T., Anne H. O'Donnell, and Timothy H. Bestor. 2009. "Mammalian Cytosine Methylation at a Glance." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 16): 2787–91. <https://doi.org/10.1242/jcs.015123>.
- Oshima, Taku, Chieko Wada, Yuya Kawagoe, Takeshi Ara, Maki Maeda, Yasushi Masuda, Sota Hiraga, and Hirotada Mori. 2002. "Genome-Wide Analysis of Deoxyadenosine Methyltransferase-Mediated Control of Gene Expression in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 45 (3): 673–95.
- Ottemann, K. M., and J. F. Miller. 1997. "Roles for Motility in Bacterial-Host Interactions." *Molecular Microbiology* 24 (6): 1109–17.
- Padan, E., N. Maisler, D. Taglicht, R. Karpel, and S. Schuldiner. 1989. "Deletion of Ant in *Escherichia Coli* Reveals Its Function in Adaptation to High Salinity and an Alternative Na⁺/H⁺ Antiporter System(s)." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (34): 20297–302.
- Parker, B. O., and M. G. Marinus. 1992. "Repair of DNA Heteroduplexes Containing Small Heterologous Sequences in *Escherichia Coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (5): 1730–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1730>.
- Pérez-Brocá, Vicente, Amparo Latorre, and Andrés Moya. 2013. "Symbionts and Pathogens: What Is the Difference?" *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 215–43. https://doi.org/10.1007/82_2011_190.
- Perona, John J. 2002. "Type II Restriction Endonucleases." *Methods (San Diego, Calif.)* 28 (3): 353–64.
- Piekarowicz, Andrzej, and Ryszard Brzeziński. 1980. "Cleavage and Methylation of DNA by the Restriction Endonuclease HinIII Isolated from *Haemophilus Influenzae* Rf." *Journal of Molecular Biology* 144 (4): 415–29. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90329-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90329-0).
- Pingoud, A., M. Fuxreiter, V. Pingoud, and W. Wende. 2005. "Type II Restriction Endonucleases: Structure and Mechanism." *Cellular and Molecular Life Sciences:*

- CMLS* 62 (6): 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4513-1>.
- Pingoud, A., and A. Jeltsch. 1997. “Recognition and Cleavage of DNA by Type-II Restriction Endonucleases.” *European Journal of Biochemistry* 246 (1): 1–22.
- Pingoud, Alfred, Geoffrey G. Wilson, and Wolfgang Wende. 2014. “Type II Restriction Endonucleases--a Historical Perspective and More.” *Nucleic Acids Research* 42 (12): 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>.
- Pinner, E., Y. Kotler, E. Padan, and S. Schuldiner. 1993. “Physiological Role of nhaB, a Specific Na⁺/H⁺ Antiporter in Escherichia Coli.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (3): 1729–34.
- Pinner, E., E. Padan, and S. Schuldiner. 1992. “Cloning, Sequencing, and Expression of the nhaB Gene, Encoding a Na⁺/H⁺ Antiporter in Escherichia Coli.” *The Journal of Biological Chemistry* 267 (16): 11064–68.
- Pirone-Davies, Cary, Maria Hoffmann, Richard J. Roberts, Tim Muruvanda, Ruth E. Timme, Errol Strain, Yan Luo, et al. 2015. “Genome-Wide Methylation Patterns in Salmonella Enterica Subsp. Enterica Serovars.” *PloS One* 10 (4): e0123639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123639>.
- Pukkila, P. J., J. Peterson, G. Herman, P. Modrich, and M. Meselson. 1983. “Effects of High Levels of DNA Adenine Methylation on Methyl-Directed Mismatch Repair in Escherichia Coli.” *Genetics* 104 (4): 571–82.
- Raetz, Christian R. H., C. Michael Reynolds, M. Stephen Trent, and Russell E. Bishop. 2007. “Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria.” *Annual Review of Biochemistry* 76: 295–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>.
- Rao, Desirazu N., David T. F. Dryden, and Shivakumara Bheemanaik. 2014. “Type III Restriction-Modification Enzymes: A Historical Perspective.” *Nucleic Acids Research* 42 (1): 45–55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt616>.
- Rauch, Tibor A., Xueyan Zhong, Xiwei Wu, Melody Wang, Kemp H. Kernstine, Zunde Wang, Arthur D. Riggs, and Gerd P. Pfeifer. 2008. “High-Resolution Mapping of DNA Hypermethylation and Hypomethylation in Lung Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (1): 252–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710735105>.
- Rauch, Tibor, Hongwei Li, Xiwei Wu, and Gerd P. Pfeifer. 2006. “MIRA-Assisted Microarray Analysis, a New Technology for the Determination of DNA Methylation Patterns, Identifies Frequent Methylation of Homeodomain-Containing Genes in Lung Cancer Cells.” *Cancer Research* 66 (16): 7939–47. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1888>.
- Robbins-Manke, Jennifer L., Zoran Z. Zdraveski, Martin Marinus, and John M. Essigmann. 2005. “Analysis of Global Gene Expression and Double-Strand-Break Formation in DNA Adenine Methyltransferase- and Mismatch Repair-Deficient Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 187 (20): 7027–37. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.7027-7037.2005>.
- Roberts, Richard J., Marlene Belfort, Timothy Bestor, Ashok S. Bhagwat, Thomas A. Bickle, Jurate Bitinaite, Robert M. Blumenthal, et al. 2003. “A Nomenclature for Restriction Enzymes, DNA Methyltransferases, Homing Endonucleases and Their Genes.” *Nucleic Acids Research* 31 (7): 1805–12.
- Roberts, Richard J., Tamas Vincze, Janos Posfai, and Dana Macelis. 2010. “REBASE--a Database for DNA Restriction and Modification: Enzymes, Genes and Genomes.” *Nucleic Acids Research* 38 (Database issue): D234–236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp874>.
- Robinson, Victoria L., Petra C. F. Oyston, and Richard W. Titball. 2005. “A Dam Mutant of

- Yersinia Pestis Is Attenuated and Induces Protection against Plague.” *FEMS Microbiology Letters* 252 (2): 251–56. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.001>.
- Rodou, Athina, Dennis O. Ankrah, and Christos Stathopoulos. 2010. “Toxins and Secretion Systems of *Photobacterium luminescens*.” *Toxins* 2 (6): 1250–64. <https://doi.org/10.3390/toxins2061250>.
- Ronaghi, M., M. Uhlén, and P. Nyren. 1998. “A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate.” *Science (New York, N.Y.)* 281 (5375): 363, 365.
- Schell, M. A. 1993. “Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators.” *Annual Review of Microbiology* 47: 597–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.003121>.
- Schubert, Rachel A., Ian B. Dodd, J. Barry Egan, and Keith E. Shearwin. 2007. “Cro’s Role in the CI–Cro Bistable Switch Is Critical for λ ’s Transition from Lysogeny to Lytic Development.” *Genes & Development* 21 (19): 2461–72. <https://doi.org/10.1101/gad.1584907>.
- Schumacher, Axel, Philipp Kapranov, Zachary Kaminsky, James Flanagan, Abbas Assadzadeh, Patrick Yau, Carl Virtanen, et al. 2006. “Microarray-Based DNA Methylation Profiling: Technology and Applications.” *Nucleic Acids Research* 34 (2): 528–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj461>.
- Schwarz, Sandra, Rachel D. Hood, and Joseph D. Mougous. 2010. “What Is Type VI Secretion Doing in All Those Bugs?” *Trends in Microbiology* 18 (12): 531–37. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.001>.
- Sela, Itamar, Haim Ashkenazy, Kazutaka Katoh, and Tal Pupko. 2015. “GUIDANCE2: Accurate Detection of Unreliable Alignment Regions Accounting for the Uncertainty of Multiple Parameters.” *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W7–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv318>.
- Seong, Hoon Je, Hye-Jee Park, Eunji Hong, Sung Chul Lee, Woo Jun Sul, and Sang-Wook Han. 2016. “Methylome Analysis of Two *Xanthomonas* Spp. Using Single-Molecule Real-Time Sequencing.” *The Plant Pathology Journal* 32 (6): 500–507. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.10.2016.0216>.
- Sheets, Joel, and Klaus Aktories. 2017. “Insecticidal Toxin Complexes from *Photobacterium luminescens*.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 402: 3–23. https://doi.org/10.1007/82_2016_55.
- Sheets, Joel J., Tim D. Hey, Kristin J. Fencil, Stephanie L. Burton, Weiting Ni, Alexander E. Lang, Roland Benz, and Klaus Aktories. 2011. “Insecticidal Toxin Complex Proteins from *Xenorhabdus Nematophilus*: Structure and Pore Formation.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (26): 22742–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227009>.
- Sicard, Mathieu, Karine Brugirard-Ricaud, Sylvie Pagès, Anne Lanois, Noel E. Boemare, Michel Brehélin, and Alain Givaudan. 2004. “Stages of Infection during the Tripartite Interaction between *Xenorhabdus Nematophila*, Its Nematode Vector, and Insect Hosts.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6473–80. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004>.
- Slater, S., S. Wold, M. Lu, E. Boye, K. Skarstad, and N. Kleckner. 1995. “E. Coli SeqA Protein Binds oriC in Two Different Methyl-Modulated Reactions Appropriate to Its Roles in DNA Replication Initiation and Origin Sequestration.” *Cell* 82 (6): 927–36.
- Smigielski, Adam J., Raymond J. Akhurst, and Noël E. Boemare. 1994. “Phase Variation in *Xenorhabdus Nematophilus* and *Photobacterium luminescens*: Differences in Respiratory Activity and Membrane Energization.” *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 120–25.
- Smith, D. W., T. W. Yee, C. Baird, and V. Krishnapillai. 1991. “Pseudomonad Replication Origins: A Paradigm for Bacterial Origins?” *Molecular Microbiology* 5 (11): 2581–87.

- Somvanshi, Vishal S., Bettina Kaufmann-Daszczuk, Kwi-Suk Kim, Shane Mallon, and Todd A. Ciche. 2010. "Photorhabdus Phase Variants Express a Novel Fimbrial Locus, Mad, Essential for Symbiosis." *Molecular Microbiology* 77 (4): 1021–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07270.x>.
- Somvanshi, Vishal S., Rudolph E. Sloup, Jason M. Crawford, Alexander R. Martin, Anthony J. Heidt, Kwi-suk Kim, Jon Clardy, and Todd A. Ciche. 2012. "A Single Promoter Inversion Switches Photorhabdus between Pathogenic and Mutualistic States." *Science (New York, N.Y.)* 337 (6090): 88–93. <https://doi.org/10.1126/science.1216641>.
- Soto, G. E., and S. J. Hultgren. 1999. "Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly." *Journal of Bacteriology* 181 (4): 1059–71.
- Srimanote, Potjanee, Adrienne W. Paton, and James C. Paton. 2002. "Characterization of a Novel Type IV Pilus Locus Encoded on the Large Plasmid of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic Escherichia Coli Strains That Are Virulent for Humans." *Infection and Immunity* 70 (6): 3094–3100. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3094-3100.2002>.
- Stephenson, Stacy Ann-Marie, and Paul D. Brown. 2016. "Epigenetic Influence of Dam Methylation on Gene Expression and Attachment in Uropathogenic Escherichia Coli." *Frontiers in Public Health* 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00131>.
- Störl, H. J., H. Simon, and H. Barthelmes. 1979. "Immunochemical Detection of N6-Methyladenine in DNA." *Biochimica Et Biophysica Acta* 564 (1): 23–30.
- Taylor, Victoria L., Richard W. Titball, and Petra C. F. Oyston. 2005. "Oral Immunization with a Dam Mutant of Yersinia Pseudotuberculosis Protects against Plague." *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 6): 1919–26. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27959-0>.
- Titheradge, Annette J. B., Jonathan King, Ryu, and Noreen E. Murray. 2001. "Families of Restriction Enzymes: An Analysis Prompted by Molecular and Genetic Data for Type ID Restriction and Modification Systems." *Nucleic Acids Research* 29 (20): 4195–4205.
- Tobias, Nicholas J., Bagdevi Mishra, Deepak K. Gupta, Rahul Sharma, Marco Thines, Timothy P. Stinear, and Helge B. Bode. 2016. "Genome Comparisons Provide Insights into the Role of Secondary Metabolites in the Pathogenic Phase of the Photorhabdus Life Cycle." *BMC Genomics* 17 (1): 537. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2862-4>.
- Torreblanca, J., and J. Casadesús. 1996. "DNA Adenine Methylase Mutants of Salmonella Typhimurium and a Novel Dam-Regulated Locus." *Genetics* 144 (1): 15–26.
- Turlin, Evelyne, Géraldine Pascal, Jean-Claude Rousselle, Pascal Lenormand, Saravuth Ngo, Antoine Danchin, and Sylviane Derzelle. 2006. "Proteome Analysis of the Phenotypic Variation Process in Photorhabdus Luminescens." *Proteomics* 6 (9): 2705–25. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500646>.
- Wang, null, and null Gaugler. 1998. "Host and Penetration Site Location by Entomopathogenic Nematodes against Japanese Beetle Larvae." *Journal of Invertebrate Pathology* 72 (3): 313–18.
- Wang, T C, and K C Smith. 1986. "Inviability of Dam recA and Dam recB Cells of Escherichia Coli Is Correlated with Their Inability to Repair DNA Double-Strand Breaks Produced by Mismatch Repair." *Journal of Bacteriology* 165 (3): 1023–25.
- Waterfield, N., M. Hares, G. Yang, A. Dowling, and R. ffrench-Constant. 2005. "Potentiation and Cellular Phenotypes of the Insecticidal Toxin Complexes of Photorhabdus Bacteria." *Cellular Microbiology* 7 (3): 373–82. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00467.x>.
- Waterfield, Nicholas, Shizuo George Kamita, Bruce D. Hammock, and Richard ffrench-

- Constant. 2005. "The Photorhabdus Pir Toxins Are Similar to a Developmentally Regulated Insect Protein but Show No Juvenile Hormone Esterase Activity." *FEMS Microbiology Letters* 245 (1): 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.018>.
- Waterfield, Nicholas R., Phillip J. Daborn, and Richard H. ffrench-Constant. 2002. "Genomic Islands in Photorhabdus." *Trends in Microbiology* 10 (12): 541–45.
- Waterfield, Nicholas R., Phillip J. Daborn, Andrea J. Dowling, Guowei Yang, Michelle Hares, and Richard H. ffrench-Constant. 2003. "The Insecticidal Toxin Makes Caterpillars Floppy 2 (Mcf2) Shows Similarity to HrmA, an Avirulence Protein from a Plant Pathogen." *FEMS Microbiology Letters* 229 (2): 265–70.
- Waters, Lauren S., and Gisela Storz. 2009. "Regulatory RNAs in Bacteria." *Cell* 136 (4): 615–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>.
- Watson, Michael E., Justin Jarisch, and Arnold L. Smith. 2004. "Inactivation of Deoxyadenosine Methyltransferase (Dam) Attenuates Haemophilus Influenzae Virulence." *Molecular Microbiology* 53 (2): 651–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04140.x>.
- Watson, Robert J., Susan A. Joyce, Georgette V. Spencer, and David J. Clarke. 2005. "The exbD Gene of Photorhabdus Temperata Is Required for Full Virulence in Insects and Symbiosis with the Nematode Heterorhabditis." *Molecular Microbiology* 56 (3): 763–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04574.x>.
- Weber, Michael, Jonathan J. Davies, David Wittig, Edward J. Oakeley, Michael Haase, Wan L. Lam, and Dirk Schübeler. 2005. "Chromosome-Wide and Promoter-Specific Analyses Identify Sites of Differential DNA Methylation in Normal and Transformed Human Cells." *Nature Genetics* 37 (8): 853–62. <https://doi.org/10.1038/ng1598>.
- Welsh, K. M., A. L. Lu, S. Clark, and P. Modrich. 1987. "Isolation and Characterization of the Escherichia Coli mutH Gene Product." *The Journal of Biological Chemistry* 262 (32): 15624–29.
- Whitfield, Chris, and M. Stephen Trent. 2014. "Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides." *Annual Review of Biochemistry* 83: 99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>.
- Wibberg, Daniel, Andreas Bremges, Tanja Dammann-Kalinowski, Irena Maus, M^a Isabel Igeño, Ralph Vogelsang, Christoph König, et al. 2016. "Finished Genome Sequence and Methylome of the Cyanide-Degrading Pseudomonas Pseudoalcaligenes Strain CECT5344 as Resolved by Single-Molecule Real-Time Sequencing." *Journal of Biotechnology, Bioinformatics for Biotechnology and Biomedicine*, 232 (August): 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.008>.
- Wion, Didier, and Josep Casadesús. 2006. "N⁶-Methyl-Adenine: An Epigenetic Signal for DNA-Protein Interactions." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (3): 183–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1350>.
- Woude, M. van der, B. Braaten, and D. Low. 1996. "Epigenetic Phase Variation of the Pap Operon in Escherichia Coli." *Trends in Microbiology* 4 (1): 5–9.
- Wu, H., J. E. Lippmann, J. P. Oza, M. Zeng, P. Fives-Taylor, and N. O. Reich. 2006. "Inactivation of DNA Adenine Methyltransferase Alters Virulence Factors in Actinobacillus Actinomycetemcomitans." *Oral Microbiology and Immunology* 21 (4): 238–44. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00284.x>.
- Xi, Yuanxin, and Wei Li. 2009. "BSMAP: Whole Genome Bisulfite Sequence MAPping Program." *BMC Bioinformatics* 10 (July): 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-232>.
- Yan, P. S., M. R. Perry, D. E. Laux, A. L. Asare, C. W. Caldwell, and T. H. Huang. 2000. "CpG Island Arrays: An Application toward Deciphering Epigenetic Signatures of Breast Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

- Association for Cancer Research* 6 (4): 1432–38.
- Yang, G., A. J. Dowling, U. Gerike, R. H. French-Constant, and N. R. Waterfield. 2006. “Photographable Virulence Cassettes Confer Injectable Insecticidal Activity against the Wax Moth.” *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2254–61. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006>.
- Zhang, Guoqiang, Wenzhao Wang, Aihua Deng, Zhaopeng Sun, Yun Zhang, Yong Liang, Yongsheng Che, and Tingyi Wen. 2012. “A Mimicking-of-DNA-Methylation-Patterns Pipeline for Overcoming the Restriction Barrier of Bacteria.” *PLoS Genetics* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002987>.
- Zhang, Xiaoyu, Junshi Yazaki, Ambika Sundaresan, Shawn Cokus, Simon W.-L. Chan, Huaming Chen, Ian R. Henderson, et al. 2006. “Genome-Wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis.” *Cell* 126 (6): 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.003>.
- Zumbühl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann. 1999. “The Cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* Induces Modification and Cellular Redistribution of the Small GTP-Binding Protein RhoA.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (41): 29289–93.
- Zweiger, G., G. Marczynski, and L. Shapiro. 1994. “A *Caulobacter* DNA Methyltransferase That Functions Only in the Predivisional Cell.” *Journal of Molecular Biology* 235 (2): 472–85. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1007>.

