



**HAL**  
open science

# Etude de l'hélicase ComM dans le recombinaison homologue chez *Helicobacter pylori*

Mérick Machouri

► **To cite this version:**

Mérick Machouri. Etude de l'hélicase ComM dans le recombinaison homologue chez *Helicobacter pylori*. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL001 . tel-04047049

**HAL Id: tel-04047049**

**<https://theses.hal.science/tel-04047049v1>**

Submitted on 27 Mar 2023

**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.

# Étude de l'hélicase ComM dans la recombinaison homologue chez *Helicobacter pylori*

*Study of the ComM helicase in the homologous recombination in  
Helicobacter pylori*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Microbiologie  
Graduate School: Life Sciences and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **SGCSR (Université Paris-Saclay, Inserm, CEA)**, sous la direction de **Pablo Radicella**, Directeur de recherche, le co-encadrement de **Anne-Marie Di-Guilmi**, Chercheuse

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 10 janvier 2023, par

**Mérick Machouri**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Stéphanie BURY-MONE</b> Professeure des universités, université Paris-Saclay	Présidente
<b>Nathalie CAMPO</b> Chargée de recherche, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteuse & examinatrice
<b>Ivan MATIC</b> Directeur de recherche, Institut Cochin	Rapporteur & examinateur
<b>Hilde DE REUSE</b> Directrice de recherche, Institut Pasteur, Paris	Examinatrice



# Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour bien avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse : Nathalie Campo et Ivan Matic pour avoir accepté d'être rapporteurs, Hilde De Reuse et Stéphanie Bury-Mone pour avoir accepté d'être examinatrices.

Je remercie également Pablo, pour m'avoir accepté et permis de réaliser cette thèse au sein du LRIG et pour m'avoir suivi tout du long. Un grand merci à Anne Marie, pour son accompagnement, son travail et sa bienveillance avec moi. Merci à tous les membres, présents et anciens, du LRIG pour leur accueil et leur bonne humeur et tout particulièrement à Sumedha et Céline pour les moments passés ensemble et les rigolades, pour leur gentillesse et leur positivité.

Un merci particulier à Isaline, pour son amitié et son soutien depuis le début, pour toutes les discussions, fous rires et verres pris ensemble.

Merci à Marie, qui m'a soutenu et poussé pendant ces derniers moments de thèse.

Merci aux étudiants de la pause clope, sans qui les journées n'auraient pas été les mêmes. A Pauline et Cathy pour les moments passés ensemble et les rires, à Clémentine pour l'Ecosse et à Eléa pour les papotages.

Je voudrais également remercier Hilde, Stéphanie et Laurent pour leur suivi durant ma thèse et les discussions intéressantes que nous avons pu avoir.

Un grand merci à ma famille et à mes amis qui ont été présent au cours de cette aventure.



# Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières .....	5
Table des figures.....	9
Résumé .....	12
Liste des abréviations .....	14
Chapitre I : Introduction générale .....	15
Partie 1 : <i>Helicobacter pylori</i> , un pathogène humain.....	17
1 Les caractéristiques générales d' <i>H. pylori</i> .....	17
1.1 Histoire de <i>H. pylori</i> .....	17
1.2 Bactériologie .....	18
1.2.1 Morphologie et conditions de culture.....	18
1.3 Épidémiologie et pathologies .....	18
1.3.1 Facteurs de virulence.....	20
1.4 Diversité génétique.....	22
1.4.1 Génération de nouveaux allèles .....	23
1.4.2 Transferts horizontaux de gènes .....	23
Partie 2 : La transformation bactérienne .....	26
1 La transformation bactérienne.....	26
1.1 La découverte de la transformation bactérienne.....	26
1.2 Rôle de la transformation .....	27
2 Les étapes de la transformation .....	29
2.1 Principe de la transformation .....	30
2.2 Induction de la compétence .....	32

2.3	Capture de l'ADN .....	33
2.4	Internalisation de l'ADN.....	35
2.5	Transport de l'ADN chez les bactéries compétentes.....	35
2.6	La recombinaison homologue .....	37
Partie 3 : La transformation chez <i>Helicobacter pylori</i> .....		40
1	L'état de compétence .....	40
2	Capture de l'ADN .....	41
3	Internalisation de l'ADNt dans le périplasme.....	41
4	Le transport de l'ADNt à travers la membrane interne .....	43
Projet de thèse .....		45
Partie 4 : La recombinaison homologue lors de la transformation naturelle chez <i>H. pylori</i> .....		47
Partie 5 : Les ATPases impliquées dans le système de sécrétion de type IV ComB chez <i>H. pylori</i> .....		50
Chapitre II : Résultats.....		55
1	ComM, une hélicase importante pour la transformation naturelle.....	57
1.1	Introduction de l'article .....	57
1.2	Article.....	57
1.3	Une nucléase YraN en lien avec ComM.....	79
1.4	ComM interagit avec DprA .....	79
1.5	Conclusion.....	86
2	Le rôle de HP1421 chez <i>H. pylori</i> .....	86
Chapitre III : Discussion et perspectives .....		90
Matériels et méthodes .....		97
2.1	Cultures bactériennes.....	97
2.1.1	Culture sur milieu solide de <i>H. pylori</i> .....	97

2.1.2	Cultures de <i>Escherichia coli</i> .....	97
2.2	Construction des souches de <i>H. pylori</i> modifiées.....	97
2.2.1	Réaction d'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)	98
2.2.2	Méthode SLIC de clonages de gènes .....	98
2.2.3	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> .....	99
2.2.4	Transformation de <i>H. pylori</i> pour la construction des souches mutantes	100
2.3	Mesure de l'efficacité de transformation de souches <i>H. pylori</i> .....	100
	Référence bibliographique .....	108





# Table des figures

Figure 1 Pathologies gastro-intestinales induites par l'infection de <i>H. pylori</i> . Extrait de (Ferrand, 2009; Konturek et al., 2006).....	20
Figure 2 Les trois mécanismes de transfert horizontaux de gènes : la transformation, la conjugaison et la transduction. Voir texte. Extrait de (Burmeister, 2015) .....	24
Figure 3 potential benefits of natural competence mediated DNA uptake in bacteria. Extrait de (Blokesch, 2016).....	29
Figure 4 Les 4 grandes étapes de la transformation naturelle : la capture de l'ADN, l'internalisation, le transport et la recombinaison homologue. Modèle basé sur la structure d'une bactérie à Gram négative.....	30
Figure 5 Modèle générale du processus de transformation naturelle chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, voir texte. Extraite de (Johnston et al., 2014a). .....	31
Figure 6 Rôle de DprA lors de la transformation naturelle. Extrait de (Mortier-Barrière et al., 2007).....	38
Figure 7 Modèle proposé pour le rôle de ComH. Extrait de (Damke et al., 2019).....	42
Figure 8 Comparaison des structures linéaires de DprA chez <i>R. anatipestifer</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> et <i>H. pylori</i> . Extrait de (Huang et al., 2019) .....	49
Figure 9 Modèle général des T4SS. Extrait de (Grohmann et al., 2018) .....	50
Figure 10 Comparaison des système Cag et ComB chez <i>H. pylori</i> (opéron extrait de (Fischer et al., 2020)).....	51
Figure 11 Taux de transformation naturelle chez le mutant <i>yraN</i> .....	79
Figure 12 Modèle de surface d'intetaction entre ComM (vert) et DprA (bleu) réalisé par AlphaFold. Un zoom est réalisé sur la zone d'interaction avec les résidus mutés mis en évidence (en vert pour ComM et bleu pour DprA). .....	84
Figure 13 Taux de transformation naturelle chez les mutants ComM et DprA modifiant l'interaction entre ces deux protéines. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. P-value<0.05.....	85
Figure 14 Taux de transformation naturelle chez le mutant <i>hp1421</i> . Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. P-value<0.05.....	87

Tableau 1 : Les principaux organismes modèles d'étude pour la transformation naturelle. Extrait de (Blokesch, 2016) .....	27
Tableau 2 Interaction entre les protéines ComM et DprA par double hybride bactérien. ....	80
Tableau 3 Liste des mutations proposées pour inhiber l'interaction entre ComM et DprA d'après le premier modèle de surface d'interaction .....	81
Tableau 4 Effet des mutations de comM et dprA sur leur interaction par double hybride bactérien .....	82
Tableau 5 Liste des souches utilisées .....	102



# Résumé

La transformation naturelle joue un rôle clé dans l'importante plasticité génomique de la bactérie à Gram-négatif *Helicobacter pylori*. Ce pathogène humain, qui infecte l'estomac de la moitié de la population, est à l'origine de nombreuses pathologies, telles que des gastrites, les ulcères et des cancers. Le transfert horizontal de gènes à travers la transformation naturelle est considéré comme un contributeur majeur à la propagation de résistances aux antibiotiques observée actuellement dans les infections par *H. pylori*. Chez *H. pylori* la capture et l'internalisation de l'ADN présentent des caractéristiques uniques. Certains des acteurs conservés dans la plupart des bactéries compétentes sont absents chez *H. pylori* alors que de nouvelles protéines impliquées dans la transformation y ont été identifiées. Parmi elles, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux candidates que nous avons découvertes comme essentielles pour la transformation. La majeure partie du travail de thèse se concentre sur HP0792, un homologue de ComM, une protéine présente chez les Gram négatifs. ComM est une hélicase jouant un rôle dans la recombinaison homologue lors de la transformation naturelle. Par des approches génétiques et biochimiques, nous avons identifié deux fonctions de cette protéine chez *H. pylori*, dans la transformation naturelle et dans la recombinaison intra-génomique. Une délétion de *comM* entraîne une diminution de la transformation par un ADN portant une mutation ponctuelle (StrepR) d'un facteur 200 et d'un facteur similaire lors de l'intégration d'un ADN possédant 842 bp hétérologues. De plus, nous avons mis en évidence que ComM n'a pas d'impact sur la taille d'ADNt inséré dans le génome. Ces résultats diffèrent des études publiées sur ComM chez *Vibrio cholerae* et *Acinetobacter baylyi*. Nous avons également mis en évidence par double hybride bactérien une interaction avec DprA et nous avons exploré les interactions de surface entre ces deux protéines. En parallèle, nous avons découvert un second rôle à ComM qui intervient dans la recombinaison de séquences répétées dans le génome. La seconde partie, mineure, explore le rôle de HP1421, une ATPase impliquée dans les premières étapes de la transformation naturelle chez *H. pylori* et potentiellement liée au système de sécrétion de type IV ComB.

# Abstract

Natural transformation plays a major role in establishing the amazing genomic plasticity of *Helicobacter pylori*, a Gram-negative bacterium that infects the stomach of half of the human population and is at the origin of multiple pathologies including gastritis, ulcers and cancer. Horizontal gene transfer through natural transformation is thought to be a major contributor for the increase in antibiotic resistant strains observed in *H. pylori* infections. In this project, we will address some of the unique characteristics of the natural transformation mechanisms used by this human pathogen. Whilst many of the players in natural transformation are conserved among naturally competent bacteria, other components are absent in *H. pylori*. Furthermore, some seem to be unique for this pathogen. We focused our attention on two of those proteins that we have shown to be essential for transformation. The main part of this thesis aims at characterizing the role of HP0792, which is a homologue of ComM, a protein conserved in Gram-negative bacteria. ComM is a helicase potentially involved in the homologous recombination during natural transformation. Our project combined genetics and biochemical approaches to identify two functions for ComM, in natural transformation and in intragenomic recombination. A *comM* deletion leads to a 200-fold reduction of the natural transformation rate when inserting a point mutation (StrepR). A similar reduction of the transformation rate is observed when integrating an 842 bp heterologous region. Moreover, we show that ComM is not involved in defining the length of tDNA inserted in the genome. Interestingly, these results are different from what was reported for *Vibrio cholera* and *Acinetobacter baylyi* in the literature. By bacterial two hybrid, we have also unveiled an interaction between ComM and DprA and have explored the surface interaction between the two proteins. In parallel, we discovered a new role for ComM in the recombination of genomic repeats. The second part addresses the role of HP1421, an ATPase involved in the first steps of the natural transformation in *H. pylori* and potentially associated with the ComB Type IV secretion system.

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ADNt : ADN de transfert

BHI : Brain heart infusion

LPS : lipopolysaccharides

CagA : cytotoxin-associated antigen A

RAPD : random amplification of polymorphic DNA

MMR : Mismatch repair

THG : transfert horizontal de gènes

T4SS : Type IV secretion system : système de sécrétion de type 4

ADR : Alternate DNaseI Resistant

DprA : DNA processing protein A

T4P : Type IV pili : pili de type IV

DUS : DNA uptake sequence

OBD : oligonucleotide binding fold

RF : Rossmann fold

D-loop : Displacement loop

HhH : helix-hairpin-helix

SAM : sterile alpha motif

SLIC : sequence and ligation independent cloning

PCR : Polymeras Chain Reaction

ONPG : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside

# Chapitre I : Introduction générale





# Partie 1 : *Helicobacter pylori*, un pathogène humain

## 1 Les caractéristiques générales d'*H. pylori*

### 1.1 Histoire de *H. pylori*

L'histoire d'*H. pylori* commence en 1875 lorsque G. Bottcher et M. Letulle observent une bactérie dans l'estomac de patients souffrant d'ulcères (Kidd & Modlin, 1998). Bien que la majorité de la communauté scientifique ne soit pas convaincue du lien entre cette bactérie et la présence d'ulcères, J.R Warren identifie cette dernière sous le nom de *Campylobacter pyloridis* en 1984 (Marshall et al., 1984). La même année, B.J Marshall parvient à la cultiver à partir d'ulcère d'un patient (Kidd & Modlin, 1998). Une année plus tard, et afin de prouver le 3<sup>e</sup> postulat de Koch, Marshall s'inocule une suspension bactérienne de *C. pyloridis* puis développe peu de temps plus tard une gastrite. Cette expérience risquée prouve ainsi le lien entre une infection par *C. pyloridis* et l'apparition de la gastrite (Marshall et al., 1985). Cette bactérie a été initialement placée dans le genre *Campylobacter*, mais en 1989 une étude montre qu'elle n'appartient pas à ce groupe bactérien. Un nouveau genre *Helicobacter* est donc créé (le nom venant de sa forme hélicoïdale) et cette bactérie est renommée *Helicobacter pylori* (Goodwin et al., 1989). A cette période, la communauté médicale reste toujours divisée sur la relation entre *H. pylori* et des pathologies gastriques. Ce n'est qu'en 1994 que le *National Institute of Health* américain recommande de considérer *H. pylori* comme cause d'ulcère duodénal et que l'International Agency for Research on Cancer (IARC) de l'Organisation mondiale de la santé classe *H. pylori* comme carcinogène du groupe I (Fauchère, 2017). En 2005, J.R Warren et B.J Marshall reçoivent le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leur découverte d'*H. pylori* et son lien avec l'ulcère de l'estomac.

## 1.2 Bactériologie

### 1.2.1 Morphologie et conditions de culture

*Helicobacter pylori* est une bactérie à Gram négatif qui colonise la muqueuse gastrique chez l'homme. Elle mesure entre 0.5 et 1.0  $\mu\text{m}$  de largeur pour 2.5 à 4  $\mu\text{m}$  de longueur, possède une forme hélicoïdale et présente entre quatre et six flagelles à un de ses pôles. Cette bactérie a une déficience dans la voie de biosynthèse de certains acides aminés (F, H, I, L, M, R, V) (Yu et al., 2009), ce qui nécessite de la cultiver en milieu riche au laboratoire. Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer les conditions de culture optimales pour *H. pylori* (Jiang & Doyle, 2000; Buck & Smith, 1987; Goodwin et al., 1985). Classiquement, les milieux gélosés utilisés sont Brucella ou Blood Agar complétés avec du sang et les milieux liquides sont Brucella Broth ou Brain Heart Infusion broth (BHI) complétés avec du sérum. En culture, sur milieu solide ou liquide, elle peut perdre sa forme spiralée pour une forme plus en bâtonnet et peut aussi présenter des flagelles anormaux, en plus faible nombre ou complètement absents (Goodwin & Armstrong, 1990). Face aux stress (thermique, manque de nutriments etc ...) *H. pylori* peut également être retrouvée sous une forme de survie dite coccoïde (Cellini, 2014; Saito et al., 2003). En effet, *H. pylori* est capable de changer de forme et de se mettre dans un état inactif, c'est-à-dire avec une activité métabolique minimale mais tout en gardant ses facteurs de virulence actifs. Lorsque les conditions environnementales sont plus favorables, *H. pylori* est capable de retrouver sa forme originelle et son activité métabolique (Krzyżek & Grande, 2020).

## 1.3 Épidémiologie et pathologies

La niche principale d'*H. pylori* est l'estomac humain mais elle peut également être retrouvée chez quelques primates ou chez des chats domestiques (Cave, 1997). En revanche, il semble peu probable que ces animaux participent à l'infection humaine (Bode et al., 1998; Dubois et al., 1996). Les principaux modes de transmission retrouvés sont oro-oral, gastro-oral ou fécale orale (Stefano et al., 2018). Lorsqu'elle est présente dans l'estomac, elle est dominante par rapport aux autres espèces (Bik et al., 2006) et est majoritairement acquise lors des premières années de vie dans un contexte familial (Wizla-Derambure et al., 2001). Il a même été montré que certaines personnes infectées par *H. pylori* peuvent posséder

plusieurs souches dans l'estomac (Enroth, Björkholm & Engstrand, 1999). La transmission d'*H. pylori* peut de ce fait s'expliquer par des facteurs socioéconomiques comme l'accès à l'eau potable ou le système de santé en place (Guevara & Cogdill, 2020). Au niveau mondial, même si la prévalence est très hétérogène, on peut observer qu'elle est plus importante dans les pays en développement. En 2015, la prévalence d'*H. pylori* était d'environ 24% en Océanie contre 79% en Afrique, avec une moyenne mondiale à 60% (Hooi et al., 2017).

Concernant les gastrites induites par infection chronique par cette bactérie, elles sont dans la grande majorité des cas (85%) asymptomatiques, l'estomac présente une acidité normale et sans atrophie. Dans 5% des cas, *H. pylori* engendre une gastrite symptomatique au niveau de l'antrum de l'estomac avec une augmentation de l'acidité et peut se transformer en ulcère duodénal. Enfin, dans 10% des cas, la gastrite se développe au niveau du corps de l'estomac et peut évoluer en ulcère gastrique ou encore, dans une plus faible proportion, en cancer.c (Figure 1). *H. pylori* est considérée comme une des principales causes de l'oncogenèse gastrique (Jonaitis, Pellicano & Kupcinskis, 2018; Konturek et al., 2006). Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer de l'estomac est le 4<sup>e</sup> plus fréquent chez l'homme et le 7<sup>e</sup> chez la femme (Bray et al., 2018). En France, le nombre estimé de décès par cancer de l'estomac était de 4 272 en 2018 et en 2020, une estimation de 769 000 décès dans le monde a été relevé (Santé publique France).

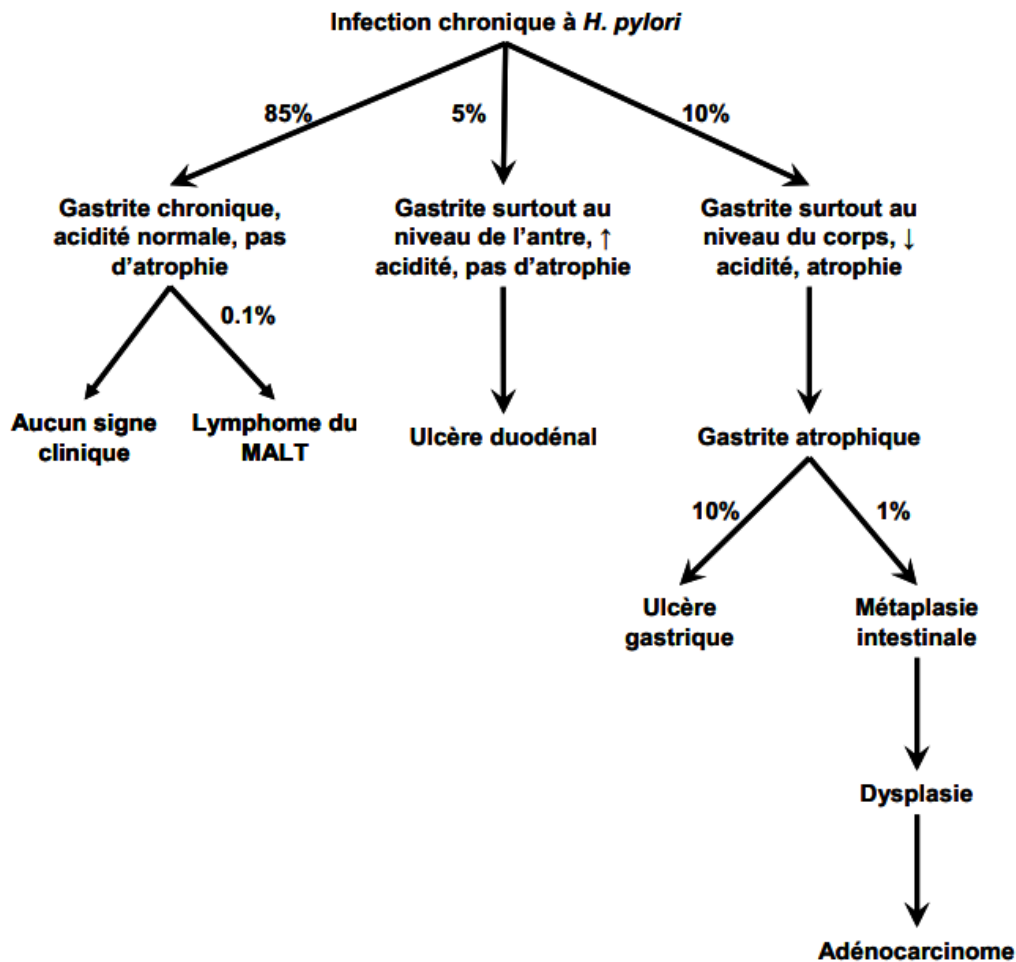


Figure 1 Pathologies gastro-intestinales induites par l'infection de *H. pylori*. Extrait de (Ferrand, 2009; Konturek et al., 2006)

### 1.3.1 Facteurs de virulence

Afin de coloniser et de se développer dans l'estomac, *H. pylori* possède un panel de facteurs de virulence lui permettant de faire face aux différentes barrières chimiques (acidité), physiques (le mucus) et biologiques (système immunitaire). Pour passer la première barrière chimique, *H. pylori* possède une uréase lui permettant de dégrader l'urée en ammoniac dans le but de neutraliser l'acidité de son environnement (Smoot et al., 1990; Labigne, Cussac & Courcoux, 1991). L'ammoniac est toxique pour les cellules épithéliales et permet de créer des dommages sur celles-ci. Pour franchir la barrière physique, *H. pylori* possède, comme décrit précédemment, des flagelles lui permettant de se mouvoir au sein de l'estomac et du mucus. De cette manière, elle est capable d'atteindre la lumière de l'estomac, puis le mucus et enfin les cellules épithéliales où le pH est neutre (O'Toole, Lane & Porwollik, 2000). Et enfin, pour

contrer la troisième barrière se présentant à elle, *H. pylori* possède au niveau de ses lipopolysaccharides (LPS) des antigènes sanguins de Lewis X et Y. Ces antigènes sont identiques à ceux présents sur les cellules épithéliales gastriques lui permettant donc d'échapper en partie au système immunitaire (Appelmek et al., 1997). En parallèle, le système immunitaire peut également reconnaître *H. pylori* et/ou son LPS ce qui entraîne la sécrétion d'anticorps contre les antigènes de Lewis X ou Y. Ces antigènes étant similaires à ceux présents sur les cellules épithéliales gastriques, les anticorps sécrétés vont également cibler ces cellules, créant une réaction auto-immune et dégradant les cellules de la muqueuse (Appelmek et al., 1998). En plus de ces différents facteurs de virulence permettant à *H. pylori* de s'adapter et de persister dans son environnement, elle possède des phospholipases, alcool-déshydrogénase ou des protéases qui sont sécrétées et produisent des substances toxiques pour les cellules ou dégradent des composants des cellules elles-mêmes (Nilius & Malfertheiner, 1996). Les dommages causés à la muqueuse gastrique vont être une des causes de gastrites et d'ulcères (Konturek et al., 2006; Nilius & Malfertheiner, 1996). Il est difficile de déterminer exactement quel est le mécanisme permettant le développement ce cancer mais plusieurs raisons sont proposées. La production de radicaux libres, augmentant les risques de mutations des cellules épithéliales ou encore l'altération des protéines des cellules hôtes entraînant une inflammation et la production de TNF-alpha et d'IL-6. (Servetas, Bridge & Merrell, 2016; Zoaiter et al., 2021; Thalmaier et al., 2002).

CagA (cytotoxin-associated antigen A) est le principal facteur de virulence d'*H. pylori* et le plus étudié. Originellement, la protéine CagA a été découverte comme un agent hautement immunogène. Les infections chroniques par *H. pylori cagA+* sont associées au cancer gastrique (Azuma et al., 2004). C'est une protéine de 120 à 140 kDa qui ne possède d'homologie avec aucune autre protéine connue (Backert et al., 2017). CagA est injectée dans les cellules hôtes grâce à un T4SS, codé par un îlot de pathogénicité appelé CagPAI. Après translocation dans les cellules, il a été montré que CagA peut interagir avec 25 facteurs de signalisation. De cette façon, CagA détourne un certain nombre de voies de signalisation dont la prolifération, l'adhésion, la polarité cellulaire ou encore la voie anti-apoptotique. Lorsque CagA est phosphorylée, elle se lie et active SHP2, une oncoprotéine, dérégulant la prolifération cellulaire entre autres. Il est intéressant de noter qu'à travers plusieurs études d'infections, il

a été prouvé que l'expression de CagA seule pouvait jouer le rôle d'oncogène bactérien dans des cellules hôtes (Hatakeyama, 2004; Backert et al., 2017; Fischer et al., 2001).

#### 1.4 Diversité génétique

Un ensemble d'études ont été réalisées afin de mieux comprendre la diversité génétique d'*H. pylori*. Pour réaliser ceci, un panel de méthodes a été utilisé afin de l'étudier tel que : random amplification of polymorphic DNA (RAPD), fingerprinting, multilocus enzyme electrophoresis ou cartographie génétique par électrophorèse à champ pulsé (Akopyanz et al., 1992; Go et al., 1996; Jiang, Hiratsuka & Taylor, 1996). Le point qui ressort de ces études est la très grande diversité génétique de *H. pylori*, lui permettant son adaptation dans la muqueuse gastrique des différents individus (Marais *et al.*, 1999). Par la suite, le premier génome complet d'*H. pylori* a été publié par Tomb *et al.* en 1997 ; ce génome provient de la souche 26695 qui a été prélevée d'un patient anglais souffrant d'une gastrite. Le génome de la souche 26695 est composé de 1 667 867 bp et de 1 590 séquences codantes prédites (Tomb *et al.*, 1997). Deux ans plus tard, le génome d'une seconde souche, la souche J99, isolée d'un patient états-unien souffrant d'ulcère duodéal, est publié (Alm et al., 1999). Une comparaison de ces deux génomes montre que 89 gènes de la souche J99 sont absents de la souche 26695 et 117 gènes de la souche 26695 sont absent de la souche J99. Ces gènes sont regroupés dans des zones appelées « zones de plasticité ». De plus, l'ordre, le sens ou le positionnement d'environ 15% des gènes partagés n'est pas conservé entre les deux souches (Alm et al., 1999; Alm & Trust, 1999). En 2005, Gressmann *et al.* ont réalisé une étude sur 56 souches de *H. pylori* afin de comparer leurs génomes à celui des deux souches de référence. Ils ont trouvé qu'environ 25% des gènes sont absents chez au moins une des souches testées, laissant un génome « core » d'environ 1111 gènes et 200 à 400 gènes variables (Gressmann et al., 2005), qui sont présents dans des zones de plasticité ou îlots de pathogénicité (de Reuse & Bereswill, 2007). Cette étude sur 56 souches permet donc d'étendre les conclusions faites entre les génomes des souches J99 et 26695 à un plus grand nombre de souches d'*H. pylori*, confirmant l'hétérogénéité et la plasticité du génome de cette espèce. Aujourd'hui, les souches J99 et 26695 sont utilisées comme des références du génome d'*H. pylori* et le génome de *H. pylori* fait partie des génomes les plus séquencés.

#### 1.4.1 Génération de nouveaux allèles

La base de cette diversité génétique peut être expliquée par les forts taux de mutation et de recombinaison retrouvés chez *H. pylori* (Suerbaum et al., 1998; Kraft & Suerbaum, 2005). La majorité des souches d'*H. pylori* auraient un taux de mutation spontanée compris entre  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$ , ce qui est équivalent au taux observé chez une souche d'*Escherichia coli* dépourvue de système de réparation de mésappariements (MMR). Chez *H. pylori*, ce fort taux de mutation est dû à l'absence d'un système de MMR (Bjorkholm et al., 2001; Pinto et al., 2005), à l'absence de certaines ADN glycosylases nécessaires dans la réparation par excision de base (BER) (Mathieu, O'Rourke & Radicella, 2006) ou encore à la fidélité de l'ADN polymérase I, ne possédant pas de « proof-reading » actif (García-Ortíz et al., 2011). L'apparition de mutations ponctuelles peut entraîner plusieurs conséquences comme par exemple la modification de la structure/la fonctionnalité de la protéine exprimée ou la modification d'une séquence promotrice. *H. pylori* peut également utiliser ces phénomènes comme système de régulation. *H. pylori* possède des séquences répétées dans son génome, souvent présentes en amont des gènes. Ces répétitions sont génétiquement instables dans un contexte MMR car la délétion ou l'addition d'un nucléotide dans ces séquences peut engendrer un changement du cadre de lecture ou modifier la séquence de reconnaissance d'un facteur de transcription et donc déterminer l'expression ou non de certaines protéines (Saunders et al., 1998).

On retrouve également une fréquence de recombinaison élevée chez *H. pylori* par rapport à beaucoup d'autres espèces bactériennes (Suerbaum et al., 1998), lui permettant des réarrangements chromosomiques conséquents ou l'intégration facile de nouvelles séquences par transfert horizontal de gènes. Ce phénomène peut s'expliquer par le nombre de copie très élevé de RecA, la principale recombinase jouant un rôle important dans plusieurs mécanismes de recombinaison chez *H. pylori* (Orillard, Radicella & Marsin, 2011) et donc favorisant la recombinaison.

#### 1.4.2 Transferts horizontaux de gènes

Une autre source de variabilité génétique peut être l'acquisition de gènes ou allèles étrangers par transfert horizontal de gènes (THG). Le THG est un phénomène entraînant le



transfert d'ADN entre deux organismes différents n'ayant pas de lien « mère-fille ». Il existe trois mécanismes de THG : la transduction, la conjugaison et la transformation (Figure 2)

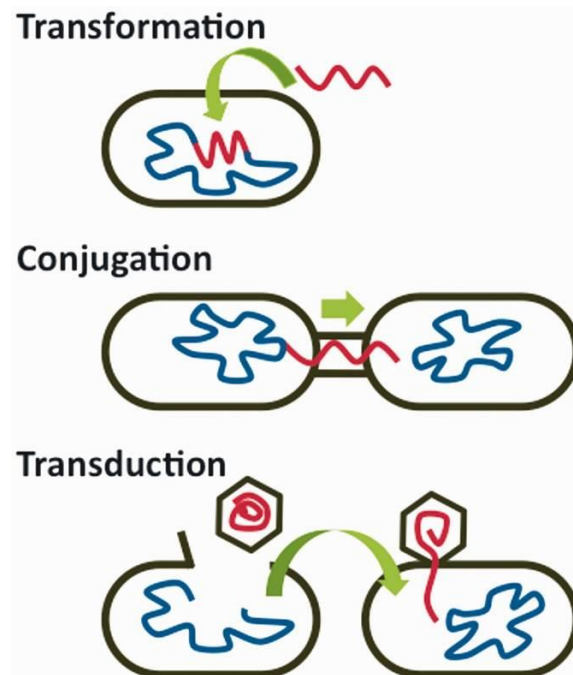


Figure 2 Les trois mécanismes de transfert horizontal de gènes : la transformation, la conjugaison et la transduction. Voir texte. Extrait de (Burmeister, 2015)

#### 1.4.2.1 La transduction

La transduction est un mécanisme de transfert d'ADN entre deux bactéries via l'action d'un bactériophage. Il n'existe que très peu de données concernant la transduction chez *H. pylori*. On peut retrouver plusieurs bactériophages infectant *H. pylori* (Muñoz et al., 2020) mais un seul a été montré comme impliqué dans la transduction, 1961P (Luo et al., 2012).

#### 1.4.2.2 La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de transfert d'ADN entre une cellule donneuse et une cellule receveuse via un pilus de conjugaison. Quelques travaux ont cherché à savoir si des mécanismes de transfert par conjugaison existaient au sein de *H. pylori*. Une première étude a été capable de mettre en évidence le transfert d'ADN similaire à la conjugaison entre deux souches d'*H. pylori* (Kuipers et al., 1998). Plus récemment, une étude a montré que *H. pylori* était capable de transférer un plasmide entre deux souches. Deux mécanismes

différents ont été mis en évidence quant au transfert d'un plasmide entre deux souches d'*H. pylori*. Dans les deux cas, le transfert d'une cassette de résistance à un antibiotique a été cherché en présence de DNaseI et nécessitant un contact physique entre les deux bactéries (donneuse et receveuse), excluant la possibilité de transfert par transformation ou par transduction. Dans un premier cas, le transfert d'un plasmide de conjugaison est médié par système de sécrétion de type 4 (T4SS) ComB dans la bactérie receveuse. Étonnamment, dans le second cas, ce mécanisme de transfert ne requiert aucun T4SS d'*H. pylori* et est donc appelé « Alternate DNaseI Resistant (ADR) mechanism » (Rohrer et al., 2012).

#### 1.4.2.3 La transformation

La transformation est un mécanisme permettant à une bactérie de capturer de l'ADN exogène libre dans son environnement et de l'intégrer dans son génome. Ce mécanisme est différent des autres dû au fait qu'il nécessite seulement des protéines codées par la bactérie réceptrice. Ce processus se déroule en plusieurs étapes nécessitant dans un premier temps l'état de compétence de la bactérie. Chez *H. pylori* cet état de compétence semble être constitutif et est l'un des facteurs majeurs de sa diversité génétique. (Ce sujet sera développé en détail dans la partie 2).

# Partie 2 : La transformation bactérienne

## 1 La transformation bactérienne

### 1.1 La découverte de la transformation bactérienne

La recherche sur la transformation naturelle a commencé il y a un siècle avec Frederick Griffith qui a décrit ce phénomène en 1928. L'expérience qu'il a menée, et qui lui a permis de montrer l'existence de la transformation naturelle, est basée sur un transfert entre deux souches de *Streptococcus pneumoniae*. Une souche non virulente pouvait devenir virulente (transformée) après co-culture avec des cellules d'une souche virulente inactivées par choc thermique avant injection dans des souris (Griffith, 1928). Dans les années qui ont suivi, la transformation a pu être démontrée *in vitro* dans des cultures bactériennes (Sia & Dawson, 1931), puis il a été montré que la fraction soluble d'un lysat bactérien était suffisante pour observer la transformation (Alloway, 1932). Enfin, il a été identifié que le composant de cette fraction était l'ADN et donc que la transformation était induite par un transfert d'ADN (Avery, MacLeod & McCarty, 1944). Nous sommes maintenant capables de mieux comprendre ce phénomène qui met en jeu deux entités : de l'ADN exogène et des cellules receveuses. Dans le cas de l'expérience de Griffith, l'ADN exogène provenait des cellules lysées par choc thermique et les cellules receveuses étaient celles de la souche de *S. pneumoniae* non virulentes. L'ADN exogène est donc internalisé et intégré dans le génome, permettant l'acquisition de nouveaux traits. Depuis ce temps, les connaissances sur la transformation ont bien évoluées et on dénombre un peu moins de 100 espèces bactériennes naturellement transformables. Certaines espèces, aussi bien des bactéries à Gram négatif que des bactéries à Gram positif, sont devenues des références de la transformation naturelle (Tableau 1).

Tableau 1 : Les principaux organismes modèles d'étude pour la transformation naturelle. Extrait de (Blokesch, 2016)

Bacterium	Year of first experimental demonstration of natural competence and transformation	Competence inducer or growth phase specificity
<b>Gram-positive bacteria</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	1958	Induced at onset of stationary phase or high cell density Bistable regulation (only ~10% of the population enters competence)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1928	Short window in exponential phase Inhibited in stationary phase Induced under stress conditions (antibiotic treatment, DNA damage)
<b>Gram-negative bacteria</b>		
<i>Acinetobacter baylyi</i>	1969	Constitutive, but occurs at low or high frequencies depending on growth phase
<i>Haemophilus influenzae</i>	1951	Nutrient downshift or starvation
<i>Helicobacter pylori</i>	1990	Constitutive, but occurs at low or high frequencies depending on growth phases Further increased upon DNA damage
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> / <i>Neisseria meningitidis</i>	1953	Constitutive
<i>Vibrio cholerae</i>	2005	Chitinous surfaces and high cell density

## 1.2 Rôle de la transformation

Le rôle de la transformation bactérienne est un sujet très controversé dans la communauté scientifique. Trois hypothèses principales, non-exclusives, sont proposées : un rôle nutritionnel, un rôle dans la génération de diversité génétique via l'acquisition/inactivation de gènes ou variantes alléliques et un rôle dans la réparation de l'ADN (Figure 4).

La première hypothèse est que l'ADN peut jouer un rôle nutritionnel (Redfield, 2001). En effet, un certain nombre de bactéries deviennent compétentes lorsque la culture atteint une densité cellulaire élevée ou lorsque les nutriments deviennent limitants (Bobb, 1963; Herriott, Meyer & Vogt, 1970). L'internalisation d'ADNt dans ces conditions de stress peut permettre à la cellule d'avoir un apport en nucléotides, pouvant être nécessaire pour différents mécanismes comme la synthèse d'ADN ou d'ARN, car la biosynthèse de nucléotides

de novo est coûteuse en énergie. Malgré cela, certaines bactéries réalisent des échanges d'ADN qui sont espèce spécifique, ce qui voudrait dire exclure une certaine quantité d'ADN venant d'autres espèces pouvant servir de nutriment. De plus, le fait que l'ADNt entrant dans le cytoplasme soit protégé par plusieurs protéines ne concorde pas avec un rôle nutritionnel. A ce jour, il y a peu d'évidences quant à l'utilisation d'ADN dégradé dans le métabolisme de la cellule hôte.

La seconde hypothèse est l'utilisation de l'ADNt pour l'acquisition d'un nouveau gène ou allèle pouvant augmenter la diversité génétique de l'espèce et potentiellement lui permettre de mieux s'adapter à son environnement.

La troisième hypothèse est que l'ADNt peut être utilisé afin de réparer le génome bactérien (Michod, Wojciechowski & Hoelzer, 1988) après dommage de son ADN. Chez *S. pneumoniae* et *Bacillus subtilis*, la compétence peut être induite par un stress antibiotique ou par des agents causant des dommages à l'ADN (Prudhomme et al., 2006; Zhang et al., 2018), suggérant un rôle de l'ADN importée dans la réparation des dommages à l'ADN. En revanche, ceci ne peut être généralisé car chez *Campylobacter jejuni* la compétence ne semble pas liée à des dommages sur l'ADN (Vegge et al., 2012) et chez *Streptococcus thermophilus*, le développement de la compétence et la réponse SOS sont antagonistes (Boutry et al., 2013).

Le manque d'évidence pouvant prouver une hypothèse plus qu'une autre quant au but de la transformation naturelle ne permet pas de conclure. Il est très probable que son rôle soit espèce ou contexte dépendent, tout comme il est possible que plusieurs de ces hypothèses soient vraies en même temps.

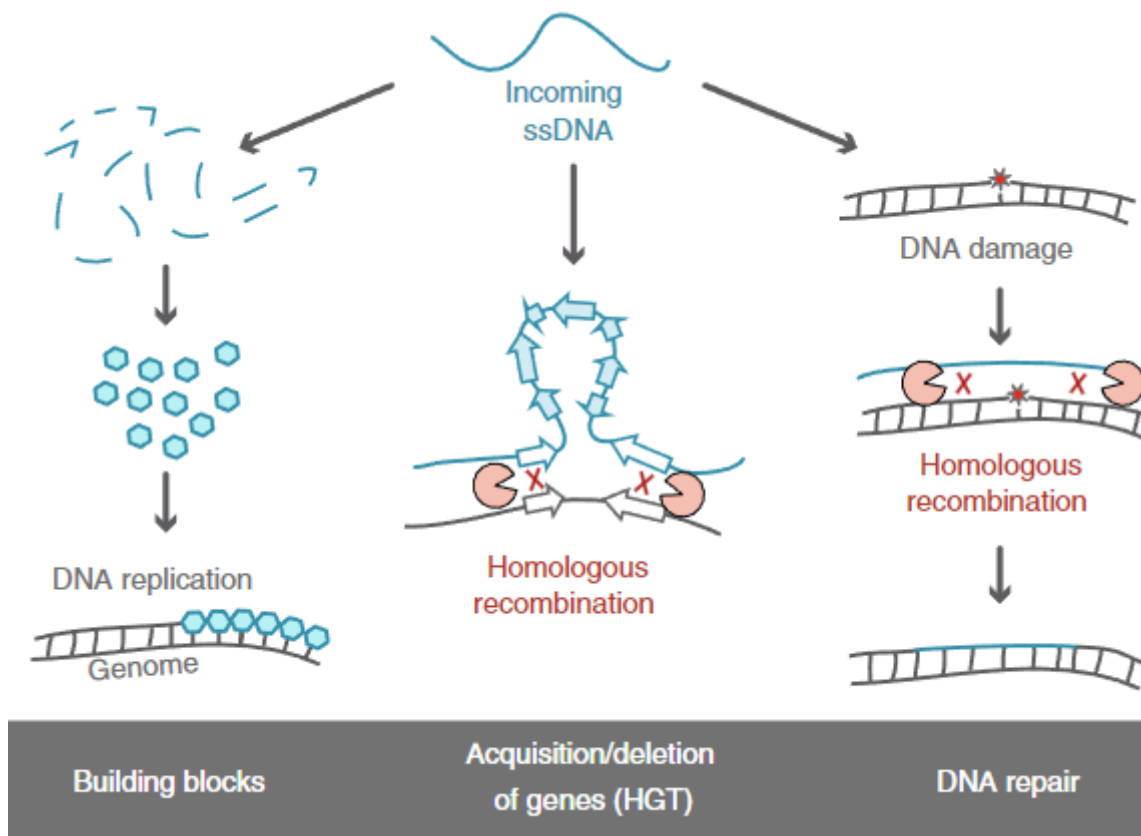


Figure 3 potential benefits of natural competence mediated DNA uptake in bacteria. Extrait de (Blokesch, 2016)

## 2 Les étapes de la transformation

Chez l'ensemble des bactéries naturellement compétentes, les étapes de la transformation sont similaires. Dans un premier temps, un ADN double brin est capturé en surface de la bactérie puis celui-ci est internalisé dans le périplasme afin ensuite d'être transporté sous forme simple brin à travers la membrane interne dans le cytoplasme, où se réalisera la recombinaison homologue (Figure 4). Le modèle présenté dans la figure 4 est basé sur la structure d'une bactérie à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, les étapes sont les mêmes et nous considérons l'étape d'internalisation comme le passage de l'ADN du milieu extérieur dans le périplasme, qui est l'espace entre la couche de peptidoglycane et la membrane interne.

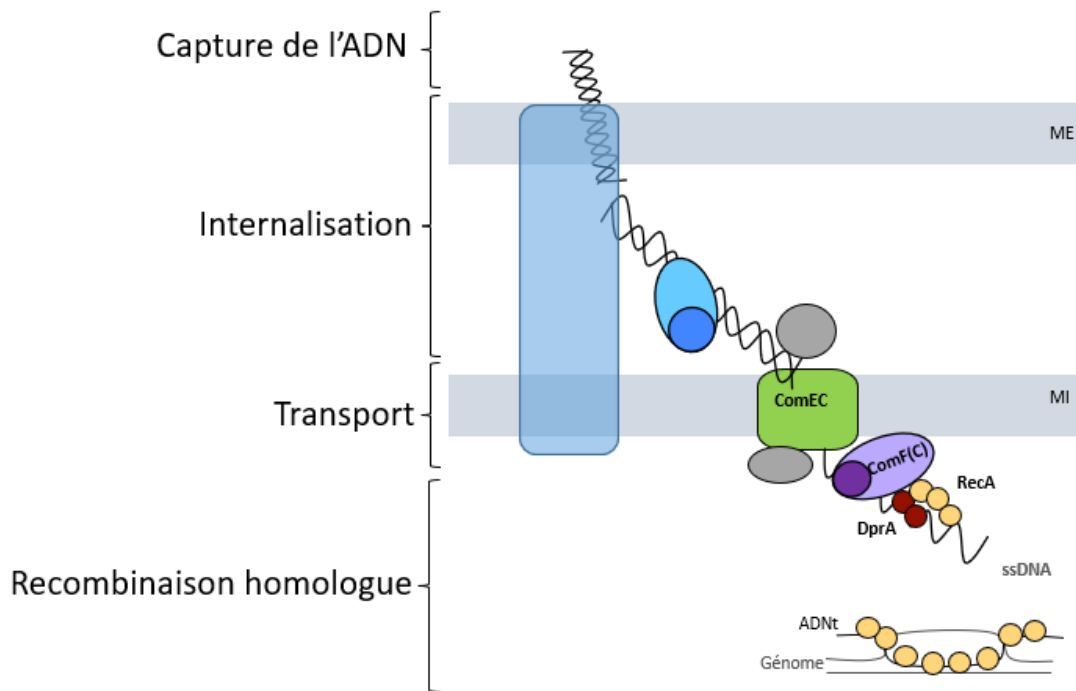


Figure 4 Les 4 grandes étapes de la transformation naturelle : la capture de l'ADN, l'internalisation, le transport et la recombinaison homologue. Modèle basé sur la structure d'une bactérie à Gram négative.

Comme décrit dans le tableau 1, les études sur la transformation naturelle chez les bactéries à Gram positif sont principalement menées sur les modèles de *B. subtilis* et *S. pneumoniae* et chez les bactéries à Gram négatif, *V. cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *A. baylyi*, *Neisseria gonorrhoeae* ou encore *H. pylori*.

## 2.1 Principe de la transformation

Comme mentionné précédemment, la transformation est un mécanisme basé sur l'acquisition d'ADN libre présent dans l'environnement de la bactérie. Ce mécanisme repose donc seulement sur des gènes de la bactérie receveuse contrairement à la transduction ou la conjugaison. Afin de réaliser la transformation naturelle et donc d'être capable de capturer, d'internaliser et d'intégrer dans son génome de l'ADN libre, les bactéries ont besoin d'être dans un état physiologique particulier, appelé état de compétence (voir ci-dessous).

Le mécanisme de transformation naturelle se repose sur une série de protéines très conservées qui sont majoritairement codées par des gènes exprimés simultanément lors de la phase de compétence. Bien que les grandes étapes de la transformation soient communes aux organismes naturellement compétents, des variations existent entre les différentes espèces. Le mécanisme utilisé pour la transformation naturelle est le sujet de plusieurs revues (Seitz & Blokesch, 2013a; Blokesch, 2017; Lorenz & Wackernagel, 1994; Johnston et al., 2014; Blokesch, 2016)

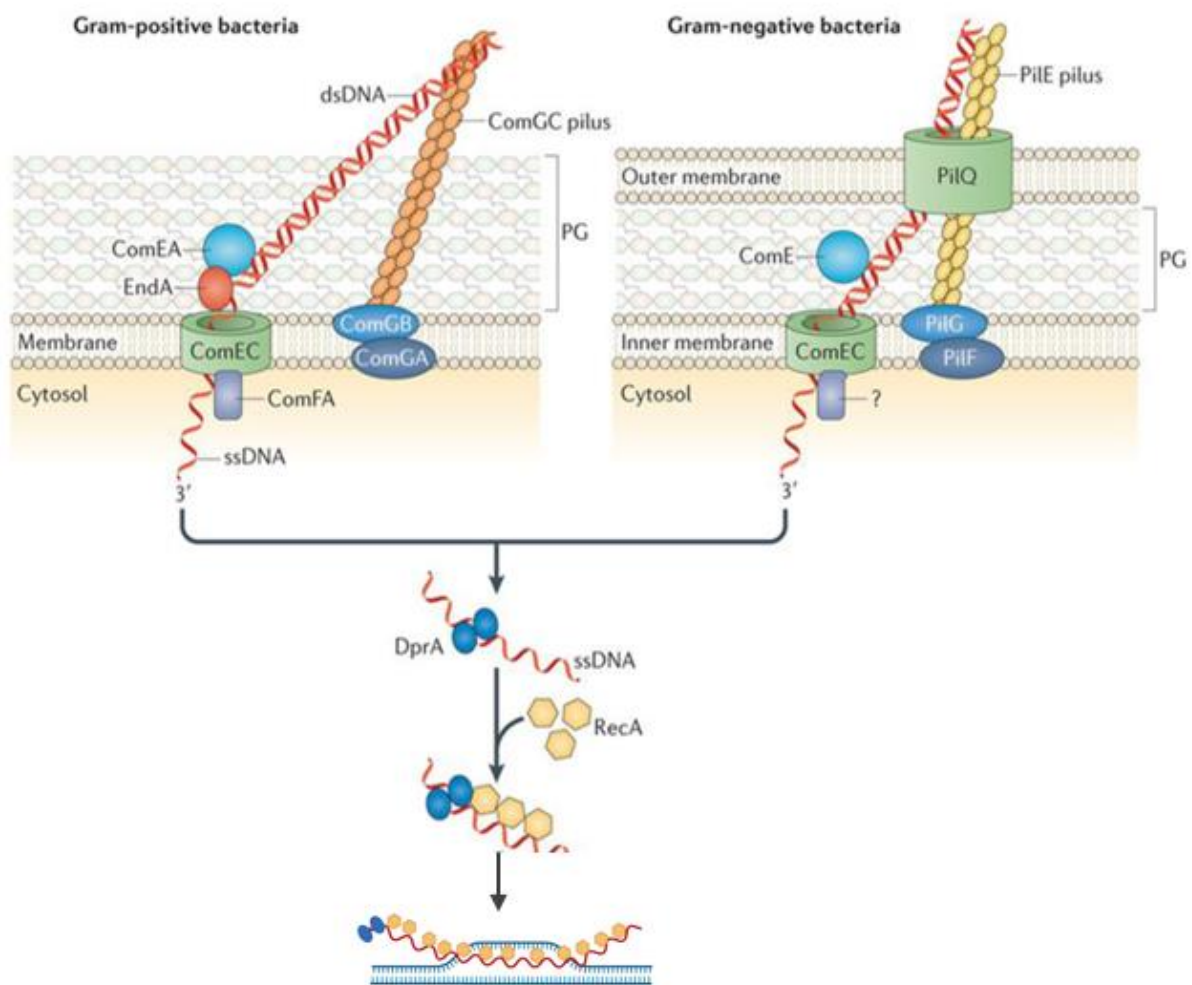


Figure 5 Modèle générale du processus de transformation naturelle chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, voir texte. Extraite de (Johnston et al., 2014a).

La figure 5 présente le modèle général de la transformation naturelle chez les bactéries à Gram positif et négatif. Brièvement, l'ADN exogène double brin est capturé par un



(pseudo)pilus puis internalisé dans le périplasme. L'ADN double brin est transformé en un ADN simple brin qui est dirigé vers une protéine transmembranaire appelée ComEC (Draskovic & Dubnau, 2005) alors que le second brin est dégradé. L'ADN simple brin est transporté dans le cytoplasme à travers ComEC et est pris en charge par DprA (DNA processing A), permettant le recrutement de la recombinaise RecA sur l'ADN (Mortier-Barrière et al., 2007). RecA polymérise sur l'ADN simple brin pour former un nucléofilament qui initie la recherche d'homologie sur le chromosome de la bactérie. Lorsque l'homologie est trouvée, RecA entame le processus de recombinaison homologue avec l'ADN chromosomique.

## 2.2 Induction de la compétence

L'entrée dans l'état de compétence chez *B. subtilis* comme chez *S. pneumoniae* se fait via une cascade de régulation initiée par un petit peptide phéromone (Lazazzera & Grossman, 1998), qui va activer les gènes de compétence. Le développement de la compétence chez ces deux espèces est en revanche très différent. Chez les bactéries à Gram positif *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, l'induction de la compétence se fait à différentes étapes de la croissance. *B. subtilis* devient compétente lors de la phase stationnaire alors que *S. pneumoniae* le devient lors de la phase exponentielle de croissance (Claverys & Havarstein, 2002; Grossman, 1995; Hamoen, Venema & Kuipers, 2003). D'un côté, chez *S. pneumoniae*, la compétence se développe très rapidement et simultanément dans l'ensemble des cellules puis disparaît rapidement après environ 15 minutes (Claverys, Prudhomme & Martin, 2006). De l'autre côté, chez *B. subtilis*, la compétence se développe seulement dans 10 à 20% des cellules, de façon lente (Maamar & Dubnau, 2005; Smits et al., 2005).

Chez les bactéries à Gram négatif, plusieurs facteurs peuvent induire l'état de compétence. Parmi les principaux, on retrouve le stress causé par des dommages à l'ADN, la communication cellulaire (comme le quorum sensing), le manque de certaines sources de carbone ou la présence d'une source de carbone spécifique. Pour en citer quelques-uns :

- *H. influenzae* possède un régulon de compétence bien défini qui est induit par un manque de source de carbone ou de nucléotides (Redfield et al., 2005).

- *V. cholerae* peut induire la compétence lors d'une forte densité cellulaire. Grâce au quorum sensing, *V. cholerae* va détecter cette forte densité et induire une cascade de réactions permettant l'activation de l'expression des gènes de compétence. La compétence peut également être activée via la détection de chitine (Sun et al., 2013).

- Chez *N. gonorrhoeae*, le système d'induction de la compétence est très peu connu. Aujourd'hui, aucun facteur environnemental n'a été mis en évidence comme étant à l'origine de la compétence. Malgré cela, la compétence a été observée dans les différentes phases de croissance et donc *N. gonorrhoeae* est considérée comme étant constitutivement compétente, comme *H. pylori* (Seitz & Blokesch, 2013a).

### 2.3 Capture de l'ADN

Une fois que la bactérie est dans l'état de compétence, la première étape de la transformation est la capture de l'ADN double brin exogène à sa surface. Chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, la fixation de l'ADN nécessite l'expression de 7 protéines de l'opéron *comG*, qui permettent la formation de pili de Type IV (T4P). Il a été montré que les protéines ComG sont nécessaires à la capture de l'ADN exogène mais les résultats suggèrent qu'elles ne fixent pas l'ADN elles-mêmes (Bergé et al., 2002; Proveddi & Dubnau, 1999). La ou les protéine(s) fixant l'ADN à la surface ne sont pas connues. Le pseudopilus, formé majoritairement par ComGC, servirait plutôt à modifier la paroi cellulaire afin de créer un accès pour l'ADN vers le périplasme. Il est intéressant de noter que chez *B. subtilis*, des études ont montré l'existence d'une liaison entre l'ADN et la surface de la cellule, qui est réversible et indépendante du T4P (Maier et al., 2004). Chez cette bactérie, l'ADN exogène peut se lier à la surface de la paroi sur les acides téichoïques modifiés par l'action d'une glycosylase transférase TuaH, qui est régulée par l'état de compétence suggérant un rôle dans la transformation naturelle (Mirouze et al., 2018). La relation entre le T4P et les acides téichoïques de la paroi n'est pas claire mais ce lien pourrait faire partie de la première étape de capture de l'ADN.

Tout comme pour la plupart des bactéries naturellement compétentes, chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, aucune séquence spécifique n'est nécessaire pour la reconnaissance de l'ADN. L'ADN extracellulaire est fragmenté et ce sont des fragments de 13.5 à 18 kb qui se fixent sur *B. subtilis* contre des fragments d'ADN d'environ 6 kb chez *S. pneumoniae* (Dubnau,

1999). Chez *B. subtilis*, une endonucléase de surface, NucA permet le clivage de l'ADN double brin. Cette endonucléase est à l'origine d'un clivage créant des extrémités libres sur l'ADN double brin, entraînant une capture de l'ADN plus efficace (Provvedi, Chen & Dubnau, 2001). En revanche, aucune endonucléase similaire n'a été retrouvée chez *S. pneumoniae*.

Concernant les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *H. pylori*, la machinerie d'internalisation est également un T4P (Figure 5). Celui-ci est principalement constitué de deux ATPases, une piline principale et plusieurs pilines secondaires. C'est une structure dynamique capable de s'assembler et se désassembler, ceci médié par les deux ATPases (PilB et PilT) (Giltner, Nguyen & Burrows, 2012). La piline principale est une protéine membranaire, sa longue hélice en N-terminal traverse la membrane et son extrémité C-terminal est à l'extérieur. L'assemblage des pilines principales se fait via la première ATPase qui permet l'extraction de l'hélice transmembranaire ; les pilines vont ensuite se regrouper via leurs hélices et former un filament. La seconde ATPase permet le processus inverse où les pilines se séparent et retournent dans la membrane. Le filament T4P traverse le peptidoglycane puis la membrane externe par un pore formé de pilQ (Chang et al., 2016).

L'hypothèse principale pour la capture de l'ADN est que le T4P s'étend dans le milieu extérieur et lie l'ADN. Par rétractation du T4P, l'ADN traverserait la membrane externe (Hobbs & Mattick, 1993). Chez *V. cholerae*, une étude a montré via un pilus marqué par fluorescence que celui-ci s'étend, piège une molécule d'ADN et se rétracte pour amener l'ADN à la surface de la cellule (Ellison et al., 2018), prouvant certains aspects de l'hypothèse proposée par Hobbs et Mattick (Hobbs & Mattick, 1993). Chez *V. cholerae*, une piline secondaire, VC0858, a été identifiée car sa mutation réduit le taux d'ADN lié et le taux de transformation naturelle (Ellison et al., 2018). Chez *N. gonorrhoeae*, une piline secondaire, ComP, est intégrée dans le filament, permet l'assemblage du T4P et est capable de se lier à l'ADN. La liaison de ComP à l'ADN est plus importante lorsque l'ADN possède ce que l'on appelle des DNA Uptake Sequence (DUS) (Berry et al., 2016), qui se décrit par le motif suivant 5'-GCCGTCTGAA-3' (Ambur, Frye & Tønnum, 2007). *N. gonorrhoeae* n'est pas la seule espèce à nécessiter des DUS pour une efficacité de transformation naturelle efficace. C'est aussi le cas de *H. influenzae* avec la séquence 5'-AAGTGCGGT-3' (Mell, Hall & Redfield, 2012). Ces DUS sont des séquences qui se retrouvent dans leurs génomes respectifs favorisant l'intégration de l'ADN transformant issu de cellules de la même espèce.

## 2.4 Internalisation de l'ADN

Lorsque l'ADN entre dans le périplasma, il est pris en charge par ComEA. Chez les bactéries à Gram négatif, ComEA est présent dans le périplasma sous forme soluble alors que chez les bactéries à Gram positif, ComEA est associée à la membrane (Chen & Gotschlich, 2001; Seitz et al., 2014). ComEA lie l'ADN transformant et le tirerait vers le périplasma grâce à un mouvement de « cliquet ». Cet import d'ADN dans le périplasma peut se faire en grande quantité car par exemple, on peut retrouver plus de 40kb d'ADN transformant dans le périplasma chez *N. gonorrhoeae* (Gangel et al., 2014). En plus de jouer un rôle dans l'import de l'ADN, ComEA est proposée comme amenant l'ADN au canal de la membrane interne ComEC. En revanche, on peut penser que l'internalisation dans le périplasma n'est pas couplée avec le transport dans le cytoplasme car chez *V. cholerae*, en absence de ComEC, la colocalisation de l'ADN et de ComEA reste inchangée (Seitz et al., 2014).

Avant l'étape de transport à travers la membrane, l'ADN double brin est transformé en ADN simple brin. Chez *S. pneumoniae*, c'est la nucléase EndA (Lacks, Greenberg & Neuberger, 1975; Lacks & Neuberger, 1975; Rosenthal & Lacks, 1980) qui réalise cette action afin de permettre le transport d'un des brins dans le cytoplasme via le canal ComEC (Bergé et al., 2002). Chez les autres espèces, aucune protéine similaire à EndA n'a été identifiée. En revanche, une étude *in silico* chez *B. subtilis* a montré que le domaine C-terminal soluble de ComEC est homologue aux protéines de la superfamille de métallo- $\beta$ -lactamases (Baker et al., 2016), dont certaines sont capables de cliver des acides nucléiques. Cette activité nucléase a été prouvée *in vitro* sur de l'ADN simple et double brin (Silale, Lea & Berks, 2021). Ce domaine C-terminal pourrait jouer un rôle équivalent à celui de la nucléase EndA chez *S. pneumoniae*. Cependant, environ la moitié des bactéries compétentes ne possèdent pas l'équivalent du domaine C-terminal de ComEC de *B. subtilis* (Pimentel & Zhang, 2018) et donc la proposition de son activité nucléase ne peut pas être généralisée.

## 2.5 Transport de l'ADN chez les bactéries compétentes

Le transport de l'ADN simple brin à travers la membrane interne est similaire chez l'ensemble des bactéries compétentes et est donc réalisé par ComEC, dont la présence est

absolument nécessaire pour la transformation naturelle. Des analyses *in silico* chez *V. cholerae*, *B. subtilis*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et *Acinetobacter spp.* proposent un modèle de ComEC avec 9 à 13 domaines transmembranaires et 2 domaines non membranaires, prédits comme étant soit dans le cytoplasme, soit dans le périplasme (Tsirigos et al., 2015). ComEC posséderait un domaine central très conservé appelé « domaine de compétence » (Pimentel & Zhang, 2018). Basé sur une étude topologique, un modèle chez *B. subtilis* propose une dimérisation de ComEC pour former un canal à travers la membrane interne (Draskovic & Dubnau, 2005). Cependant, plus récemment un modèle a été réalisé proposant que le canal ComEC n'est pas formé par un dimère mais par un monomère (Guérois et al., données non publiées).

Une étude *in silico* a montré que le domaine soluble N-terminal de ComEC de *B. subtilis* possède un « oligonucleotide binding fold » (OBD) potentiellement capable de lier l'ADN simple brin. Sa mutation inhibe complètement la transformation mais sans changer la stabilité du canal transmembranaire (Draskovic & Dubnau, 2005). Il est donc proposé que ce domaine N-terminal de ComEC aiderait la prise en charge de l'ADN simple brin reçu par ComEA et permettrait son passage à travers ComEC (Baker et al., 2016).

ComEC n'est pas le seul acteur dans le transport de l'ADN, un set de protéines cytoplasmiques jouerait un rôle dans l'import de l'ADN dans le cytoplasme et permettrait la transition avec la machinerie de recombinaison homologue. Ces protéines ont été initialement décrites chez *B. subtilis* qui possède un opéron codant pour 3 protéines (ComFA, ComFB et ComFC) impliquées dans la transformation naturelle (Londoño-Vallejo & Dubnau, 1993).

ComFA n'est retrouvée que chez les bactéries à Gram positif. Elle est induite lors de la compétence chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* et lorsque mutée, diminue la capacité de transformation de façon importante chez *S. pneumoniae* et de façon modérée chez *B. subtilis* (Bergé et al., 2002; Londoño-Vallejo & Dubnau, 1993). La délétion de ComFC (ou ComF chez les bactéries à Gram négatif) abolit la capacité à transformer chez *S. pneumoniae* et *V. cholerae* (Diallo et al., 2017; Seitz & Blokesch, 2013b) et entraîne une forte diminution chez *B. subtilis* (Sysoeva et al., 2015). Malgré ces données, la fonction de ComFC reste très peu décrite ; seul chez *H. pylori*, il a été montré que cette protéine, associée à la membrane, joue

un rôle d'intermédiaire entre la machinerie de transport et celle de recombinaison (Damke et al., 2022) (voir Partie 3 paragraphe 4 )

Chez *B. subtilis*, ComFA co-localise avec ComFC et ComEC (Kaufenstein, van der Laan & Graumann, 2011) mais également avec SsbB et DprA (Kramer, Hahn & Dubnau, 2007). De plus, par double hybride bactérien, il a été proposé que chez *S. pneumoniae*, ComFA interagit avec ComFC et DprA (Diallo et al., 2017). Ceci suggère que ComFA et ComFC se trouvent entre la machinerie d'internalisation et de recombinaison. ComFA est également capable de lier l'ADN simple brin, ce qui stimule son activité ATPase. L'ensemble de ces données ont permis de proposer un modèle où ComFA fournit l'énergie nécessaire afin d'importer l'ADN simple brin à travers ComEC (Diallo et al., 2017). Concernant ComFB, sa fonction exacte n'est pas clairement définie mais elle semblerait plutôt jouer un rôle régulateur (Sysoeva et al., 2015). En revanche, chez les bactéries à Gram négatif on ne retrouve pas des homologues de ComFB ou ComFA.

## 2.6 La recombinaison homologue

Une fois dans le cytoplasme, l'ADNt est pris en charge par la machinerie de recombinaison. Plusieurs protéines vont intervenir dans la protection de l'ADNt avant sa recombinaison dans le chromosome.

Dans un premier temps, deux protéines, SsbA et SsbB (single stranded binding proteins A et B) entrent en jeu. SsbB est induite lors de la compétence chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* (Claverys, Martin & Polard, 2009; Grove et al., 2005) et forme un complexe nucléoprotéique avec l'ADNt simple brin (Attaiech et al., 2011). Chez les bactéries à Gram positif, SsbA fait également partie du complexe. SsbA est une protéine essentielle car également impliquée dans la réplication mais la maintenance du chromosome rend l'étude de son rôle dans la transformation difficile (Morrison et al., 2007). Chez les bactéries à Gram négatif, l'unique protéine Ssb présente est un homologue de SsbA. Tout comme SsbA, cette Ssb est essentielle à la cellule ce qui rend son étude plus complexe.

Dans un second temps, DprA, l'une des protéines clé de la machinerie de recombinaison homologue lors de la transformation naturelle, se lie à l'ADN. Il a été montré chez *S. pneumoniae* que, tout comme SsbB, DprA joue un rôle dans la protection de l'ADNt dès son entrée dans le cytoplasme (Bergé et al., 2003). Une étude de Mortier-Barrière *et al.*

(2007) a permis de montrer que DprA est capable : de se lier à l'ADN simple brin et de former des complexes nucléoprotéiques, de lier l'ADN super-enroulé, d'interagir avec RecA afin de former des nucléofilaments et d'interagir avec des complexes nucléoprotéiques formés par des ADN simple brin et SSB. L'activité de DprA dépend de la formation d'un dimère via l'interaction de leur domaine Rossmann fold (RF) (Quevillon-Cheruel et al., 2012). *In vitro*, la présence de DprA lève l'inhibition de SSB sur l'activité ATPase de RecA et permet la liaison de RecA sur l'ADN simple brin. DprA est également capable de juxtaposer différentes molécules d'ADN simple brin dans le but d'associer des molécules complémentaires. Il est donc proposé que DprA faciliterait la recherche d'homologie médiée par RecA lors de la transformation (Figure 6) (Mortier-Barrière et al., 2007; Quevillon-Cheruel et al., 2012).

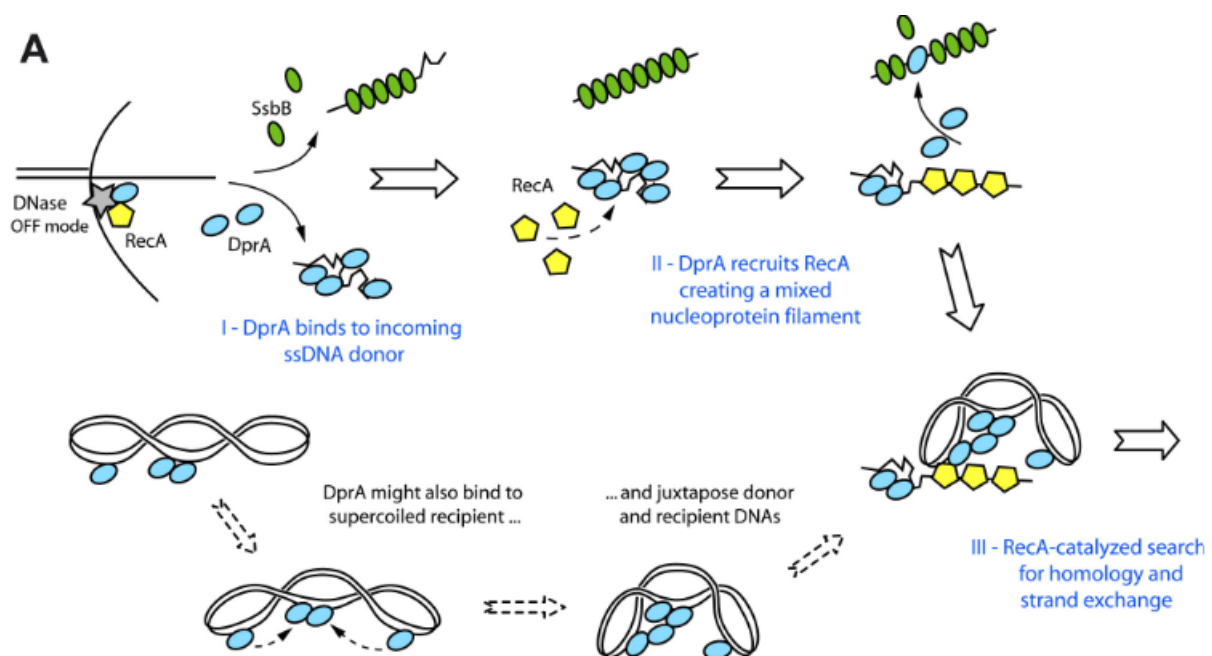


Figure 6 rôle de DprA lors de la transformation naturelle. Extrait de (Mortier-Barrière et al., 2007)

Dans un troisième temps intervient la protéine RecA qui est une « ATP-mediated DNA strand exchange protein ». RecA est capable, après avoir fixé l'ATP, de se lier à l'ADN simple brin, formant un filament nucléoprotéique qui permet la recherche d'homologie avec un ADN double brin et de catalyser l'échange de brin entre ce nucléofilament et l'ADN double brin (Bell & Kowalczykowski, 2016). Elle est essentielle pour la recombinaison homologue chez les bactéries. Elle est impliquée dans un bon nombre de mécanismes moléculaires tels que la

régulation du système SOS, la réparation de l'ADN ou encore la division cellulaire (Bell & Kowalczykowski, 2016). Plus particulièrement, l'absence de RecA chez *V. cholerae* (Seitz & Blokesch, 2013b), *N. gonorrhoeae* (Kooimey & Falkow, 1987), *H. pylori* (Schmitt et al., 1995), et plusieurs autres bactéries compétentes, entraîne une abolition de la transformation chromosomique. Une fois une homologie trouvée, RecA catalyse l'invasion de l'ADN double brin par le nucléofilament formant une D-loop (Displacement loop). Dans le cadre de la transformation naturelle, une hélicase est chargée au niveau des jonctions de la D-loop d'ouvrir et d'étendre la boucle. Cette étape est également appelée migration de branche. Chez *S. pneumoniae* (Marie et al., 2017) et chez *B. subtilis* (Torres et al., 2019a), RadA a été identifié comme étant l'hélicase jouant ce rôle au cours de la transformation. RadA est largement conservée chez les bactéries à Gram positif mais est également présente chez les bactéries à Gram négatif. Cependant, chez *V. cholerae* et *A. baylyi* une autre protéine, ComM, porte ce rôle (Nero et al., 2018a).



# Partie 3 : La transformation chez *Helicobacter pylori*

Contrairement aux autres bactéries naturellement compétentes, *H. pylori* n'utilise pas un pilus ou pseudopilus de type 4 pour l'internalisation d'ADN exogène. En effet, *H. pylori* est une bactérie unique qui utilise un système de sécrétion de type IV (T4SS) associé à ses protéines de compétence dans son mécanisme de transformation naturelle (Hofreuter, Odenbreit & Haas, 2001; Karnholz et al., 2006) (Les T4SS seront décrits dans la Partie 5). En revanche, *H. pylori* possède un homologue de ComEC, permettant le transport de l'ADN du périplasme au cytoplasme (Yeh et al., 2003). Le passage de l'ADN du milieu extérieur au cytoplasme lors de la transformation naturelle se réalise en deux étapes, i) le système de T4SS ComB permet le transport de l'ADN double brin exogène dans le périplasme, ii) ComEC permet le transport de l'ADN simple brin dans le cytoplasme (Stingl et al., 2010), qui est pris en charge par les protéines de la machinerie de recombinaison homologue.

## 1 L'état de compétence

*H. pylori* est généralement décrite comme étant constitutivement compétente, au différent de la grande majorité des espèces naturellement compétentes connues (Dorer, Fero & Salama, 2010). Cependant, il a été reporté qu'une légère augmentation du pH (supérieur à pH 6.5) ainsi qu'un stress oxydatif entraînent une augmentation de la capacité à transformer (Krüger et al., 2016; Moore et al., 2014). De plus, il a été montré que des dommages à l'ADN induits par la fluoroquinolone induit une augmentation des échanges génétiques (Dorer, Fero & Salama, 2010). La recombinaise RecA est nécessaire pour l'induction de la compétence, menant à l'hypothèse que RecA permet l'identification de dommages à l'ADN et la transmission de ce signal pour initier la compétence (Dorer, Fero & Salama, 2010). De manière surprenante, même si un certain nombre de gènes (comme *comB3*, *comB4*, *comB9*) impliqués dans la compétence sont induits lors de dommages à l'ADN, ComEC et DprA ne le sont pas

alors qu'ils sont essentiels lors de la transformation naturelle. Il est à noter que cette étude a été réalisée dans une souche où des pics de transformations ont pu être observés, l'interprétation de l'expression des gènes impliquées dans la compétence est à prendre avec précaution ; les résultats peuvent être différents dans d'autres souches d'*H. pylori* (Baltrus & Guillemin, 2006). En plus de ces résultats, une étude montre que chez des mutants déficients pour la réparation des dommages à l'ADN ( $\Delta addA$ ,  $\Delta recO$ ,  $\Delta recN$ ), ce qui a pour conséquence l'accumulation de dommages, une surexpression de *comB8* et *comB10* est observée (Corbinais et al., 2017). De plus, dans un mutant *addA*, une surexpression de *comB3* et *comB4* est observée (Dorer, Fero & Salama, 2010). Une hypothèse proposée est qu'il existe une boucle de régulation où la surexpression de l'opéron *comB6-10* entraîne une surexpression de l'opéron *comB2-4* et inversement (Corbinais et al., 2017). Les auteurs proposent également un modèle dans lequel l'accumulation de dommages sur l'ADN induit la surexpression de l'opéron *comB6-10* afin d'augmenter la quantité de protéines ComB au niveau de la membrane externe. Ceci entraînant une intégration de l'ADN dans le périplasme plus conséquente, ce qui est l'étape limitante du mécanisme (Corbinais et al., 2017).

## 2 Capture de l'ADN

Chez *H. pylori* le mécanisme et les protéines impliqués dans la capture de l'ADN ne sont pas connus. Un motif répété tel que les DUS observés chez *N. gonorrhoeae* et *H. influenza* a été cherché chez *H. pylori* mais aucun n'a pu être trouvé (Peden, Moxon & Saunders, 1999).

## 3 Internalisation de l'ADNt dans le périplasme

Comme mentionné précédemment, *H. pylori* utilise un T4SS à la différence des autres bactéries compétentes. Le modèle d'internalisation repose en partie sur les données connues chez les autres bactéries compétentes ainsi que celles sur le T4SS. Un certain nombre des acteurs impliqués dans cette étape restent encore à découvrir. En effet, *H. pylori* ne possède pas d'homologue de ComEA comme l'ensemble des bactéries compétentes mais une autre protéine. Cependant, récemment, l'équivalent de ComEA a été caractérisé : ComH (Damke et al., 2019). ComH possède une séquence complètement différente de ComEA mais tout comme

ComEA, ComH est présent dans le périplasma, lie l'ADN double brin avec une grande affinité et est nécessaire pour l'accumulation de l'ADN sous forme de foci. Les protéines ComEA possèdent un motif helix-hairpin-helix (HhH) permettant l'interaction avec l'ADN ce qui n'est pas le cas pour comH. A ce jour, aucun autre motif permettant la liaison à l'ADN n'est connu chez cette protéine. Damke *et al.* (2019) ont montré que le domaine C-terminal de ComH était capable de lier l'ADN double brin et possède donc un motif liant l'ADN encore inconnu avant ceci. Le domaine C-terminal de ComH est suffisant pour l'internalisation d'ADNt dans le périplasma mais ne permet pas le transport dans le cytoplasme, montrant que la protéine complète possède une double fonction. Une délétion du domaine N-terminal de ComH entraîne une persistance des foci d'ADN dans le périplasma, similaire au phénotype observé lors d'une délétion de ComEC (Corbinais *et al.*, 2016; Stingl *et al.*, 2010). Une interaction entre le domaine N-terminal et le domaine OBD de ComEC a été identifiée suggérant que ce domaine pourrait être responsable de l'adressage de l'ADNt à ComEC.

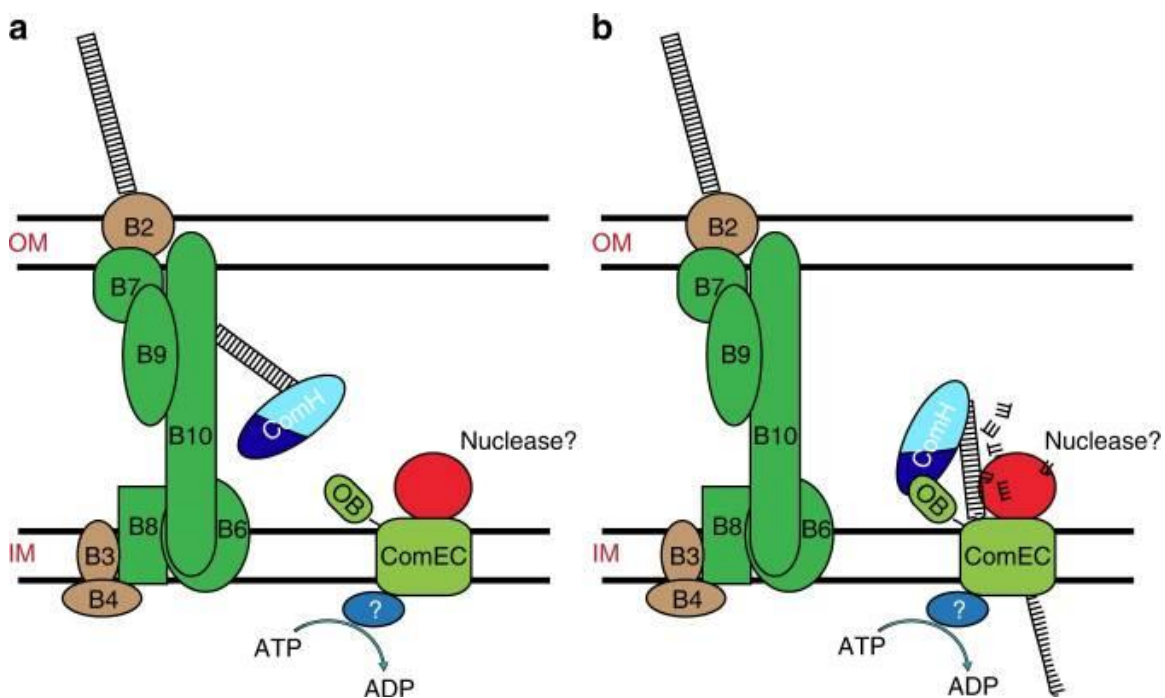


Figure 7 Modèle proposé pour le rôle de ComH. Extrait de (Damke *et al.*, 2019)

Damke *et al.* (2019) proposent donc un modèle où l'internalisation de l'ADNt se fait en deux étapes. La première où le domaine C-terminal de ComH se lie à l'ADN entrant dans le

périplasme et la seconde où, via le domaine N-terminal, ComH délivre l'ADNt au domaine OBD de ComEC (Figure 7).

Contrairement à *B. subtilis*, la protéine ComEC d'*H. pylori* ne possède pas de domaine  $\beta$ -lactamase (Stingl et al., 2010; Baker et al., 2016) et, à ce jour, aucun homologue de EndA de *S. pneumoniae* n'a été identifié chez *H. pylori* ou d'autres espèces. Le mécanisme permettant la transformation de l'ADN double brin en simple brin afin d'être transporté à travers ComEC reste encore inconnu chez *H. pylori*.

#### 4 Le transport de l'ADNt à travers la membrane interne

Chez *H. pylori*, peu d'informations peuvent être trouvées sur ComEC en elle-même mais, comme décrit précédemment, nous savons qu'elle interagit avec la protéine périplasmique ComH qui lui délivre l'ADNt. Du côté cytoplasmique, un gène hp1473 a été identifié comme orthologue de *comFC* et impliqué dans la transformation naturelle (Chang et al., 2001). Récemment, il a été montré qu'une délétion de *comFC* chez *H. pylori* entraîne une diminution du taux de transformation de façon similaire à un mutant *comH* ou *dprA* (Damke et al., 2022). Dans cette même étude, il a été montré que cette délétion n'impacte pas la capture et l'internalisation dans le périplasme de l'ADNt mais que l'ADNt persiste dans le périplasme, de manière similaire à ce que l'on observe dans un mutant de *comEC*. Ceci indique que ComFC joue un rôle dans le transport de l'ADNt vers le cytoplasme. De plus, les auteurs ont montré que ComFC est associée à la membrane interne, ce qui va de pair avec son rôle dans le transport de l'ADNt. Dans un mutant *comEC*, la présence de ComFC-FLAG au niveau de la membrane est réduite de façon significative, indiquant que la présence de ComFC au niveau de la membrane se fait partiellement par ComEC. En revanche, il reste à déterminer si l'interaction entre ComFC et la membrane est directe ou se fait par l'intermédiaire d'une autre protéine. Comme décrit précédemment, les bactéries à Gram positif possèdent une protéine associée à la membrane, ComFA, qui interagit avec ComFC et ComEC chez *B. subtilis* (Kaufenstein, van der Laan & Graumann, 2011). Aucun orthologue de ComFA n'a été trouvé chez *H. pylori* mais l'hypothèse qu'une protéine jouant le même rôle existe est possible.

Lorsqu'un ADN simple-brin est livré directement dans le cytoplasme par électroporation, un mutant *comFC* présente un défaut de transformation, montrant que cette protéine joue également un rôle dans les étapes en aval du transport de l'ADNt à travers la membrane interne. Ajouté à ceci, ComFC est capable de lier l'ADN simple brin ce qui, *in vitro*, protège la dégradation d'ADN simple brin par une nucléase. Ces données suggèrent que ComFC à un rôle de transition entre l'étape de transport et de recombinaison homologue ce qui permettrait la protection de l'ADNt avec DprA et RecA dans le cytoplasme (Damke et al., 2022). Chez *S. pneumoniae* (Diallo et al., 2017) et chez *Campilobacter jejuni* (Wiesner, Hendrixson & DiRita, 2003), ComFC interagit avec DprA, menant à dire que ComFC se lie à l'ADNt sortant de ComEC pour le protéger de la dégradation et le diriger vers DprA afin d'initier la machinerie de recombinaison.

# Projet de thèse

Bien que les grandes étapes de la transformation naturelle chez *H. pylori* soient connues, un manque de connaissance sur les différents acteurs impliqués et leur fonctionnement reste présent. Nous avons décidé de nous concentrer sur la recherche d'ATPases impliquées dans la transformation naturelle. Pour ceci, nous avons regardé chez *H. pylori* s'il existait des protéines ayant une homologie avec des protéines connues impliquées dans la transformation naturelle chez d'autres espèces ou potentiellement liées au T4SS. Plusieurs candidats sont issus de cette analyse. Les travaux présentés dans cette thèse aborderont certains de ces candidats et seront divisés en deux parties. Une introduction à chacune de ces deux parties est présentée ci-dessous.

Une première partie, et la partie principale de cette thèse, porte sur deux candidats : *hp0792* et *hp0223*. Ces deux gènes codent pour des homologues de ComM et RadA respectivement. Ces protéines ont été décrites comme jouant un rôle dans la migration de branche lors la recombinaison homologue au cours de la transformation chez les bactéries à Gram négatif et positif respectivement.

Dans une seconde partie de ces travaux, j'ai mis en évidence l'importance d'un autre candidat, *hp1421*, qui est ressorti de cette analyse. HP1421 est un homologue de VirB11, qui est une ATPase indispensable au T4SS.



# Partie 4 : La recombinaison homologue lors de la transformation naturelle chez *H.* *pylori*

La recombinaison homologue lors de la transformation naturelle est un mécanisme peu connu chez *H. pylori*. Plusieurs complexes protéiques, comme RuvABC, RecOR et AddAB, participent à la recombinaison homologue.

RecBCD (ou AddAB chez *B. subtilis*) et RecFOR, sont deux voies d'initiation de la recombinaison homologue qui co-existent chez *E. coli* (Kuzminov, 1999) et *B. subtilis* (Fernández, Ayora & Alonso, 2000). RecBCD est une holoenzyme avec une activité hélicase de 3'-5' et 5'-3' portées par RecB et RecD respectivement tandis que RecC permet la reconnaissance d'une séquence spécifique appelée Chi (crossover hotspot instigator) au niveau d'une cassure double brin. RecBCD est donc indispensable pour la réparation des cassures double brin (Dillingham & Kowalczykowski, 2008). RecFOR est un complexe permettant le remplacement de Ssb présent sur l'ADN par RecA afin de permettre la réparation de gaps et la ré-initiation de la réplication après exposition aux UV avec la participation de RecQ, (hélicase) et RecJ (exonucléase) (Ivančić-Baće, Salaj-Šmic & Brčić-Kostić, 2005). *H. pylori* possède également les complexes RecOR et AddAB, tous deux impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN (Marsin et al., 2008, 2010). En revanche, aucun de ces deux complexes n'intervient dans la transformation naturelle (Amundsen et al., 2009; Marsin et al., 2010, 2008). De façon assez surprenante, il a été montré qu'une délétion de AddB (anciennement appelé RecB) n'avait pas d'impact délétère sur la transformation mais que, au contraire, entraînait une augmentation du taux de transformation d'un facteur 10, suggérant un rôle de régulation (Marsin et al., 2008). RuvABC est impliqué dans les étapes tardives de la recombinaison, notamment dans la réparation de dommages à l'ADN. RuvA est une protéine



permettant la reconnaissance des jonctions de Holliday et le recrutement de l'hélicase RuvB, permettant la migration de branche. L'exonucléase RuvC permet la résolution de la jonction de Holliday (Zahradka et al., 2002). Son rôle dans la transformation naturelle chez *H. pylori* est incertain. Dans une étude, une délétion de *ruvB* entraîne l'abolition de la transformation, similaire à un mutant *recA* (Kang & Blaser, 2008). Dans une autre étude, il a été montré que RuvB avait un rôle lors de la transformation naturelle en plus de son rôle dans la résistance aux dommages UV (Loughlin et al., 2003). Curieusement, une étude les succédant présente des résultats contradictoires, où ni RuvB ni RuvC ne jouent un rôle dans la transformation naturelle (Humbert, Dorer & Salama, 2011).

Comme il a été décrit précédemment, RecA et DprA sont des protéines nécessaires lors la transformation naturelle et ce chez toutes les espèces étudiées. Comme attendu, ceci est également le cas chez *H. pylori* (Marsin et al., 2008; Schmitt et al., 1995). Toutefois, la structure de DprA chez *H. pylori* n'est pas le même que chez d'autres espèces compétentes (Figure 8). L'ensemble des structures de DprA révèlent un domaine Rossmann fold (RF) (Quevillon-Cheruel et al., 2012) central permettant la liaison à l'ADN simple et double brin. La majorité des protéines DprA possède un domaine « sterile alpha motif » (SAM) permettant une efficacité de recombinaison plus importante. Cependant, *H. pylori* DprA ne possède pas ce domaine SAM, mais possède un domaine C-terminal avec un motif « winged helix », usuellement associé à la liaison à l'ADN. De manière surprenante, ce domaine ne se lie pas à l'ADN simple ou double brin chez *H. pylori* (Dwivedi et al., 2015; Huang et al., 2019; Lisboa et al., 2019). La fonction de ce domaine n'est pas encore connue mais comme il est nécessaire à la transformation naturelle, il est proposé que celui-ci interviendrait dans l'interaction avec une protéine de la machinerie de recombinaison (Lisboa et al., 2019).

Identity	16%-17%	30%-37%	14%-20%
$DprA_{Ra}/DprA_{Nm}/DprA_{Hf}$	SAM	RF	Z $\alpha$
$DprA_{Sp}$	SAM	RF	
$DprA_{Hp}$		RF	Z $\alpha$

Figure 8 Comparaison des structures linéaires de DprA chez *R. anatipestifer*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* et *H. pylori*. Extrait de (Huang et al., 2019)

Les protéines impliquées dans la migration de branche ou encore la recombinaison des jonctions restent encore à découvrir. Au cours de ma thèse j'ai étudié le rôle de deux hélicases potentiellement impliquées dans la transformation naturelle : ComM et RadA.

# Partie 5 : Les ATPases impliquées dans le système de sécrétion de type IV ComB chez *H. pylori*

Les systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) constituent une grande famille de systèmes de translocation macromoléculaire présents dans la paroi des bactéries à Gram positif et négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, le T4SS décrit chez *Agrobacterium tumefaciens* sert de référence (Figure 9).

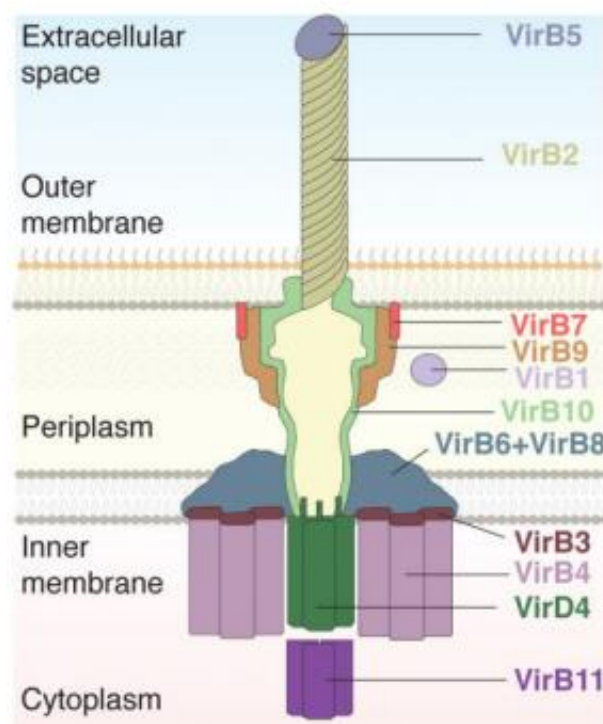


Figure 9 Modèle général des T4SS. Extrait de (Grohmann et al., 2018)

Le T4SS d'*A. tumefaciens* est composé de 12 sous-unités appelées VirB1 à VirB11 et VirD4 (Grohmann et al., 2018). Cette nomenclature est conservée chez les différents T4SS étudiés afin d'unifier les études réalisées sur ceux-ci, hormis quelques exceptions comme CagT4SS. Chez *A. tumefaciens*, les gènes de *virB1* à *virB11* sont présents dans un seul opéron alors que *virD4* est encodé séparément. Il est possible de regrouper les 12 protéines exprimées en quatre catégories en fonction de leur rôle ou compartiment cellulaire : les protéines composant le pilus (VirB1, VirB2 et VirB5), les protéines composant le complexe core de la membrane externe (VirB7, VirB9 et VirB10), les protéines composant une plateforme dans la membrane interne (VirB3, VirB6 et VirB8) et les ATPases cytoplasmiques (VirB4, VirD4 et VirB11) (Figure 8). La formation du T4SS se fait initialement par la structure du core complexe de la membrane externe puis les autres éléments sont recrutés afin de stabiliser le complexe dans la membrane interne.

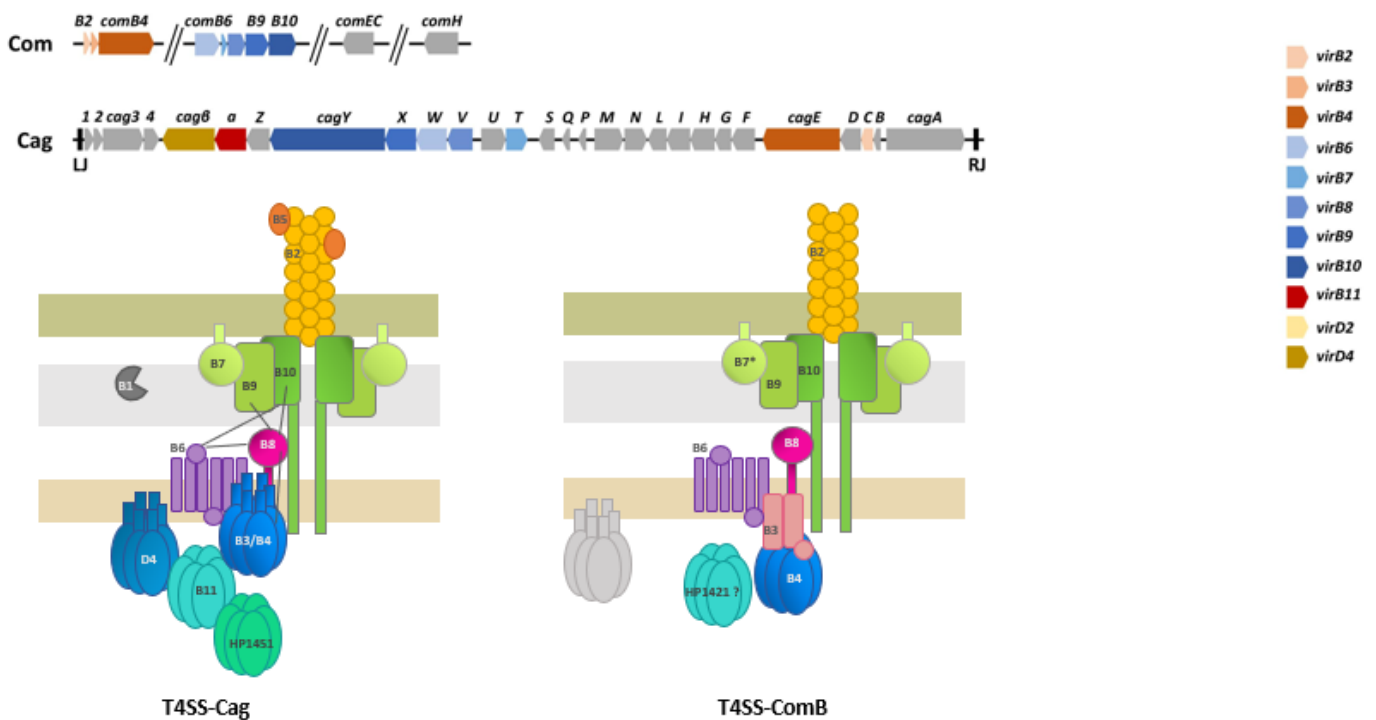


Figure 10 Comparaison des système Cag et ComB chez *H. pylori* (opéron extrait de (Fischer et al., 2020))

Le complexe au niveau de la membrane interne constitue le pôle énergétique du T4SS avec les ATPases VirB4, VirD4 et VirB11 qui possèdent toutes les motifs conservés Walker A et Walker B nécessaires à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP.

Dans la plupart des souches de *H. pylori* il y a au moins deux T4SS complets. Le T4SS cagPAI permet la sécrétion, entre autres, d'une toxine, CagA dans les cellules humaines. C'est le T4SS le mieux caractérisé chez *H. pylori*. L'ADN le codant représente environ 40 kb comportant 28 gènes. Parmi ces 28 gènes, on retrouve ceux codant pour les protéines orthologues de VirB1 à VirB11 ainsi que VirD4 retrouvées dans le modèle d'*Agrobacterium tumefaciens* (Li & Christie, 2018). Cependant, contrairement au T4SS d'*A. tumefaciens*, l'assemblage de la machinerie cagPAI dépend aussi d'une douzaine de protéines Cag, faisant de ce T4SS un cas unique (Fischer et al., 2001). Ce T4SS, possède un complexe core composé de CagT (similaire à VirB7), CagX (VirB9), CagY (VirB10) mais également de deux autres sous unités additionnelles par rapport à *A. tumefaciens*, CagM et Cag3, créant un complexe de taille supérieur à celui observé chez le T4SS d'*A. tumefaciens* (Fischer et al., 2020). Celui-ci est connecté à un pilus extracellulaire dont la composition et la structure ne sont pas complètement connues mais dans lequel participent CagC (VirB2) et CagL (VirB5). La machinerie énergétique de ce système semble similaire à celle observé chez *A. tumefaciens*, composée des homologues de VirB4, VirD4 et VirB11 : CagE, Cag $\beta$  et Cag $\alpha$  respectivement.

Comme décrit précédemment, *H. pylori* utilise le T4SS ComB lors de la transformation naturelle afin d'importer de l'ADNt, contrairement aux autres bactéries compétentes qui utilisent un T4P. Le système ComB est indépendant du système cagPAI. Ce T4SS est responsable des premières étapes de la transformation et permet la capture et l'internalisation de l'ADNt dans le périplasme, faisant de lui un cas unique parmi les T4SS car il permet l'import d'un substrat et non sa sécrétion. ComB est codé par deux opérons : comB2-comB4 et comB6-comB10 (la numérotation suivant la nomenclature chez *A. tumefaciens*) (Hofreuter, Odenbreit & Haas, 2001). Dans un premier temps, à travers de prédiction de séquence et de données expérimentales, ComB8, comB9 et ComB10 (anciennement appelée ComB1, ComB2 et ComB3 respectivement) ont été mis en évidence comme étant des homologues de composant du T4SS CagPAI et impliqués dans la transformation naturelle (Hofreuter et al., 1998). Quelques années plus tard, il est défini que ComB4 et ComB7 à ComB10 sont des composant de ce nouveau T4SS, nécessaires à la transformation naturelle chez *H. pylori* et homologues aux protéines correspondantes chez *A. tumefaciens* (Hofreuter, Odenbreit & Haas, 2001). Un premier modèle est proposé sur ces données (Hofreuter, Karnholz & Haas, 2003). Par la suite, les composant ComB2, ComB3 et Com B6 sont

caractérisés et complètent les données connues sur le système ComB (Chang et al., 2001; Karnholz et al., 2006). Aujourd'hui, nous pouvons proposer que ComB6-ComB10 forment une core complexe allant de la membrane interne à la membrane externe. ComB6 et ComB8 seraient localisées au niveau de la membrane interne alors que ComB7, 9 et 10 formeraient le tronc central traversant le périplasme (Figure 9). Même si la majorité des composants du système ComB sont connus, l'assemblage de ce T4SS reste encore cryptique.

Certaines différences sont à noter entre le système ComB et le modèle d'*A. tumefaciens*. Chez *Agrobacterium*, VirB2 est une piline montrant une interaction directe avec l'ADN (Cascales & Christie, 2004), mais il reste à déterminer si il en est de même pour ComB2 dans le système d'*H. pylori*. De plus, lorsque l'on compare le T4SS ComB à celui d'*Agrobacterium*, on peut observer que certains homologues pour certaines protéines clés : VirB1, VirB5, VirD4 et VirB11, sont absents. L'identification de ces acteurs permettrait peut-être de mieux comprendre la formation de ce système.

L'annotation du génome d'*H. pylori* ne propose qu'une seule ATPase pour le système ComB: ComB4. VirB4 est nécessaire pour la formation du pilus dans le système classique mais aucun pilus de ce type n'a été observé dans le système ComB. La question peut se poser quant à la présence d'homologue de VirD4 et VirB11 et leur potentiel rôle dans le système d'importation d'ADN chez *H. pylori*.

Dans mon étude, je présente un gène qui code pour une protéine homologue de VirB11, qui est indispensable à la transformation naturelle chez *H. pylori*.



## Chapitre II : Résultats





# 1 ComM, une hélicase importante pour la transformation naturelle

## 1.1 Introduction de l'article

Comme décrit précédemment, les majeures étapes de la transformation sont connues mais certains acteurs restent encore à découvrir, en particulier chez *H. pylori*. Dans l'article qui suit, nous nous sommes intéressés à la dernière étape de ce mécanisme : la recombinaison homologe. Cette étape est médiée par RecA et DprA mais l'hélicase ou les hélicases impliquée(s) ne sont pas connues chez *H. pylori*. ComM et RadA sont des hélicases ayant été démontré comme impliquées dans la transformation naturelle chez les bactéries à Gram négatifs et à Gram positifs respectivement. Un homologue de chacune de ces deux protéines est présent chez *H. pylori*. Dans notre étude, nous avons cherché à définir le rôle de celles-ci au sein de *H. pylori*.

## 1.2 Article

**A moonlighting helicase: Dual role of *Helicobacter pylori* ComM in natural transformation and intra-chromosomal recombination**

Mérick Machouri<sup>1,2</sup>, Céline Lacrouts<sup>1,2</sup>, Morgane Ortis-Sanchez<sup>1,2</sup> and J. Pablo Radicella<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>. Université Paris-Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, F-92260 Fontenay aux Roses, France

<sup>2</sup>. Université de Paris-Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, F-92260 Fontenay aux Roses, France

\* Corresponding author: JPR, pablo.radicella@cea.fr

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* is a Gram-negative pathogen that colonises the human stomach of about half the world population (1). In the early 1980s the role of *H. pylori* as the cause of peptic ulcers and as the main etiological factor for various forms of gastric cancers was unveiled. Only 11 years after this discovery, the International Agency for Research on Cancer classified *H. pylori* as a Group 1 carcinogen. While the eradication of the infection by the use of antibiotics proved to be a very efficient strategy to treat ulcers and prevent cancer, development and spread of antibiotic resistance has strongly reduced the efficacy of eradication treatments. Although in *H. pylori* most resistance alleles are the consequence of mutations, the spreading of those alleles in a population is strongly favoured by horizontal gene transfer (HGT). Furthermore, HGT contributes to the propagation of virulence factors and to the generation of variants capable of colonising new hosts. Among the main pathways for HGT, natural transformation is unique in that it only requires proteins produced by the recipient cell. This allows bacteria to capture free DNA present in the environment and integrate it into their genome. Natural transformation involves different steps: binding of the dsDNA to the cell surface (capture), its passage into the periplasm (uptake) and then through the cell membrane to enter the cytosol as a ssDNA (transport) and finally its integration in the bacterial chromosome by homologous recombination (HR) (2, 3). The processing of the transforming ssDNA leading to its recombination into the genome is mediated by a set of proteins, some of which, notably RecA, are common to all HR events but others, like DprA, are specific for natural transformation. Recently, transformation-specific helicases allowing branch migration during the RecA-mediated integration of the transforming ssDNA were described. *radA* (*sms*) was originally identified in *Escherichia coli* as contributing to survival to a variety of genotoxic stresses, including UV irradiation (4, 5). More recent work failed to confirm the UV sensitivity of single null mutants of *radA* (6), but clearly implicated RadA in recombinational repair, both in *E. coli* (6) and in *Bacillus subtilis* (7). Besides its involvement in DNA repair, RadA was also found to be required for natural transformation, first in *Streptococcus pneumoniae* (8) and then in *B. subtilis* (7). Biochemical and structural studies showed that RadA is a DnaB-type helicase capable of driving branch migration and unwinding recombination intermediates (9–11). During the integration of transforming DNA into the

genome of naturally competent Gram-positive bacteria, RadA, in combination with RecA, facilitates the incorporation of the ssDNA and contributes to the acquisition of heterologous sequences (10, 12). While *radA* is broadly conserved and also present in Gram-negative naturally competent bacteria, its inactivation did not affect transformation efficiency in *Vibrio cholerae* nor in *Acinetobacter baylyi* (13). In those strains, another helicase, ComM, plays a similar role during natural transformation (13). *comM* was first found to be necessary for competence in *Haemophilus influenzae* (14). It was then shown that ComM was implicated downstream from DNA uptake. Genetic and biochemical experiments in *V. cholerae* and *A. baylyi* revealed that ComM is a *bona fide* helicase that, by promoting branch migration, allows the incorporation of linked genetic markers and facilitates the integration into the bacterial genome of heterologous DNA during natural transformation (13). Here, we aimed to establish which of RadA or ComM helicases is required for NT in *H. pylori* and whether any of them are implicated in DNA repair.

## RESULTS

### **ComM, but not RadA, is required for natural transformation**

To assess the implication of these two genes in natural transformation, *hp0792* (*comM*) or *hp0223* (*radA*) were inactivated by insertion of non-polar cassettes. Genomic DNA from a strain with a base substitution in *rpsL* conferring streptomycin resistance (Strep<sup>R</sup>) was used as transforming DNA (tDNA). *comM* mutant strains were  $\approx$  200-fold less efficient than the *wild-type* strain in their capacity to generate (Strep<sup>R</sup>) recombinants (Figure 1A). To confirm that the loss of competence was due to the inactivation of *comM*, we complemented the mutant strain by expressing ComM from the *ureA* locus, ruling out non-targeted effects of the inserted cassette. In contrast to what was observed for *comM*, inactivation of *radA* did not affect transformation efficiency.

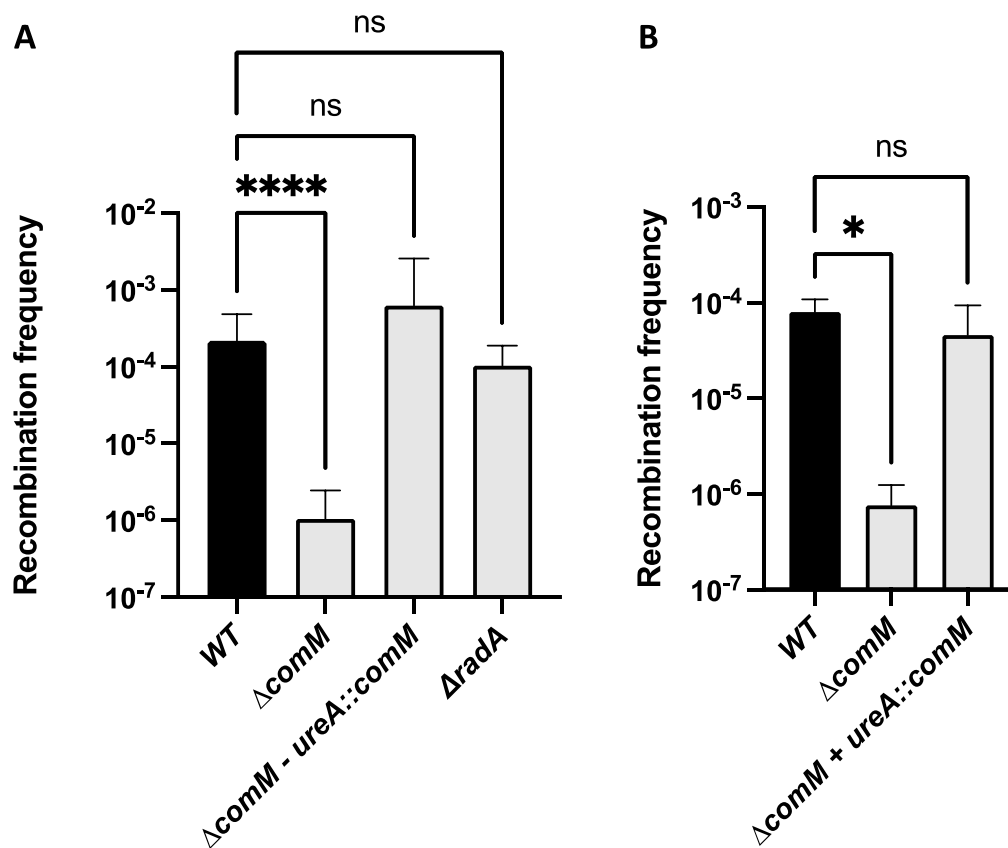


Figure 1 Natural transformation frequencies for *H. pylori* strains

The recombination frequencies of the isogenic streptomycin resistant (*StrepR*) total genomic DNA (A) or the heterologous apramycin gene (B) integration were calculated as the number of streptomycin or apramycin resistance colonies per recipient colony-forming unit. Values correspond to the mean and standard deviation. A Mann–Whitney U test was used for the statistical analysis.  $n > 6$ ,  $p$ -value  $< 0.05$

In order to determine at what level *comM* inactivation affected the process of natural transformation, we analysed the tDNA uptake capacity of the *comM* strain using a PCR-based approach (15). In contrast with what happens in an uptake-deficient  $\Delta comB2$  strain, tDNA accumulated in the periplasm of the *comM* mutant strain essentially at the same level than in that of the *wt* strain (Figure 2) indicating a role of ComM downstream of the capture and uptake of the exogenous DNA.

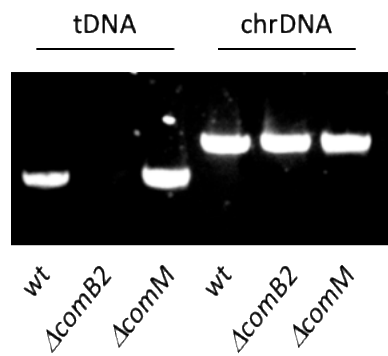


Figure 2 *ComM* is not important for uptake of the DNA in the periplasm.

The presence of donor tDNA in the periplasm was monitored by PCR. The products of amplification were visualised by agarose gel electrophoresis. Comparing to a *comB2* mutant impairing the uptake of the tDNA in the periplasm.

### The tDNA integration pattern is not dependent on *comM*

In *V. cholerae* and *A. baylyi*, *ComM* was shown to favour the comigration of linked markers, supporting the proposed role of the protein in branch migration during the integration of the tDNA. While the transformation frequency is drastically reduced in *H. pylori comM* strains, a significant number of recombinant clones are recovered after transformation (Figure 1). To test whether *ComM* has a similar role in *H. pylori* to that found in other species, we compared the lengths of the integrated tDNA in the *comM* and parental strains. For that, we sequenced around 4 kb of the *rpsL* region from *Strep*<sup>R</sup> clones obtained by natural transformation of *wt* and *comM* strains with a 26695 genetic background using genomic DNA from a *Strep*<sup>R</sup> SS1 strain. SS1 and 26695 display in the sequenced region about one polymorphism (single or double base differences) every 37 bp in average, thus allowing a rough estimate of the length of the incorporated tDNA for each recombinant clone. Consistently with previous findings, the average integration patch around the *rpsL* locus in the *wt* strain was 959 bp (Figure 3). Unexpectedly, there was only a small decrease in the length of the imported fragments for the *comM* strain (774 bp), indicating that *ComM* is not essential for the extension of the integrated DNA fragment during natural transformation of *H. pylori*.

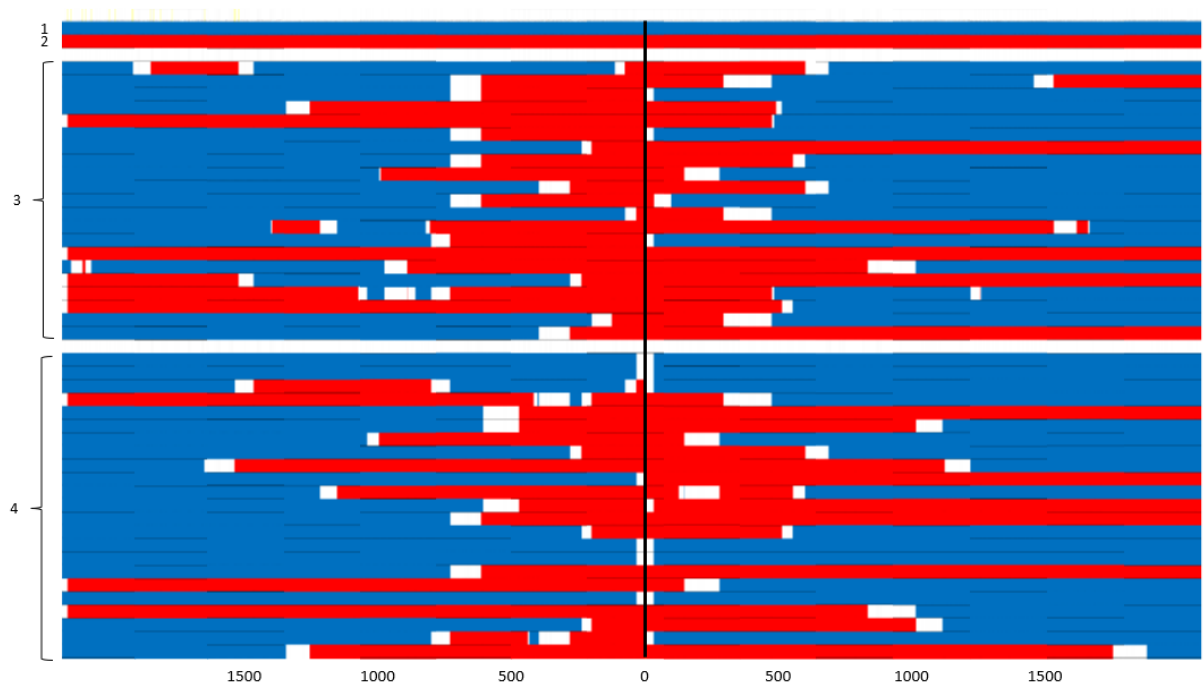


Figure 3 Imports event of SS1 strepR total genomic DNA in 26695 wt and  $\Delta comM$  by natural transformation

Each row represents 3750 bp of the *rpsL* gene and flanking region. The vertical black line corresponds to the *StrepR* point mutation. The blue row annotated 1 represents the recipient 26695 wt sequence, the red row annotated 2 represents the SS1 sequence. 3 correspond to the 21 wt clones and 4 to the 23  $\Delta comM$  clones.

Segments surrounded by two sites identical to the SS1 donor is shown in red, any segment surrounded by two sites identical to the 26695-recipient strain is shown in blue, the other segments are in white. Hence, for each row, blue indicates the recipient DNA, the red indicates the donor DNA and the white indicates DNA of unresolved origin.

*ComM* in *V. cholerae* was also shown to facilitate the integration of tDNA harbouring heterologies larger than single-nucleotide polymorphisms (13). If this was also the case in *H. pylori*, inactivation of *comM* should have a stronger impact in the acquisition of apramycin resistance by natural transformation, which implies the integration of an 842 bp heterologous region, when compared to the observed impairment in the incorporation of the single base substitution conferring *Strep<sup>R</sup>*. We found that the reduction in the recovery of apramycin-resistant recombinants observed in a *comM* strain was similar to that observed in the acquisition of the single nucleotide polymorphism (Figure 1B). This result indicates that *ComM* is not particularly required for the integration of large heterologous sequences into the *H. pylori* genome.



## ComM is required for intra-chromosomal recombination but not for DNA damage repair

Because of the differences described above with respect to other species in the role of ComM during natural transformation and the sometime contradictory reports on RadA impact in DNA repair, we wanted to determine if in *H. pylori* either of these helicases participated in the repair DNA of DNA damage. With that purpose we tested survival of the mutant *comM* or *radA* strains to exposure to UV or  $\gamma$ -radiation. Both genotoxic treatments induce DNA lesions that can be repaired by homologous recombination. As a control we included in the assays a *recA* mutant strain. As expected, inactivation of *recA* rendered the strain extremely sensitive to both treatments (Figure 4). In contrast, the *comM* mutant was as resistant to both irradiation modes as the parental strain, indicating that ComM is either not involved in DNA repair or has a redundant function in these pathways. Interestingly, *H. pylori radA* mutant showed increase sensitivity to UV but not to ionising radiation (Figure 4).

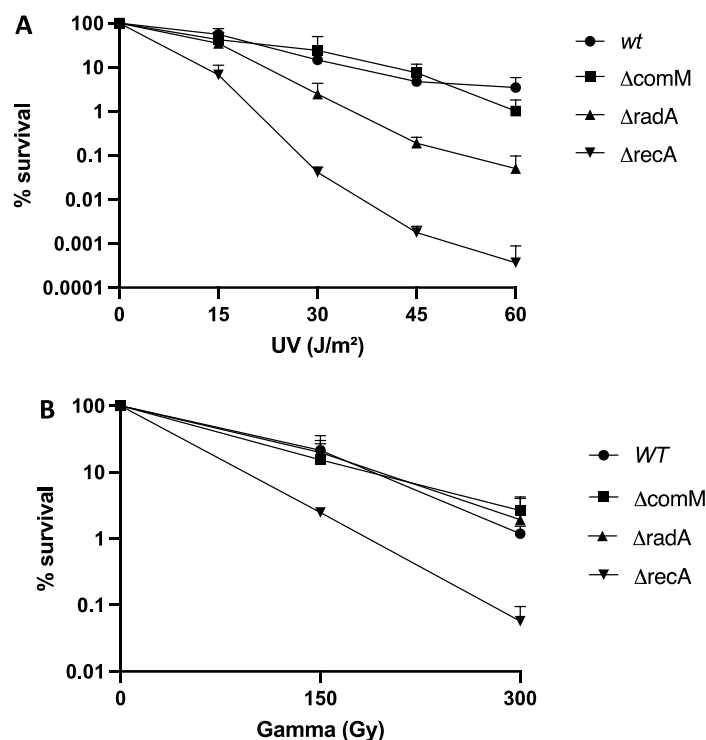


Figure 4 Sensitivity of the *comM* and *radA* mutant to ionising exposure.

Irradiations were performed as described in the Materials and Methods. A, sensitivity to UV exposition. B, sensitivity to gamma radiation. the mean of 4 to 6 independent experiments is represented.

Homologous recombination also plays a role in the recombination of repeated sequences present in the chromosome. We previously showed that while RecOR and AddAB participate in this *recA*-mediated process and that inactivation of DprA, the transformation-specific mediator protein responsible for the loading of RecA on the transforming ssDNA, did not affect the efficiency of intra-chromosomal recombination (16, 17). However, because ComM is also conserved in species not known to be naturally transformable (13), we decided to test whether in *H. pylori* was implicated in the recombination of repeats. For that purpose, we used a construct harbouring an apramycin resistance cassette flanked on both sides by a 358 bp repeat that can recombine to excise the Apra<sup>R</sup> cassette and reconstitute a functional kanamycin resistance gene (17) (Figure 5A). By measuring the spontaneous frequency of Kan<sup>R</sup> clones we compared the intra-chromosomal recombination efficiency in the different strains. As expected, the appearance of recombinant clones was >10-fold lower in the *recA* mutant when compared to the parental strain (Figure 5B). Surprisingly, the *comM* mutant displayed a strong defect in intra-chromosomal recombination, comparable to that of the *recA* strain. This phenotype was complemented by ectopic expression of ComM. In contrast, the frequency of Kan<sup>R</sup> clones in the *radA* mutant, albeit slightly lower, was not significantly different from that of the parental strain.

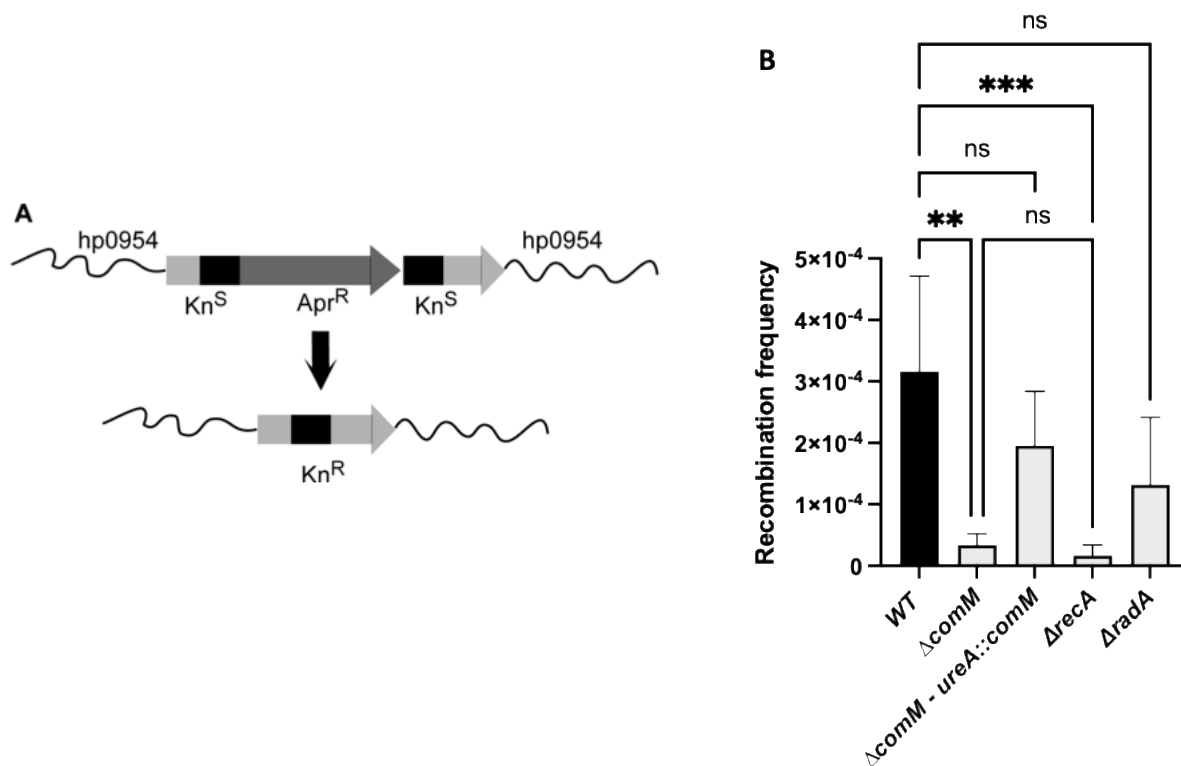


Figure 5 ComM and RadA involvement in genomic DNA repeats recombination.

A, Description of the experimental system (ref Marsin et al., 2008). B, the recombination frequencies of the functional kanamycin gene were calculated as the number of kanamycin resistance colonies per total colony-forming unit. Values correspond to the mean and standard deviation. A Mann–Whitney U test was used for the statistical analysis.  $8 < n < 13$ ,  $p$ -value  $< 0.05$

## DISCUSSION

Helicases are essential components of the recombination machinery. They intervene at the later steps of the recombination process, allowing branch migration. In *H. pylori* there is contradictory information on the identity of the helicases participating in natural transformation. The role of the canonical RuvABC system for branch migration and resolution during natural transformation has been explored (18). While reports showed a strong effect of the inactivation of the RuvB helicase (19), and the associated resolvase RuvC (20), in another, neither inactivation of *ruvB*, nor that of *ruvC* affected natural transformation frequencies (21). Recent work has identified two helicases, RadA and ComM, as involved in branch migration for the integration of tDNA during natural transformation in Gram-positive and Gram-negative competent bacteria, respectively (7, 10, 11, 13). Based on the fact that *comM* orthologues are absent in all known naturally transformable Gram-positive species, it

was proposed that ComM and RadA have similar functions during natural transformation (13). *H. pylori*, as most Gram-negative competent bacteria, has both ComM and RadA homologs, raising the question of their respective roles. Here we confirmed that as in *V. cholerae* where both helicases are present (13), in *H. pylori* ComM but not RadA is involved in natural transformation. Conversely, RadA, but not ComM is required for DNA repair. Although the original experiments in *E. coli* identified *radA* by the sensitivity of the mutant to genotoxic stresses including UV (4), more recent work needed the combination of *radA* inactivation with that of other recombination genes to unveil the role of RadA in the repair of UV-induced lesions (6). Exposure to UV, of the single *H. pylori radA* mutant lead to a diminished survival when compared to the parental strain. Surprisingly, the *radA* mutant did not show hypersensitivity to ionising radiation. Experiments exploring the sensitivity of *B. subtilis radA* mutants to a series of genotoxic treatments (7) confirmed the role of this helicase in DNA repair but did not determine whether *radA* inactivation affected survival to UV or ionising radiation. It therefore remains to be determined if the sensitivity pattern we observed for the *radA* mutants is unique to *H. pylori* or it can be generalised.

Our experiments confirmed that as in the other naturally competent Gram-negative bacteria studied, namely *H. influenzae*, *V. cholerae* and *A. baylyi*, in *H. pylori* ComM plays a major role in natural transformation. However, our results reveal some important differences. In *V. cholerae* and *A. baylyi* it was shown that ComM has a crucial role in determining the length of the tDNA sequence integrated into the recipient chromosome, in agreement with the capacity of the protein to favour branch migration (13). In contrast, in *H. pylori* the size of the acquired sequences in a *comM* mutant was not different from that of the *wt* strain. Our results showing the same proportion of small insertions in the *wt* and *comM* strains suggest that a major role for *H. pylori* ComM in defining the mosaic pattern of tDNA integration displaying a fraction of insertions of less than 100 bp (22, 23) can be ruled out. So far, UvrC is the only protein identified as necessary for the generation of these micro-imports (24, 25).

Another important difference we found in *H. pylori* is that ComM is critical for transformation efficiency independently of the level of heterology of the tDNA. In both, *V. cholerae* and *A. baylyi*, the integration of a 29 bp heterology was severely impaired in a *comM* mutant when compared to the parental strain (500- and 85-fold, respectively) while the

transformation efficiency for the acquisition of a single nucleotide polymorphism was only 15- and 7-fold down, respectively (13). This is a small reduction when compared to the > 200-fold we found here for the *H. pylori comM* mutant strain. Moreover, in *H. pylori* the effect of the inactivation of *comM* on the integration of large heterologous sequence is comparable to that in the acquisition of a single-nucleotide polymorphism, indicating that while HpComM is critical for the integration of the tDNA, it does not play a particular role favouring the acquisition of heterologous sequences. Interestingly, in *H. influenzae*, where *comM* was first identified as important for natural transformation, the selection used was also that of a single nucleotide marker conferring Strep<sup>R</sup> (26) and revealed a 300-fold reduction in the recovery of antibiotic resistant clones in the *comM* strain with respect to a *wt* (14). Taking together, these results suggest that in *V. cholerae* and *A. baylyi* ComM, like RadA in the Gram-positive naturally competent species (10, 12), has a more specific role in facilitating the integration of large fragments and heterologous sequences. In contrast, in *H. influenzae* and *H. pylori*, ComM seems to have a general role in the natural transformation process, independently of the size and degree of homology of tDNA sequences to be integrated into the bacterial genome.

Finally, we unveiled an essential role of ComM in RecA-mediated recombination between genomic repeated sequences. This was unexpected since we had previously shown that this type of recombination did not require DprA, the transformation-specific RecA loader (17). This role, independent of natural transformation, could explain the widespread conservation of ComM in non-competent Gram-negative non-competent species (13).

Taken together, the results presented in this work revealed new functions for the ComM helicase, both in transformation-associated or not homologous recombination processes, raising the question about the molecular mechanisms underlying them.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and growth conditions

*H. pylori* strains are listed in Table 1. Cultures were grown under microaerophilic conditions (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, using the MAC-MIC system from AES Chemunex) at 37 °C. Blood agar base medium (BAB) supplemented with 10% defibrillated horse blood (AES) was used for plate cultures. Liquid cultures were grown in brain heart infusion media (BHI) supplemented with 10% defibrillated and decomplexed fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with constant shaking (180 rpm). Antibiotic mix containing polymyxin B (0.155 mg/ml), vancomycin (6.25 mg/ml), trimethoprim (3.125 mg/ml), and amphotericin B (1.25 mg/ml) was added to both plate and liquid cultures.

### Construction of gene variants

*H. pylori* 26695, a kind gift from Agnès Labigne (Institut Pasteur), was used as parental strain to generate all the gene variants. The gene sequences were obtained from the annotated complete genome sequence of *H. pylori* 26695 deposited at Pylori Gene WorldWide Web Server (<http://genolist.pasteur.fr/PyloriGene/>). For chromosomal integrations/replacements of gene variants, the specific gene regions (with 200bp of flanking sequences) were amplified from genomic DNA (gDNA) of *H. pylori* 26695 strain using sequence specific primers (Table X) and cloned in pJET1.2 (2974 bp) vector by using sequence- and ligation-independent cloning (SLIC). Further, the cassette encoding either the antibiotic resistance or indicated protein tag were introduced in the gene construct by SLIC. For the markerless deletion of *comM*, a difH-flanked *rpsL*-cat cassette (27) was used and introduced in a plasmid containing the *comM* gene as previously described. All the plasmids harbouring different gene constructs (listed in Supplementary Table 4) were verified by DNA sequencing and introduced into *H. pylori* by natural transformation. Transformants were selected by using appropriate required antibiotics: kanamycin (20 µg/ml), apramycin (12.5 µg/ml), and chloramphenicol (8 µg/ml). The correct constructions were verified by PCR using locus and

gene specific primers. The glycerol stocks of *H. pylori* were prepared in BHI media supplemented with 12.5% glycerol and stored in -80 °C.

### **Determination of natural transformation efficiencies**

Exponentially growing *H. pylori* cells (optical density of 4.0 at 600 nm) were incubated with 200 ng of total chromosomal DNA from an isogenic Strep<sup>R</sup> or Apra<sup>R</sup> strains on Blood Agar Base (BAB) plates for 24 h at 37 °C. Next day, serial dilutions of *H. pylori* cells were plated on BAB plates with or without streptomycin (10 µg/ml) or apramycin (12.5 µg/ml) and incubated for 4–5 days at 37 °C. The recombination frequencies were calculated as the number of streptomycin or apramycin resistant colonies per recipient colony-forming unit. P values were calculated using the Mann–Whitney U test on GraphPad Prism software.

### **DNA uptake**

The presence of tDNA in the periplasm of *H. pylori* was detected using protocol described in (15). Briefly, exponentially growing *H. pylori* cells (1 OD/ml at 600 nm) were incubated with 250 ng of linear plasmid (restriction digestion of p1391 by NcoI-HF) in BHI supplemented with 10% fetal bovine serum for 15 min at 37 °C under microaerophilic conditions. The cells were washed with PBS and the excess non-internalised DNA was degraded by nuclease cocktail [DNaseI (50 U/ml), Benzonase (62.5 U/ml) in 1× PBS, and 10 mM MgCl<sub>2</sub>] treatment at 37 °C for 20 min. The cells washed and the total DNA was extracted using phenol-chloroform. The supernatant was directly used as template for PCR using Q5 DNA polymerase. A 1.1 kb donor specific region was amplified using primers Op284 and Op285, while a (1.4 kb) *H. pylori* gDNA specific region (hp0247) was amplified using primers Op31 and Op32. The PCR fragments were visualised by agarose gel electrophoresis (1% stained with CYBR-Gold (1:10,000 dilution)).

### Length of tDNA insertion

Exponentially growing *H. pylori* cells of the wt and  $\Delta comM$  (optical density of 4.0 at 600 nm) were incubated with 200 ng of total chromosomal DNA from an SS1 Strep<sup>R</sup> strains on Blood Agar Base (BAB) plates for 24 h at 37 °C. Next day, cells were plated on BAB plates with streptomycin (10 µg/ml) and incubated for 4–5 days at 37 °C. Colonies were then amplified on BAB plates with streptomycin (10 µg/ml) and incubated for 24h at 37 °C. Next day, the total genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). The genomic DNA was used as template to amplify a 4kb surrounding the *rpsL* gene by PCR using the Q5 DNA polymerase and the primers Op1004 and Op1005. The PCR product was purified and sequenced by Eurofins genomics (using the primers RpsL1, 5, 6 and 7 listed in the corresponding table). The sequences were aligned, and polymorphism insertion were analyzed by using BioEdit software. Since we do not know exactly where the insertion starts and ends, we calculated the maximum likelihood mean length of DNA insertion (23):

$$L(\delta) = \prod_{i=1}^N \left( \left(1 - \frac{1}{\delta}\right)^{m_i} - \left(1 - \frac{1}{\delta}\right)^{M_i} \right)$$

Where N is the number of observations, m and M the minimum and maximum length for each observation (M=∞ if the beginning or end is outside the sequenced region).

### UV- and ionising-irradiation survival assay

Exponentially growing *H. pylori* cells (optical density of 10.0 at 600 nm) were serially diluted up to 10<sup>-6</sup>. Spots of 15 µl were plated on BAB medium and allowed to dry. Plates were then exposed to UV radiation (264 nm at 1 J.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) or exposed to γ-radiations from cesium 137 delivering 20 Gy.min<sup>-1</sup>. Plates were incubated 3 to 4 days at 37°C in microaerophilic conditions. The survival frequencies were calculated as the number of colonies compared to the non-irradiated colonies. P values were calculated using the Mann–Whitney U test on GraphPad Prism software.



### **Intragenomic recombination**

Exponentially growing *H. pylori* cells on apramycin plates (optical density of 1.0 at 600 nm) were incubated on Blood Agar Base (BAB) plates for 24 h at 37 °C. Next day, serial dilutions were plated on BAB plates with or without kanamycin (10 µg/ml) and incubated for 4–5 days at 37 °C. The recombination frequencies were calculated as the number of kanamycin resistance colonies per total colony-forming unit. P values were calculated using the Mann–Whitney U test on GraphPad Prism software.

### List of *H. pylori* stains

Strain	Genotype	Source
1	26695 <i>wt</i>	
1187	26695 <i>comM::kan</i>	This work
1182	26695 <i>radA::kan</i>	This work
1241	26695 <i>comM::kan + ureA::comM-Cm</i>	This work
1232	26695 <i>comM::Cm</i>	This work
312	26695 <i>recA::Apra</i>	Marsin et al., 2008
436	26695 <i>rdxA::KDA</i>	Marsin et al., 2008
438	26695 <i>rdxA::KDA recA::Cm</i>	Marsin et al., 2008
1229	26695 <i>rdxA::KDA radA::Cm</i>	This work
1317	26695 <i>rdxA::KDA + comM-markerless</i>	This work
1319	26695 <i>rdxA::KDA + comM-markerless + ureA::comM-Cm</i>	This work
1316	SS1 <i>rpsL</i> A263G	This work

## List of primers

Name	Sequence 5'-3'	Description
Op325	gagaatattgtaggagatcttctagaaagatgcaataccaaaaactagagaaaatggc	Construct HP0223 (RadA) For Eco47-HP0223up
Op326	ccggatggctcgagttttcagcaagatatgtttcactcgttgcataattgctcc	Construct HP0223 (RadA) Rev Eco47-HP0223dw
Op327	ggagcaattatgcaagcgagtgaaaacatatcttctgtaaaaaactcgagccatccgg	Construct HP0223 (RadA) For HP0223dw-Eco47
Op328	gccattttctagtttttggtattgcatctttctagaagatctctacaatattctc	Construct HP0223 (RadA) Rev Eco47-HP0223up
Op329	gagaatattgtaggagatcttctagaaagataaggtaagatagagtatcaaaaccg	Construct HP0792 (ComM) For Eco47-HP0792up
Op330	ccggatggctcgagttttcagcaagatggttcattctgcttgatgaaagc	Construct HP0792 (ComM) Rev Eco47-HP0792dw
Op331	gctttcatcaagcagaatgaacctcttctgtaaaaaactcgagccatccgg	Construct HP0792 (ComM) For HP0792dw-Eco47
Op332	cggtttgatactctatcttaaccttatctttctagaagatctctacaatattctc	Construct HP0792 (ComM) Rev Eco47-HP0792up
Op341	gttttatctgtgtgattttaaaaagagtggtggctaaaaatgagaatatca	Construct HP0223 (RadA)-Kan For HP0223up/20nt HP0223-KanR
Op342	caaaagtccaatcacatccattcaacaatcttaaaacaattcatccagtaaaata	Construct HP0223 (RadA)-Kan Rev 20nt HP0223+HP0223dw – KanR
Op343	tattttactggatgaattgttttagagattgttgaatggatgtgattggaacttttg	Construct HP0223 (RadA)-Kan For KanR- 20nt HP0223+HP0223dw
Op344	tgatattctcattttagccatccactctttttaaaaatcacacagataaaaaac	Construct HP0223 (RadA)-Kan Rev HP0223up (+20nt HP0223)-KanR
Op345	gtaacaacctgattaacacgatgttttgatggctaaaaatgagaatatcaccg	Construct HP0792-Kan For HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op346	cttataaaaatccttttaagaatctttctaaaccttaaaacaattcatccagtaaaat	Construct HP0792-Kan For HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op347	attttactggatgaattgttttaggttttagaaagatttctaaaggattttataag	Construct HP0792-Kan For 20nt HP0792/HP0792 - KanR
Op348	cggatgattctcattttagccatcaaaacatcgtttaatcatggtgttac	Construct HP0792-Kan Rev HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op357	ccatgattaacacgatgttttgcgacctgatggctaaaaatgagaatatcaccg	Construct HP0792 – Kan For HP0792up (+30nt HP0792)-KanR
Op358	ccttttaagaaatctttctaaacctcagcgtttctaaacaattcatccagtaaaat	Construct HP0792 – Kan Rev KanR - 30nt HP0792/HP0792 dw
Op359	attttactggatgaattgttttagaaagcgtgagttttagaagatttctaaagg	Construct HP0792 – Kan For KanR - 30nt HP0792/HP0792 dw

Op360	cggtgatattctcatttttagccatcatggctcgcgcaaacatcgtgtaatcatgg	Construct HP0792 – Kan Rev HP0792up (+30nt HP0792)-KanR
Op478	gaaaaacactttaagaataggagaataaggaaatcatgattaacacgatgttttcg	Construct ComM-UreA For Promoter urea- ComM
Op479	gccatttattcctcctagttagtcacccgggtaccttaagaaatcttctaaaac	Construct ComM-UreA Rev ComM-plasmid-KanR
Op480	gttttagaaagatttctaaggtaccgggtgactaactaggaggaataaatggc	Construct ComM-UreA For ComM-plasmid-KanR
Op481	cgcaaacatcgtgtaatcatgaattccttattctcctattcttaaagtgttttc	Construct ComM-UreA Rev Promoter urea- ComM
Op880	caaaacacgagtaacaacctcgagatttaaagttg	Markerless comM For insert
Op881	ttcccttataaaaatccttatcgatcatttagttatg	Markerless comM Rev insert
Op950	caaaactttaaatctcgaggtgttactcgtgttttg	Markerless comM For vector
Op951	cataactaaatgatcgataaggattttataaggagaa	Markerless comM Revvector
Op952	agttttagagagatttctgattacaaggatgacgacgataagtaa	ComM - K504E Hp For
Op953	ttacttatcgtcgtcatccttgaatcagaaatctctctaaaact	ComM - K504E Hp Rev
Op974	gagttttagagagatttcttaaatagaacg	ComM - K504E Hp For
Op975	agcgctttaagcatgtgag	ComM - K504E Hp Rev
Op1004	agcgccaaagggcgtgtg	rpsL 4kb For
Op1005	accaccgcttgcttagcg	rpsL 4kb Rev
RpsL 1	cttaggacttacacgaa	Eurofins sequencing
RpsL 5	accctaaagcttgat	Eurofins sequencing
RpsL 6	gcctaactcggcttaagaaagg	Eurofins sequencing
RpsL 7	gtggtattcacaccgggtaaatcc	Eurofins sequencing

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sumedha Kondekar for inspiring discussions. This work was funded by grant ANR-19-CE12-0003-01 from the Agence Nationale de la Recherche. MM was recipient of a fellowship from the INSTN, CEA.

## REFERENCES

1. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153:420–429.
2. Dubnau D, Blokesch M. 2019. Mechanisms of DNA Uptake by Naturally Competent Bacteria. *Annu Rev Genet.*
3. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12:181–196.
4. Diver WP, Sargentini NJ, Smith KC. 1982. A Mutation (*radA100*) in *Escherichia coli* That Selectively Sensitizes Cells Grown in Rich Medium to X- or U.V.-radiation, or Methyl Methanesulphonate. *Int J Radiat Biol* 42:339–346.
5. Song Y, Sargentini NJ. 1996. *Escherichia coli* DNA repair genes *radA* and *sms* are the same gene. *J Bacteriol* 178:5045–5048.
6. Beam CE, Saveson CJ, Lovett ST. 2002. Role for *radA/sms* in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:6836–6844.
7. Torres R, Serrano E, Tramm K, Alonso JC. 2019. *Bacillus subtilis* RadA/Sms contributes to chromosomal transformation and DNA repair in concert with RecA and circumvents replicative stress in concert with DisA. *DNA Repair (Amst)* 77:45–57.
8. Burghout P, Bootsma HJ, Kloosterman TG, Bijlsma JJE, De Jongh CE, Kuipers OP, Hermans PWM. 2007. Search for genes essential for pneumococcal transformation: The RadA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *J*

Bacteriol 189:6540–6550.

9. Cooper DL, Lovett ST. 2016. Recombinational branch migration by the RadA/Sms paralog of RecA in *Escherichia coli*. *Elife* 5.
10. Marie L, Rapisarda C, Morales V, Bergé M, Perry T, Soulet AL, Gruget C, Remaut H, Fronzes R, Polard P. 2017. Bacterial RadA is a DnaB-Type helicase interacting with RecA to promote bidirectional D-loop extension. *Nat Commun* 8.
11. Torres R, Serrano E, Alonso JC. 2019. *Bacillus subtilis* RecA interacts with and loads RadA/Sms to unwind recombination intermediates during natural chromosomal transformation. *Nucleic Acids Res* 47:9198–9215.
12. Serrano E, Ramos C, Alonso JC, Ayora S. 2021. Recombination proteins differently control the acquisition of homeologous DNA during *Bacillus subtilis* natural chromosomal transformation. *Environ Microbiol* 23:512–524.
13. Nero TM, Dalia TN, Wang JCY, Kysela DT, Bochman ML, Dalia AB. 2018. ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Res* 46:6099–6111.
14. Gwinn ML, Ramanathan R, Smith HO, Tomb JF. 1998. A new transformation-deficient mutant of *Haemophilus influenzae* Rd with normal DNA uptake. *J Bacteriol* 180:746–748.
15. Damke PP, Di Guilmi AM, Fernández Varela P, Velours C, Marsin S, Veaute X, Machouri M, Gunjal G V., Rao DN, Charbonnier JB, Radicella JP. 2019. Identification of the periplasmic DNA receptor for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *Nat Commun* 10:1–11.
16. Marsin S, Lopes A, Mathieu A, Dizet E, Orillard E, Guérois R, Radicella JP. 2010. Genetic dissection of *Helicobacter pylori* AddAB role in homologous recombination. *FEMS Microbiol Lett* 311:44–50.
17. Marsin S, Mathieu A, Kortulewski T, Guérois R, Radicella JP. 2008. Unveiling Novel RecO Distant Orthologues Involved in Homologous Recombination. *PLOS Genet* 4:e1000146.
18. Sharples GJ, Ingleston SM, Lloyd RG. 1999. Holliday junction processing in bacteria:

- Insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J Bacteriol* 181:5543–5550.
19. Kang J, Blaser MJ. 2008. Repair and antirepair DNA helicases in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 190:4218–4224.
  20. Loughlin MF, Barnard FM, Jenkins D, Sharples GJ, Jenks PJ. 2003. *Helicobacter pylori* mutants defective in RuvC Holliday junction resolvase display reduced macrophage survival and spontaneous clearance from the murine gastric mucosa. *Infect Immun* 71:2022–2031.
  21. Humbert O, Dorer MS, Salama NR. 2011. Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination. *Mol Microbiol* 79:387–401.
  22. Bubendorfer S, Krebs J, Yang I, Hage E, Schulz TF, Bahlawane C, Didelot X, Suerbaum S. 2016. Genome-wide analysis of chromosomal import patterns after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *Nat Commun* 2016 7:1–12.
  23. Kulick S, Moccia C, Didelot X, Falush D, Kraft C, Suerbaum S. 2008. Mosaic DNA Imports with Interspersions of Recipient Sequence after Natural Transformation of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 3:e3797.
  24. Moccia C, Krebs J, Kulick S, Didelot X, Kraft C, Bahlawane C, Suerbaum S. 2012. The nucleotide excision repair (NER) system of *Helicobacter pylori*: role in mutation prevention and chromosomal import patterns after natural transformation. *BMC Microbiol* 12:67.
  25. Ailloud F, Estibariz I, Pfaffinger G, Suerbaum S. 2022. The *Helicobacter pylori* UvrC Nuclease Is Essential for Chromosomal Microimports after Natural Transformation. *MBio* 13.
  26. Herriott RM, Meyer EM, Vogt M. 1970. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 101:517–524.
  27. Debowski AW, Carnoy C, Verbrugghe P, Nilsson HO, Gauntlett JC, Fulurija A, Camilleri T, Berg DE, Marshall BJ, Benghezal M. 2012. Xer Recombinase and Genome Integrity in *Helicobacter pylori*, a Pathogen without Topoisomerase IV. *PLoS One* 7:e33310.

### 1.3 Une nucléase YraN en lien avec ComM

Une nucléase très conservée chez les bactéries à Gram négatif, YraN, a été identifiée comme jouant un rôle lors de la transformation naturelle chez *Legionella pneumophila*, *A. baylyi* et *A. nosocomalis*. YraN travaille de pair avec ComM pour promouvoir l'extension de la D-loop et l'intégration de large séquences d'ADN (Hardy, 2021). Nous avons identifié une protéine homologue à YraN chez *H. pylori*, HP0823, dont la fonction est encore inconnue. Une mutation de *yraN* chez *H. pylori* entraîne une diminution du taux de transformation similaire à un mutant *comM* (Figure 11). Une double mutation des gènes *comM* et *yraN* présente un taux de transformation similaire à celui des simples mutants suggérant un rôle de ces deux protéines dans la même voie. Ces résultats sont concordants avec le phénotype observé chez *Legionella pneumophila* (Hardy, 2021).

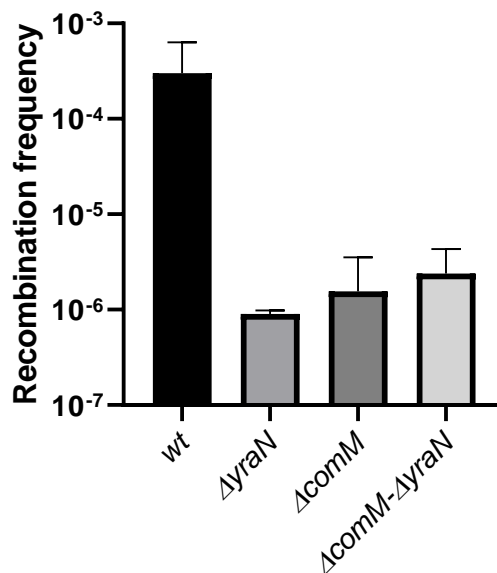


Figure 11 Taux de transformation naturelle chez le mutant *yraN*.

### 1.4 ComM interagit avec DprA

Nous avons montré que ComM était impliquée dans la transformation naturelle, nous avons donc cherché à savoir comment ComM s'intégrait dans le mécanisme de transformation. Une étude a mis en évidence que le gène codant pour ComM n'est présent que dans les espèces où DprA présente un domaine C-terminal aussi appelé DD3 (Brimacombe et al., 2015). Le domaine C-terminal de DprA est nécessaire pour la transformation naturelle chez *H. pylori* (Lisboa et al., 2019). Il possède un motif « winged helix » (WH), connu pour lier



l'ADN double brin mais ce domaine C-terminal de DprA ne lie ni l'ADN double brin ni le simple brin (Lisboa et al., 2019). Sa fonction reste donc à déterminer. Une hypothèse avancée par les auteurs est celle d'un possible rôle de ce domaine C-terminal dans l'interaction avec d'autres protéines participant de la transformation naturelle (Lisboa et al., 2019). Nous avons donc analysé cette possibilité en utilisant la méthode de double hybride bactérien.

Les premiers essais que nous avons réalisés utilisant les protéines entières fusionnées aux domaines catalytiques T18 et T25 de l'adénylate cyclase n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre ComM et DprA (Tableau 2). L'absence d'observation d'interaction entre les protéines entières peut venir des domaines T18 et T25 qui sont liés à celles-ci ce qui empêcherait l'interaction soit par encombrement stérique soit par modification de la structure de la zone interagissant avec l'autre protéine. Comme cité précédemment, Brimacombe *et al.* (2015) ont observé que ComM n'était présent que lorsque DprA possède un domaine C-terminal, nous avons donc cherché à savoir si ComM interagissait avec le domaine C-terminal de DprA seul. En effet, nos essais de double hybride ont montré que le domaine C-terminal de DprA fusionné en N-terminal au domaine T25 peut interagir avec la protéine ComM fusionnée en N ou C-terminal au domaine T18 (Tableau 2).

Tableau 2 Interaction entre les protéines ComM et DprA par double hybride bactérien.

	pKT25-Zip	pKT25	T25-DprA	DprA-T25	WH-T25
pUT18C-Zip	1970 ± 321				
pUT18C		36 ± 20			
DprA-T18				568 ± 390	
ComM-T18			38	38 ± 1	328 ± 194
T18-ComM			33	44 ± 4	304 ± 217
ComM-Nter-T18			40 ± 4	50 ± 23	44 ± 6
ComM-Cter-T18			42 ± 12,	45 ± 10	57 ± 25

Les valeurs correspondent à l'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en unités de Miller A414/min/ml/OD600. En vert, les combinaisons présentant une interaction ; en rouge, les combinaison présentant pas d'interaction.

Comme décrit dans l'article, ComM possède 2 rôles chez *H. pylori* : dans la transformation naturelle et dans la recombinaison de séquences répétées dans le génome.

Nous savons que DprA est une protéine spécifique de la transformation naturelle et qu'elle n'est pas impliquée dans la recombinaison de séquences répétées dans le génome (Marsin et al., 2008). De ce fait, nous nous sommes interrogé sur plusieurs questionnement : est-ce que l'interaction entre ComM et DprA est nécessaire à la transformation naturelle ? Est-ce que cette interaction a un impact sur la recombinaison intra-génomique de séquences répétées ? Si cette interaction joue un rôle dans la transformation naturelle, notre prédiction est qu'en interférant avec l'interaction avec DprA, on pourrait abolir le rôle de ComM dans la transformation mais maintenir celui dans la recombinaison intra-génomique et obtenir ainsi une séparation de fonctions. Notre stratégie était donc de trouver un moyen d'interrompre l'interaction entre les deux protéines et voir l'impact que ceci aurait sur la transformation et la recombinaison intra-génomique. Afin d'identifier des mutations qui affecteraient l'interaction, Raphaël Guerois et Jessica Andreani de l'I2BC à Paris-Saclay ont réalisé une étude de coévolution chez l'ensemble des espèces bactériennes possédant ComM et DprA présentant ce domaine C-terminal. A l'issue de cette analyse, un premier modèle de surface d'interaction entre les deux protéines a été mis en avant pour définir la zone d'interaction. Raphaël et Jessica ont donc pu proposer des mutations de résidus au niveau de cette zone d'interaction qui aboutiraient à l'inhibition de l'interaction entre les deux protéines. Les mutations proposées au sein des deux protéines sont listées dans le tableau 3. Elles ont été introduites sur le domaine WH de DprA et ComM et leur impact sur l'interaction a été évalué par double hybride bactérien (Tableau 4).

*Tableau 3 Liste des mutations proposé pour inhiber l'interaction entre ComM et DprA d'après le premier modèle de surface d'interaction*

	Mutations
DprA	D245K, L248A, E249R, L252A/E, E251R
ComM	F465A/Q, K493D, L497A/E, K504E, R464E
Compensatoires	K493D + D245K ou K493D + E249R

Sur DprA, 3 mutations ont montré une inhibition de l'interaction : E249R, L252E et E251R (Tableau 4).

- Une inversion de charge sur le résidu E249 entraîne une inhibition de l'interaction.
- Contrairement à E249, un changement de charge sur D245 n'a aucun effet.
- Le résidu L252 avait été proposé comme étant centrale au site d'interaction. La leucine (L) est un acide aminé ayant une chaîne hydrophobique. Lorsque l'on substitue la leucine par une alanine (L252A), aucune modification sur l'interaction n'est observée, ce qui a du sens car l'alanine est également un acide aminé non-polaire. Cependant, lorsque l'on ajoute une charge négative via la mutation L252E, on observe une inhibition de l'interaction.
- Tout comme le résidu L252, E251 serait au centre du site d'interaction. De la même façon, une inversion de la charge négative en positive inhibe l'interaction.

Les mutations prédites sur DprA correspondent plutôt fidèlement au modèle proposé et situent la région d'interaction entre les résidus E249 et L252.

Tableau 4 Effet des mutations de comM et dprA sur leur interaction par double hybride bactérien

	pKT25-Zip	pKT25	WH-T25	WH-T25 D245K	WH-T25 L248A	WH-T25 L248E	WH-T25 E249R	WH-T25 L252A	WH-T25 L252E	WH-T25 E251R
pUT18C-Zip	1970 ± 321									
pUT18C		36 ± 20								
ComM-T18			328 ± 194	465 ± 281	449 ± 256	366 ± 228	89 ± 137	332 ± 230	35 ± 22	78 ± 54
T18-ComM			304 ± 217	308 ± 256	303 ± 159	482 ± 253	26 ± 14	291 ± 234	38 ± 12	67 ± 19
ComM-T18 F465A			397 ± 276							
T18-ComM F465Q			322 ± 193							
T18-ComM K493D			412 ± 265	484 ± 304			31 ± 34			
ComM-T18 K493D			625 ± 217	602 ± 35			37 ± 13			
ComM-T18 L497A			1088 ± 446							
T18-ComM L497A			1114 ± 340							
T18-ComM L497E			1119 ± 392							
ComM-T18 K504			141 ± 100							
T18-ComM K504E			36 ± 7							
ComM-T18 R464E			305 ± 127							
T18-ComM R464E			231 ± 173							

Les valeurs correspondent à l'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en unités de Miller A414/min/ml/OD600. En vert, les combinaisons présentant une interaction ; en rouge, les combinaison présentant pas d'interaction.

Concernant ComM, la situation est moins claire. Les mutations sur les résidus F465, K493 et R464 n'ont pas montré d'impact sur l'interaction. Seul deux mutations semblent avoir un impact sur l'interaction : L497E/A et K504E (Tableau 4).

- Le résidu L497 a été choisi car il est central au site d'interaction dans le modèle proposé. De manière surprenante, les deux substitutions testées sur le résidu L497 (L497A et L497E) entraînent un signal d'interaction plus élevé que pour l'interaction initiale. Ce qui est particulièrement surprenant est l'augmentation de l'interaction lorsque l'on ajoute une charge négative (L497E) à ce résidu car on s'attendrait à une répulsion due au fait qu'il serait en face des acides aminés D245 et E249 dans DprA qui sont également chargés négativement, et donc une inhibition de l'interaction. On en déduit donc que le résidu L497 est proche de la zone d'interaction mais qu'il est difficile d'interpréter la signification du phénomène observé.
- Concernant le résidu K504, une inversion des charges (K504E) entraîne une inhibition de l'interaction.
- Une inversion de charge sur le résidu K493 n'a aucun effet sur l'interaction. Ceci peut s'expliquer par le fait que K493 semble en périphérie de la zone d'interaction.

Dans le but de valider le modèle, nous avons cherché à réaliser des mutations compensatoires, c'est-à-dire des remplacements qui sur une protéine inhibent l'interaction et des substitutions sur le résidu complémentaire dans la deuxième protéine qui permettraient de retrouver l'interaction (Tableau 3). Le modèle prédit que DprA E249 interagit avec le résidu K493 de ComM, qui présente une charge positive. En revanche, lorsque l'on essaye de compenser l'inhibition du mutant E249R avec une inversion de charge sur ComM avec la mutation K493D, on ne récupère pas l'interaction initiale.

Du côté de ComM, les résultats sont un peu plus confus par rapport au modèle proposé et il est difficile de conclure quant à ceux-ci. Cela peut venir du fait que la structure de ComM n'est pas connue contrairement à la structure de DprA. Entre temps, l'apparition de AlphaFold a permis d'obtenir un modèle plus précis pour ComM (Jumper et al., 2021). Par conséquent, un second modèle d'interaction a pu être réalisé (Figure 12). Le modèle généré cette fois-ci est d'une précision plus importante que le précédent sur lequel nous avons basé notre étude d'interaction.

Ce second modèle, montre le résidu D245 en dehors de la zone d'interaction, expliquant le fait qu'une mutation sur ce résidu n'impact pas l'interaction. Ce modèle explique également l'absence d'effet des mutations sur les résidus F465 et R464 sur ComM car ceux-ci se présenteraient de la même façon en dehors de la zone d'interaction.

Le fait d'inverser la charge du résidu K504 entraîne une inhibition de l'interaction, ce qui semble étrange puisque dans le nouveau modèle celui-ci est proposé en retrait de la zone d'interaction. Nous pensons que ce résidu (K504) est plutôt impliqué dans le repliement du domaine C-terminal de ComM. Si le domaine C-terminal présente un repliement anormal, cela peut expliquer la perte d'interaction avec DprA. Le résidu K493, qui semblait être en périphérie du site d'interaction, serait probablement plus central qu'initialement proposé. La charge positive de ce résidu interagirait avec la charge négative sur le résidu E249, il est donc curieux qu'avec la mutation K493D, nous n'observons pas de différence par rapport à l'interaction initiale. Le second modèle propose donc une zone d'interaction qui se situe au niveau des résidus K493 et L497 de ComM avec les résidus E249 et L252 de DprA.

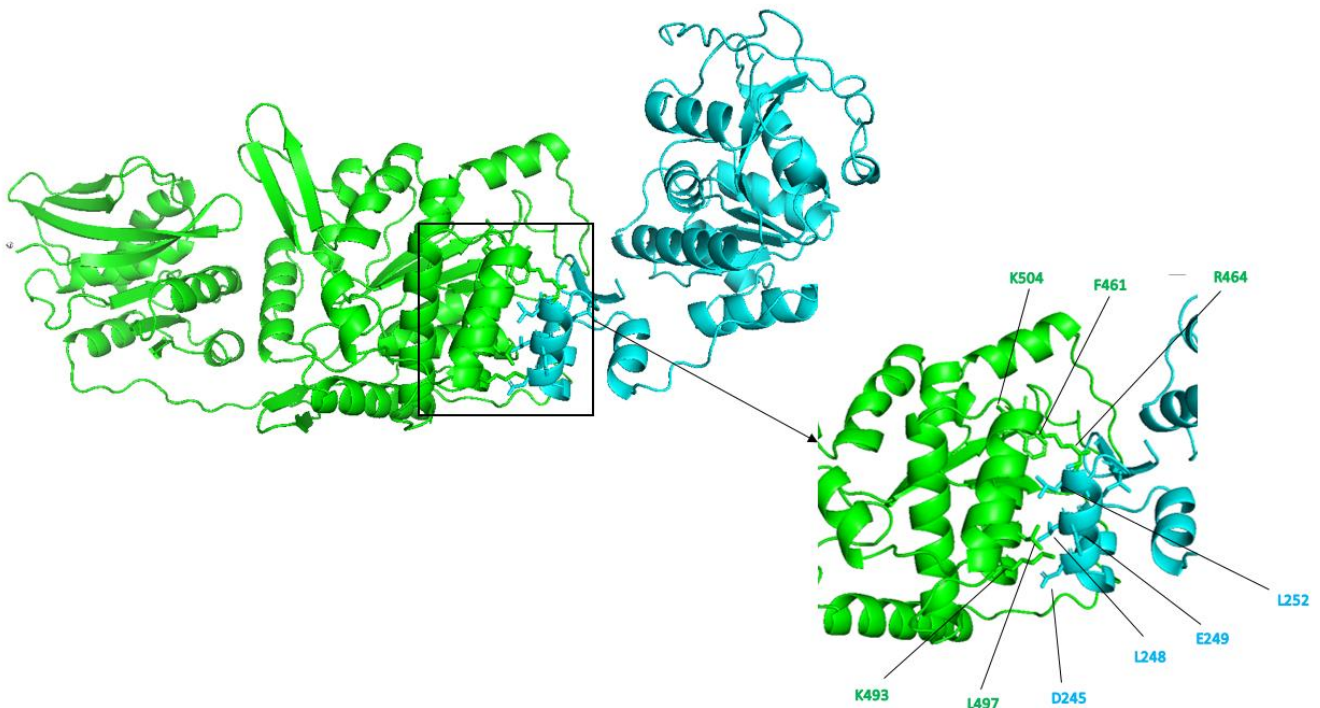


Figure 12 Modèle de surface d'interaction entre ComM (vert) et DprA (bleu) réalisé par AlphaFold. Un zoom est réalisé sur la zone d'interaction avec les résidus mutés mis en évidence (en vert pour ComM et bleu pour DprA).

Malgré un modèle de surface d'interaction robuste, les résultats obtenus par double hybride bactérien ne concordent pas complètement avec ce que nous attendions. Néanmoins, nous avons décidé de tester les mutations qui ont eu un impact sur l'interaction en double hybride bactérien chez *H. pylori* afin de voir si celles-ci ont un impact sur la transformation naturelle. Nous avons inséré les mutations L497A, K504E sur ComM ainsi que E249R et L252E chez DprA.

Étonnamment, que ce soit concernant les deux mutations introduites chez ComM ou les deux chez DprA, aucune n'entraîne une modification significative de la transformation naturelle (Figure 13). Il est tout de même à noter que l'on observe une diminution de la transformation d'un facteur 30 due à la mutation L497A chez ComM ainsi qu'une diminution d'un facteur proche de 50 due à la mutation L252E chez DprA. Aucun effet n'est observé avec l'intégration de la mutation K504E chez ComM. Si la modification de ce résidu joue sur le repliement du domaine C-terminal de ComM, il est possible que ce défaut soit compensé *in vivo* par la formation d'un hexamère par ComM.

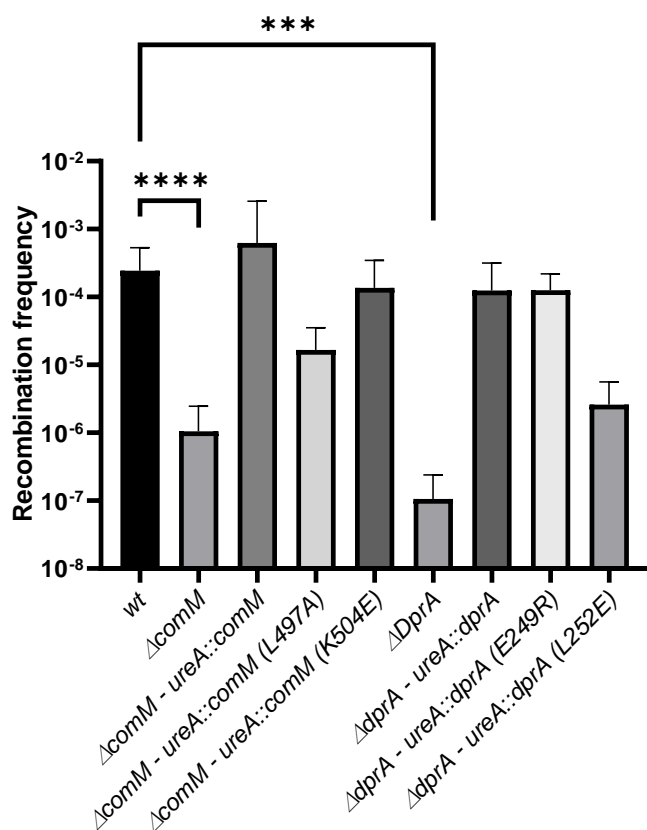


Figure 13 Taux de transformation naturelle chez les mutants ComM et DprA modifiant l'interaction entre ces deux protéines. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. P-value < 0.05

## 1.5 Conclusion

Au regard de ces résultats, il est difficile de conclure sur l'impact de l'interaction entre ComM et DprA sur la transformation naturelle. D'un côté, nous avons la mutation L497E/A sur ComM qui, par double hybride bactérien, présente un phénotype inattendu en renforçant l'interaction mais qui n'a qu'un faible impact sur la transformation une fois le mutant exprimé chez *H. pylori*. De l'autre côté, nous avons deux mutations chez DprA, E249R et L252E, qui inhibent l'interaction avec ComM observée par double hybride bactérien mais, lorsque les protéines portant ces mutations sont exprimées chez *H. pylori*, seule la mutation L252E entraîne une modeste diminution du taux de transformation. DprA étant un facteur clé lors de la transformation naturelle, il est possible que la mutation L252E impacte son activité ou son interaction avec une protéine autre que ComM, qui pourrait affecter la transformation.

Il est à noter que dans chaque cas, une seule mutation est introduite. Il est possible qu'*in vivo*, l'interaction entre les deux protéines soit forte et nécessite plus de modifications sur celles-ci afin de l'inhiber. Ceci peut être obtenu par la réalisation de deux ou trois mutations sur la même protéine. De plus, les résultats obtenus par double hybride bactérien ne correspondent pas complètement au modèle proposé, qui est robuste. Il est possible qu'un biais existe par la méthode de double hybride bactérien. Afin de vérifier ces différentes hypothèses, il serait nécessaire d'intégrer les mutations L497E chez *H. pylori*, qui devrait avoir un effet plus important que L497A du fait de l'ajout d'une charge. De plus, la mutation K493D ou K493E serait une bonne option pour interférer avec l'interaction car centrale au site d'interaction. Une troisième option est de réaliser une double mutation L497A et K493E. L'impact de ces mutations pourra être observé en testant l'efficacité de transformation ainsi que le taux de recombinaison intra-génomique.

## 2 Le rôle de HP1421 chez *H. pylori*

Chez *H. pylori*, un certain nombre d'ATPases supposées nécessaires à la transformation naturelle telles que les homologues de ComFA ou de VirB11, par exemple, sont encore inconnues. Dans la recherche d'ATPases, nous avons identifié HP1421 qui est un homologue de VirB11, une ATPase de transport lié au T4SS.

La première étude réalisée était de déterminer si HP1421 est impliquée dans la transformation naturelle. Une délétion de *hp1421* entraîne une abolition totale de la transformation. Afin de valider ce phénotype, nous avons complété la souche en exprimant *hp1421* au locus du gène *ureA*, ce qui permet de retrouver un taux de transformation similaire à celui de la souche sauvage (Figure 14).

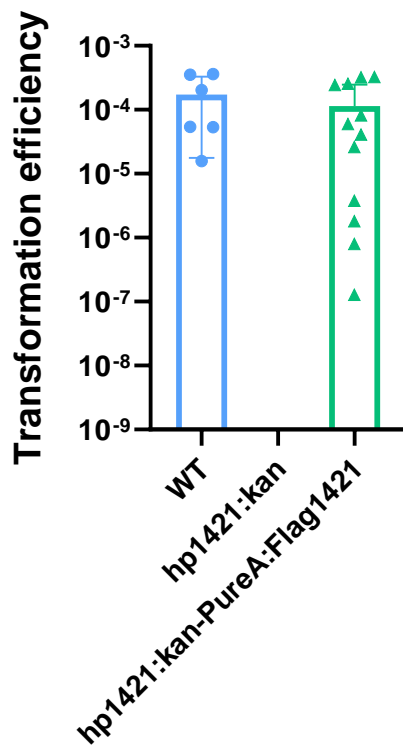


Figure 14 Taux de transformation naturelle chez le mutant *hp1421*. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. P-value<0.05

J'ai pu mettre en évidence que HP1421 joue un rôle indéniable dans la transformation naturelle. Ces travaux ont par la suite été repris au laboratoire afin d'approfondir les connaissances autour des fonctions de HP1421.

HP1421 étant un homologue de VirB11, le laboratoire a cherché à savoir si ces deux protéines présentent les mêmes caractéristiques. Dans un premier temps, il a été montré qu'elle était présente dans le cytoplasme, ce qui concorde avec la localisation de VirB11.



VirB11 est nécessaire à la polymérisation de VirB2, qui forme le pilus. Il peut donc être imaginé que HP1421 joue également un rôle associé au T4SS ComB. Le système ComB étant nécessaire aux premières étapes de la transformation, le laboratoire s'est interrogé quant à l'étape de la transformation durant laquelle HP1421 est impliquée. Il a été observé qu'une délétion de *hp1421* n'impactait pas la transformation après livraison d'ADN simple brin dans le cytoplasme par électroporation. HP1421 est donc impliquée en amont des étapes de recombinaison et cytoplasmique. Par la suite, des tests permettant de voir si la cellule est capable d'internaliser de l'ADN double brin dans son périplasma ont été réalisés. En absence de HP1421, très peu d'ADN est retrouvé dans le périplasma quand comparé à la souche parentale. Ici, il a donc été mis en évidence que cette protéine joue un rôle dans les étapes en amont du périplasma. Nous pouvons proposer que celle-ci joue un rôle soit dans la capture ou la protection de l'ADN capturé en surface de la cellule ou dans son internalisation dans le périplasma.

Pour aller plus loin, comme VirB11 est une ATPase, Sumedha Kondekar dans le laboratoire a mis en évidence l'activité ATPase de HP1421. Des mutants sur les sites de liaison à l'ATP et d'hydrolyse de l'ATP ont été réalisés. Dans le mécanisme de transformation, ces mutants présentent un phénotype similaire à une délétion de *hp1421*, signifiant que l'activité ATPase de HP1421 est nécessaire pour sa fonction au sein de la transformation naturelle.

Ces travaux présentent donc une nouvelle protéine dont l'activité ATPase est nécessaire pour la transformation naturelle. Aux vues de son homologie avec VirB11, nous suggérons que HP1421 a une activité liée au T4SS et donc au niveau des étapes de capture de l'ADN ou son passage à travers la membrane externe. Le système T4SS ComB de *H. pylori* ayant une fonction très particulière par rapport aux autres T4SS existants, le rôle d'une telle ATPase dans ce système est assez cryptique. Notre hypothèse est que HP1421 serait impliquée dans la formation du T4SS ou dans l'export de ComB2 en surface, nécessaire aux premières étapes de la transformation naturelle.



## Chapitre III : Discussion et perspectives



*Helicobacter pylori* est une bactérie possédant une grande diversité génétique notamment due à ses taux de mutagenèse et de recombinaison élevés qui génèrent de nouveaux allèles mais également grâce à sa capacité à transformer naturellement, permettant la propagation de ces allèles. La transformation naturelle est un mécanisme qui a été bien décrit dans un grand nombre d'espèces bactériennes différentes mais il subsiste toujours des questionnements sur le mécanisme précis chez *H. pylori* dû à ses multiples particularités. Alors qu'au cours de ces dernières années un certain nombre d'acteurs de ce mécanisme chez *H. pylori* ont été décrits par notre laboratoire, tels que ComH ou ComFC (Damke et al., 2019, 2022) certains restent non identifiés. Mes travaux de thèse cherchaient à mettre en évidence des ATPases impliquées lors de la transformation naturelle.

Au cours de la recombinaison homologue, une hélicase est nécessaire pour la migration de branche afin d'incorporer de l'ADNt. Chez *H. pylori*, il existe des informations contradictoires concernant les hélicases participant à la transformation naturelle. Le rôle du système RuvABC pour la migration et la résolution des branches (Sharples, Ingleston & Lloyd, 1999) pendant la transformation naturelle a été exploré. Alors que des travaux ont montré un effet significatif de l'inactivation de l'hélicase RuvB (Kang et Blaser, 2008), et de la résolvasse associée RuvC (Loughlin et al., 2003), d'autres travaux montrent que ces deux mêmes inactivations n'ont pas d'impact sur la transformation naturelle (Humbert et al., 2011).

Récemment, des études ont identifié RadA et ComM comme étant impliquées dans cette étape chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif respectivement (Marie et al., 2017; Nero et al., 2018b; Torres, Serrano & Alonso, 2019; Torres et al., 2019b). Les orthologues de ComM sont absents chez toutes les espèces Gram-positives naturellement transformables connues, il a donc été proposé que ComM et RadA aient des fonctions similaires pendant la transformation naturelle (Nero et al., 2018). *H. pylori*, comme la plupart des bactéries compétentes à Gram négatif, possède à la fois des homologues de ComM et de RadA, ce qui soulevait la question de leurs rôles respectifs.

Nos expériences ont confirmé que, comme chez les autres bactéries Gram-négatives naturellement compétentes étudiées, à savoir *H. influenzae*, *V. cholerae* et *A. baylyi*, chez *H. pylori* ComM joue un rôle majeur dans la transformation naturelle mais pas RadA. Cependant, nos résultats révèlent des différences importantes. Chez *V. cholerae* et *A. baylyi*, il a été

montré que ComM est nécessaire dans la détermination de la longueur de la séquence d'ADNt intégrée dans le chromosome receveur, allant de pair avec la capacité de la protéine à favoriser la migration des branches (Nero et al., 2018). En revanche, chez *H. pylori*, la taille des séquences acquises chez un mutant *comM* n'était pas significativement différente de celle de la souche sauvage.

Chez *V. cholerae* et *A. baylyi*, l'intégration d'une séquence avec 29 bp hétérologues diminue respectivement de 500 et 85 fois la fréquence de transformation alors que lorsqu'il s'agit de l'intégration d'une polymorphisme d'un seul nucléotide, la fréquence n'est diminué que de 15 et 7, fois respectivement (Nero et al., 2018b). Chez *H. pylori*, que ce soit l'intégration d'un polymorphisme d'un nucléotide ou une longue séquence hétérologue, la diminution de la fréquence de transformation est similaire et est d'un facteur d'environ 200, signifiant l'importance de ComM dans l'intégration d'ADNt sans favoriser l'acquisition d'ADN hétérologue. Cette diminution fait penser à celle observé chez *H. influenzae* qui est d'un facteur 300 lors de l'intégration d'un seul nucléotide (Gwinn et al., 1998).

L'inactivation de *comM* entraîne donc une forte diminution du taux de transformation chez *H. pylori*, mais celui-ci n'est pas abolit. Du fait d'une évidence de la participation de l'hélicase RuvB dans la transformation, il serait curieux de regarder dans notre souche d'*H. pylori* si celle-ci possède en effet un rôle dans la transformation naturelle et si c'est le cas, quel serait son lien avec ComM et quel serait son rôle exact par rapport à ComM.

Nous avons également mis en évidence l'impact d'un mutant *yraN* sur la transformation naturelle. YraN est une nucléase impliquée lors de la recombinaison homologue de la transformation naturelle chez *L. pneumophila*, *A. baylyi* et *A. nosocomialis*. Lorsque *yraN* est inactivé seul ou avec *comM*, le taux de transformation diminue d'un facteur 7 à 40, au même niveau qu'un mutant *comM* seul (Hardy, 2021). Ce qui est curieux est que l'inactivation d'*yraN* entraîne la diminution d'un facteur proche de 300 chez *H. pylori*. La mutation de ces deux gènes, comme chez *L. pneumophila*, *A. baylyi* et *A. nosocomialis*, entraîne une diminution du taux de transformation similaire entre elles. Ce résultat est consistant avec l'hypothèse selon laquelle les deux protéines, ComM et YraN agissent dans la même voie mais que leur importance au sein de la transformation naturelle est espèce-dépendante.

D'un autre côté, RadA est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN alors que ComM ne l'est pas. Les premiers travaux sur RadA, réalisés chez *E. coli*, ont montré une sensibilité du mutant face à différents stress génotoxique dont les UV (Diver et al., 2009). En revanche, des travaux plus récents ne montrent pas de sensibilité accrue aux UV d'un mutant *radA* seul (Beam, Saveson & Lovett, 2002). L'inactivation combiné d'autres gènes de la recombinaison a été nécessaire afin d'observer l'implication de RadA dans la réparation des dommages à l'ADN induit par des UV (Beam et al., 2002). Chez *H. pylori*, nous avons montré qu'une inactivation de *radA* seule entraînait une diminution de la survie face aux UV mais étonnamment pas face aux radiations ionisantes. Il y a quelques années, Torres *et al* (2019) ont montré la sensibilité d'un mutant *radA* à plusieurs traitement génotoxiques chez *B. subtilis*. Parmi ces traitements, l'exposition aux UV ou aux rayonnements ionisants n'ont pas été testés, il serait donc intéressant de regarder si les observations faites sur le mutant *radA* d'*H. pylori* sont également vraies chez d'autres espèces.

Nous avons dévoilé un rôle essentiel de ComM dans la recombinaison médiée par RecA entre les séquences répétées du génome. Ceci était inattendu puisque nous avons précédemment montré que ce type de recombinaison ne nécessitait pas DprA, le chargeur RecA spécifique de la transformation (Marsin et al., 2008). Ce rôle, indépendant du mécanisme de transformation naturelle, pourrait expliquer la conservation généralisée de ComM chez les espèces Gram-négatives non-compétentes (Nero et al., 2018).

Une analyse co-évolutive a montré la présence de ComM seulement chez les espèces où DprA possède un domaine C-terminal (Brimacombe et al., 2015) suggérant un lien entre les deux. Le domaine C-terminal « winged helix » de DprA est indispensable pour la transformation naturelle mais son rôle reste inconnu. Une hypothèse est que ce domaine C-terminal joue un rôle dans l'interaction avec une protéine (Lisboa et al., 2019). Nos travaux ont mis en évidence l'interaction de ComM avec ce domaine C-terminal de DprA. L'interaction avec DprA, qui est impliquée lors de la transformation naturelle mais pas lors de la recombinaison de séquences répétée dans le génome, pourrait différencier les rôles de ComM au sein de la cellule. Dans le but de séparer les fonctions de ComM via son interaction avec DprA, un modèle de surface d'interaction a été réalisé et, combiné à nos expériences, a permis d'identifier une zone d'interaction entre ces deux protéines, au niveau des résidus K493 et L497 de ComM avec les résidus E249 et L252 de DprA. Une inhibition de l'interaction avec

DprA à travers ces résidus pourrait permettre de séparer les fonctions de ComM, avec un rôle dans la transformation lorsque qu'elles interagissent et un rôle dans la recombinaison de séquences répétées lorsque ce n'est pas le cas. A ce jour, nous ne pouvons pas encore valider cette hypothèse mais de premiers résultats *in vivo* montrent une légère diminution de l'efficacité de transformation lorsque le résidu L497 de ComM ou le résidu L252 de DprA, impliqués dans l'interaction, sont modifiés. Ceci pourrait laisser entendre que la modification de l'interaction *in vivo* n'est pas suffisante pour voir une diminution significative. Afin de répondre à notre hypothèse, des mutations intégrant un changement de charge sur les résidus L497 et K493 sur ComM chez *H. pylori* est envisagé, de même qu'une double mutation dans le but d'inhiber l'interaction avec DprA *in vivo*. Ceci permettrait de voir directement l'impact de l'interaction sur la transformation naturelle et sur la recombinaison de séquences répétées.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce travail ont révélé de nouvelles fonctions pour l'hélicase ComM, à la fois dans les processus de recombinaison homologue associés à la transformation ou non, ce qui soulève la question des mécanismes moléculaires associés.

Dans un second point, nous avons mis en évidence l'importance d'un nouvel acteur dans la transformation naturelle, HP1421, un homologue de VirB11. Hp1421 est une ATPase intervenant lors des premières étapes de la transformation naturelle et indispensable à cette dernière. VirB11 permet, entre autres, la polymérisation du pilus du T4SS, composé de VirB2. Chez *H. pylori*, ComB2 est impliquée dans les premières étapes de la transformation et il est proposé qu'elle serait nécessaire à la capture ou l'internalisation de l'ADNt (Corbinais et al., 2016). Il est possible que tout comme VirB11, l'activité d'HP1421 soit étroitement liée à la fonction de ComB2 d'*H. pylori*. Une des propositions serait de tagger ComB2 afin de pouvoir étudier sa localisation en présence ou absence de HP1421 ou chez un mutant déficient de son activité ATPase.





# Matériels et méthodes

Cette partie matériels et méthodes complète celle présente dans l'article scientifique.

## 2.1 Cultures bactériennes

### 2.1.1 Culture sur milieu solide de *H. pylori*

Les souches de *H. pylori* ont été cultivées à 37°C en condition microaérophile (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) sur milieu Blood Agar Base n°2 (Sigma) additionné avec 10 % de sang de cheval défibriné ainsi qu'un mélange d'antibiotiques et antifongiques (31 µg/ml polymixine B, 12,5 µg/ml vancomycine, 6,2 µg/ml triméthoprim et 2,5 µg/ml fungizone). Les antibiotiques suivants sont ajoutés, si besoin, aux concentrations finales indiquées : Streptomycine : 10 µg/ml, Kanamycine 20 µg/ml, Apramycine 12,5 µg/ml, Chloramphénicol 8 µg/ml.

Le milieu Peptone water (PW) utilisé pour les dilutions et la résuspension des cultures de *H. pylori* est composé de 20 g/l de peptone, 5 g/l NaCl et ajusté à pH 7,4.

Le milieu BHI utilisé pour les cultures liquides et les stocks de souches de *H. pylori* est composé de 12,5 g/l d'infusion solide de cerveau, 5 g/l d'infusion solide de cœur de bœuf, 10 g/l de peptocomplexe, 2 g/l de glucose, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

### 2.1.2 Cultures de *Escherichia coli*

Les cultures d'*E. coli* se font en milieu solide Luria Agar réalisé avec 40 g/l d'une préparation commerciale (Sigma) et en milieu liquide en bouillon Luria réalisé avec 25 g/l d'une préparation commerciale (Sigma). Quand nécessaire et précisé, de l'ampicilline est utilisée à 100 µg/ml.

## 2.2 Construction des souches de *H. pylori* modifiées

La souche 26695 d'*H. pylori* a été utilisée comme souche parentale afin de générer les mutants décrits dans ces travaux. La séquence des gènes provient du génome annoté d'*H.*

*pylori* 26695 disponible sur <http://genolist.pasteur.fr/PyloriGene/>. Pour une intégration ou une substitution de gène dans le génome, la séquence spécifique entouré de 200 pb de chaque côté (correspondant à la séquence de génomique du locus dans lequel nous voulons insérer notre construction ; donc permettant la recombinaison dans le génome) est amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique en utilisant des oligonucléotides spécifiques (Tableaux 6 et 7). Ce fragment d'ADN est cloné dans un plasmide vecteur pJET1.2 par « sequence and ligation independent cloning » (SLIC) (voir partie correspondante). Ensuite, une cassette d'antibiotique ou un tag de protéine peut être inséré utilisant la même méthode. La taille de l'insert est vérifiée par PCR et gel d'agarose à 1% et la séquence de la construction est vérifiée par séquençage.

### 2.2.1 Réaction d'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le mélange réactionnel contient : 100 ng d'ADN génomique ou 100 ng de plasmide, 0.2 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M de chaque amorce, tampon Q5 1X (BioLabs), 1U Q5 polymérase, dans un volume final de 50  $\mu$ l. Le cycle PCR est composé de la façon suivante : 30 sec à 98°C puis 18 cycles (10 sec à 98°C, 30 sec à 50°C, x\* sec à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. (\* : Cette valeur dépend de la taille du fragment à amplifier, la vitesse de réaction de la Q5 polymérase est 1 kb/30 sec).

Le contrôle des constructions se fait par PCR en réalisant un mélange réactionnel contenant 100 ng de matrice d'ADN à contrôler, 0.125 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M de chaque amorce, tampon ExTaq 1X et 0.5U ExTaq polymérase, dans un volume final de 50  $\mu$ l. Le cycle PCR est composé de la façon suivante : 5 minutes à 94°C puis 35 cycles (1 min à 94°C, 1 min à 52°C, x\* sec à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. (\* : Cette valeur dépend de la taille du fragment à amplifier, la vitesse de réaction de la ExTaq polymérase est 1 kb/min).

### 2.2.2 Méthode SLIC de clonages de gènes

SLIC (sequence and ligation independent cloning) est une méthode de clonage permettant de lier un insert dans un vecteur en créant des extrémités simple brins complémentaires par action de l'activité exonucléase de la T4 DNA polymérase.

### 2.2.2.1 Digestion DpnI

Suite à l'amplification par PCR, l'ADN du plasmide est digéré par DpnI pendant 1h à 37°C. Dans le mélange réactionnel PCR, sont ajoutés 2U de DpnI (NEB) et le tampon CutSmart (1x final). Cette digestion permet l'élimination du plasmide matrice car méthylé et ne garder que les fragments d'ADN non méthylés et donc amplifiés *in vitro*.

### 2.2.2.2 Purification des fragments d'ADN insert et vecteur

Les produits PCR, insert et vecteur, sont purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare).

### 2.2.2.3 Réaction T4 DNA polymérase

Les produits PCR inserts et vecteurs sont mélangés selon un ratio vecteur/insert de 1/5 ou 1/10 (mol/mol) puis incubés 10 minutes avec 0.75U de T4 DNA polymérase (BioLabs), tampon 2.1 dans un volume final de 20 µl afin d'obtenir des extrémités cohésives sur les deux fragments.

### 2.2.3 Transformation de bactéries *E. coli*

Un volume de 7 µl de la réaction T4 DNA polymerase (cf ci-dessous) ou 150 ng de plasmide circulaire est mis en contact avec 50 µl d'*E. coli* DH5α compétentes concentrée à DO 22. L'incubation se déroule pendant 30 minutes dans la glace. Un choc thermique est effectué par incubations successives, à 42°C pendant 45 sec, puis dans la glace pendant 2 min. L'expression du marqueur de sélection (par exemple le gène β-lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline) est permise par ajout de 300 µl de milieu LB et incubation des cellules à 37°C sous agitation pendant 1h. La culture est centrifugée 2 minutes à 8000 rpm. Le culot bactérien est resuspendu dans 50 µl de milieu LB puis étalé sur gélose LB ampicilline, l'incubation se poursuit 16h à 37°C.

Si des transformants sont obtenus, 6 colonies sont mises en culture dans 2 ml LB liquide contenant de l'ampicilline puis incubés 37°C pendant 16h. Après extraction et purification des plasmides (cf ci-dessous), l'insertion du gène d'intérêt est vérifiée par réaction PCR et l'absence de mutations par séquençage (Eurofins).

#### 2.2.4 Transformation de *H. pylori* pour la construction des souches mutantes

Environ  $5.5 \cdot 10^7$  CFU *H. pylori* sont mises en contact avec 500 ng de plasmide dans un volume de 45  $\mu$ l de PW. La suspension bactérienne est divisée en 2 et deux dépôts de 20  $\mu$ l sont effectués sur gélose au sang. L'incubation se poursuit pendant environ 16h à 37 °C en condition microaérophile. Chaque spot bactérien est ensuite resuspendu en 45 ml de PW et étalé sur une gélose au sang contenant l'antibiotique de sélection et incubé 4-5 jours à 37°C en condition microaérophile. En fonction du nombre de colonies formées, au plus 10 colonies sont prélevées et étalées sur gélose sélective pour amplification pendant 1 à 2 jours à 37°C. Une seconde étape d'amplification sur gélose sélective est effectuée sur une plus grande surface (environ une 1/2 boîte de Pétri de 90 mm de diamètre). Le tapis bactérien est ensuite prélevé : une partie de la culture est mise en suspension en BHI contenant 12,5 % glycérol puis conservé à -80°C, le reste est mis en suspension en PW puis centrifugé. Le culot bactérien sera utilisé pour extraire l'ADN génomique et vérifier la taille de l'insertion ou sa séquence.

#### 2.3 Mesure de l'efficacité de transformation de souches *H. pylori*

Environ  $5.5 \cdot 10^7$  CFU *H. pylori* sont mis en contact avec 600 ng d'ADN génomique de la souche 133 possédant une mutation au niveau du gène *rpsL* qui confère la résistance à la streptomycine ou de la souche 1057 possédant une cassette de résistance à l'apramycine dans un volume de 45  $\mu$ l de milieu PW. La suspension bactérienne est divisée en 3 et déposée en spots sur gélose au sang. L'incubation se poursuit pendant environ 16h à 37 °C en condition microaérophile. Chaque spot est remis en suspension dans 500  $\mu$ l de PW et des dilutions au 1/10 sont réalisées jusqu'à  $10^{-6}$ . Les dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont étalées sur gélose au sang sans antibiotique et les suspensions non diluées et diluées 10 fois, sur gélose contenant soit de la streptomycine, pour les transformant avec l'ADN génomique 133, soit apramycine, pour l'ADN génomique 1057, et incubées 4-5 jours à 37°C en condition microaérophile. Le nombre de colonies dans chaque condition est mesuré et le rapport nombre de CFU résistante/ nombre de CFU sans antibiotique est calculé pour exprimer l'efficacité de transformation de chaque souche. Les p-values ont été calculées grâce au teste Mann–Whitney U à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

## Double hybride bactérien

Le test de double hybride bactérien est basé sur la reconstitution de l'activité adénylate-cyclase chez une souche d'*Escherichia coli* *cya* – via l'interaction entre deux protéines d'intérêt fusionnées séparément aux deux domaines catalytiques (T18 et T25) de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*.

Une série de plasmides a été réalisée, par la méthode décrite précédemment, exprimant une fusion de ComM ou DprA en N-terminal ou C-terminal avec le domaine catalytique T25 (issu des vecteurs pKNT25 ou pKT25) ou le domaine catalytique T18 (issu des vecteurs pUT18 ou pUT18C). Les plasmides vecteurs pKNT25 et pUT18 sont utilisées en tant que contrôle de l'activité adénylate cyclase résiduelle. Tous les inserts ont été clonés dans les plasmides pKNT25, pKT25, pUT18 ou pUT18C par méthode SLIC comme décrit précédemment. Les deux plasmides contenant les fusions à tester sont co-transformés dans la souche BTH101 d'*E. coli*. Les clones ayant intégré les deux plasmides sont sélectionnés sur milieu LB contenant ampicilline (100µg/ml) et kanamycine (50 µg/ml) à 30°C. Cinq colonies sont utilisées pour ensemercer 3 ml de milieu LB liquide contenant les deux antibiotiques ainsi qu'1M d'IPTG et incubées sur la nuit à 30°C. L'interaction entre les deux protéines de fusion a été quantifié par test de l'activité β-galactosidase. Pour ceci, le culot obtenu à partir d'1 ml de culture est resuspendu dans 1 ml de tampon Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-Mercaptoethanol, 0.005% SDS, pH ajusté à 7), 100 µl de chloroforme sont ajoutés et le mélange est vortexé 20 secondes. 20 µl de la fraction protéique (surnageant) sont ajoutées à 180 µl de Tampon Z ne contenant pas de β-Mercaptoethanol ni de SDS mais avec 40 µl d'ONPG (Ortho-nitrophényl-β-galactoside) à 4mg/ml en microplaque de 96 puits. Lorsque l'ONPG est dégradé, un produit de la réaction est l'ONP qui est un composé jaune absorbant à 540 nm. La DO<sub>414</sub> (ONP) et la DO<sub>540</sub> (débris cellulaires pouvant être présents) est mesuré toutes les 5 minutes pendant 2h. L'activité β-galactosidase (A) a été calculé avec la formule suivante :

$$A = 1000 * (OD_{414} (t) - (1.75 * OD_{540} (t))) / (t * V_{\text{sample}} * DO_{600} \text{ initiale})$$

OD<sub>540</sub> représente la dispersion des débris cellulaires de la suspension. Pour avoir une approximation de la dispersion des débris à OD<sub>414</sub>, nous multiplions par 1.75. « t » représente

le temps de la mesure et V le volume de l'échantillon (0.002 ml). Ici nos calculs ont été réalisées à t = 20 minutes car dans toutes les conditions testées, la courbe OD<sub>414</sub> = f(t) est linéaire. L'activité β-galactosidase est exprimée en unités de Miller A414/min/ml/OD600.

Tableau 5 Liste des souches utilisées

		Souche	
1	26695	wt	
1187	26695	comM::kan	This work
1182	26695	radA::kan	This work
1241	26695	comM::kan + ureA::comM-flag-Cm	This work
1232	26695	comM::Cm	This work
	26695	comM::kan + ureA::comM (K504E)- flag -Cm	This work
1247	26695	comM::kan + ureA::comM (L497E)- flag -Cm	This work
312	26695	recA::Apra	Marsin et al., 2008
1251	26695	dprA:: kan + ureA::dprA (E249R) -Cm	This work
1255	26695	dprA:: kan + ureA::dprA (L252E) -Cm	This work
436	26695	rdxA::KDA	Marsin et al., 2008
438	26695	rdxA::KDA recA::cm	Marsin et al., 2008
1229	26695	rdxA::KDA radA::cm	This work
1317	26695	rdxA::KDA + comM-markerless	This work
1319	26695	rdxA::KDA + comM-merkerless + ureA::comM- flag-Cm	This work
1316	SS1	rpsL A263G	This work
1189	26695	Hp1421 ::Kan	This work
1299	26695	Hp1421::kan + ureA::hp1421-flag-Cm	This work

Tableau 6 Liste des oligonucléotides utilisées pour les mutations chez *H. pylori*

Name	Sequence 5'-3'	Description
Op325	gagaatattgtaggagatcttctagaagatgcaataccaaaaactagagaaaatggc	Construct HP0223 (RadA) For Eco47-HP0223up
Op326	ccggatggctcgagttttcagcaagatattttcactcgcttgcataattgctcc	Construct HP0223 (RadA) Rev Eco47-HP0223dw
Op327	ggagcaattatgcaagcagtgaaaacatatcttgctgaaaaactcgagccatccgg	Construct HP0223 (RadA) For HP0223dw-Eco47

Op328	gccattttcttagttttggtattgcatctttctagaagatctcctacaatattctc	Construct HP0223 (RadA) Rev Eco47-HP0223up
Op329	gagaatattgtaggagatcttctagaagataaggttaagatagatcaaaaccg	Construct HP0792 (ComM) For Eco47-HP0792up
Op330	ccggatggctcgagttttcagcaagatggttcattctgcttgatgaaagc	Construct HP0792 (ComM) Rev Eco47-HP0792dw
Op331	gctttcatcaagcagaatgaaccttctgctgaaaaactcgagccatccgg	Construct HP0792 (ComM) For HP0792dw-Eco47
Op332	cggttttgatactctatcttaaccttattttctagaagatctcctacaatattctc	Construct HP0792 (ComM) Rev Eco47-HP0792up
Op341	gtttttatctgtgtgattttaaaaaagagtggtggctaaatgagaatatca	Construct HP0223 (RadA)-Kan For HP0223up/20nt HP0223-KanR
Op342	caaaagtccaatcacatccattcaacaatctctaaacaattcatccagtaaaata	Construct HP0223 (RadA)-Kan Rev 20nt HP0223+HP0223dw – KanR
Op343	tattttactggatgaattgttttagagattgttgaatggatgtgattggaactttg	Construct HP0223 (RadA)-Kan For KanR-20nt HP0223+HP0223dw
Op344	tgatattctcattttagccatccactcttttttaaaatcacacagataaaaaac	Construct HP0223 (RadA)-Kan Rev HP0223up (+20nt HP0223)-KanR
Op345	gtaacaacctgattaacacgatgttttgatggctaaatgagaatatcaccg	Construct HP0792-Kan For HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op346	cttataaaaatcctttaagaaatctttctaaaacctaaacaattcatccagtaaaat	Construct HP0792-Kan For HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op347	attttactggatgaattgttttaggttttagaaagattcttaaaggattttataag	Construct HP0792-Kan For 20nt HP0792/HP0792 - KanR
Op348	cggtgatattctcattttagccatcaaaacatcggttaatcatggttggttac	Construct HP0792-Kan Rev HP0792up (+20nt HP0792)-KanR
Op357	ccatgattaacacgatgtttgcgacatgatggctaaatgagaatatcaccg	Construct HP0792 – Kan For HP0792up (+30nt HP0792)-KanR
Op358	cctttaagaaatctttctaaaactcagcgtttctaaacaattcatccagtaaaat	Construct HP0792 – Kan Rev KanR - 30nt HP0792/HP0792 dw
Op359	attttactggatgaattgttttagaaagcgtgatttttagaaagatttttaaagg	Construct HP0792 – Kan For KanR -30nt HP0792/HP0792 dw
Op360	cggtgatattctcattttagccatcatggtcgcgcaaaacatcggttaatcatgg	Construct HP0792 – Kan Rev HP0792up (+30nt HP0792)-KanR
Op478	gaaaaacactttaagaataggagaataaggaattcatgattaacacgatgtttgcg	Construct ComM-UreA For Promoter urea- ComM
Op479	gccatttattctcctagtttagtcacccgggtacctaagaaatctttctaaaac	Construct ComM-UreA Rev ComM-plasmid-KanR
Op480	gttttagaaagatttttaaggtacccgggtgactaactaggaggaataaatggc	Construct ComM-UreA For ComM-plasmid-KanR



Op481	cgcaaacatcgtgtaatacatgaattccttattctcctattcttaaagtgttttc	Construct ComM-UreA Rev Promoter urea- ComM
Op880	caaaaacacgagtaaacacctcgagattaaaagtgtg	Markerless comM For insert
Op881	ttctccttataaaaatccttatcgatcatttagttatg	Markerless comM Rev insert
Op950	caaaactttaaatctcgaggtgttactcgtgttttg	Markerless comM For vector
Op951	cataactaatgatcgataaggattttataagggagaa	Markerless comM Revvector
Op953	ttacttatcgtcgtcatccttgaatcagaaatctctctaaaact	ComM - K504E Hp Rev
Op974	gagtttagagagatttcttaataagaacg	ComM - K504E Hp For
Op975	agcgcttaagcatgtgag	ComM - K504E Hp Rev
Op1004	agcgccaaaggcggtg	rpsL 4kb For
Op1005	accaccgcttgcttagcg	rpsL 4kb Rev

Tableau 7 Liste des oligonucléotides utilisées pour les plasmides utilisées dans le double hybride bactérien

Op444	ggataacaattcacacaggaaacagctatgaaaagccactccaatacagcacgc	Construct DprA-FLAG-T25
Op445	cttatcgtcgtcatccttgaatccgtaacaccacaatgtgattgatgcgc	Construct DprA-FLAG-T25
Op446	gcgtgctgattggaagtggctttcatagctgttctcgtgtgaaattgttatcc	Construct DprA-FLAG-T25
Op447	ggtcgactctagaggatccccgggtacctaagaaaagccactccaatacagcacgc	Construct T25-linker-DprA
Op448	cgttgtaaaacgacggccgaattcttagttacgtaacaccacaatgtgattgatgcgc	Construct T25-linker-DprA
Op449	gcgtgctgattggaagtggctttcttagttaccggggatcctctagagtcgacc	Construct T25-linker-DprA
Op450	gcgatcaatcacattgtggtgttagcgtactaagaatcggccgctgtttacaacg	Construct T25-linker-DprA
Op451	gggtaccgagctcgaattcatcgataaaaagccactccaatacagcacgc	Construct T18-linker-DprA
Op452	attgtactgagagtgcacatattacttagttacgtaacaccacaatgtgattgatgcgc	Construct T18-linker-DprA
Op453	gcgtgctgattggaagtggcttttatcgatgaattcgagctcggtacc	Construct T18-linker-DprA
Op454	gcgatcaatcacattgtggtgttagcgtactaagtaatatggtcactctcagtacaat	Construct T18-linker-DprA
Op486	ggataacaattcacacaggaaacagctatgatgattaacacgatgtttgcgcg	Construct ComM-FLAG-pKNT25
Op487	cttatcgtcgtcatccttgaatcagaaatcttctaaaactcagcgcttaagc	Construct ComM-FLAG-pKNT25
Op488	cgcgcaaacatcgtgtaatacatcatagctgttctcgtgtgaaattgttatcc	Construct ComM-FLAG-pKNT25
Op489	ggtcgactctagaggatccccgggtacctaagatgattaacacgatgtttgcgcgacc	Construct T25-Linker-ComM
Op490	cgacggccgaattcttagttaagaaatcttctaaaactcagcgcttaagc	Construct T25-Linker-ComM
Op491	ggtcgcgcaaacatcgtgtaatacatcttagttaccggggatcctctagagtcgacc	Construct T25-Linker-ComM
Op492	gcttaaagcgctgagtttagaaagatttcttaactaagaatcggccgctg	Construct T25-Linker-ComM
Op493	ggataacaattcacacaggaaacagctatgatgattaacacgatgtttgcgcg	Construct ComM-FLAG-T18
Op494	cttatcgtcgtcatccttgaatcagaaatcttctaaaactcagcgcttaagc	Construct ComM-FLAG-T18
Op495	cgcgcaaacatcgtgtaatacatcatagctgttctcgtgtgaaattgttatcc	Construct ComM-FLAG-T18
Op496	gggtaccgagctcgaattcatcgataatgattaacacgatgtttgcgcgaccatg	ConstructT18-Linker-ComM
Op497	attgtactgagagtgcacatattacttagttaagaaatcttctaaaactcagcg	ConstructT18-Linker-ComM
Op498	catggtcgcgcaaacatcgtgtaatacattatcgatgaattcgagctcggtacc	ConstructT18-Linker-ComM

Op499	gcgctgagtttagaaaagatttctaactaagtaatatggtgcactctcagtacaat	ConstructT18-Linker-ComM
Op829	gaagaagcgttatctcaaatttgggaagaagcttttagaatacagagctgttgg	DprA-D245K-F
Op830	ccaacagctcgtattctaaaagcttctcccaaatttgagatacgttcttc	DprA-D245K-R
Op831	gatctcaaatttggggataagcttgagaatacagagctgttgggtaagatc	DprA-L248A-F
Op832	gatcttaccacagctcgtattctgcaagcttatcccaaatttgagatac	DprA-L248A-R
Op833	gatctcaaatttggggataagcttgaagaatacagagctgttgggtaagatc	DprA-L248E-F
Op834	gatcttaccacagctcgtattctcaagcttatcccaaatttgagatac	DprA-L248E-R
Op835	ctcaaatttggggataagctttaagatacagagctgttgggtaagatcaagc	DprA-E249R-F
Op836	gcttgatcttaccacagctcgtattctaaaagcttatcccaaatttgag	DprA-E249R-R
Op837	ggggataagcttttagaatacaggcggttgggtaagatcaagcgcatcaatc	DprA-L252A-F
Op838	gattgatgcgcttgatcttaccacagcctcgtattctaaaagcttatcccc	DprA-L252A-R
Op839	ggggataagcttttagaatacaggagttgggtaagatcaagcgcatcaatc	DprA-L252E-F
Op840	gattgatgcgcttgatcttaccacactcctcgtattctaaaagcttatcccc	DprA-L252E-R
Op841	gttgttgagcaggcgggtgaagagttaatctctcatgcgctctattaataag	ComM-R464E-F
Op842	cttattaatagagcgcatggagagattaaactctcaaccgctgctccaacaac	ComM-R464E-R
Op843	gttgttgagcaggcgggtgaaggctaatctctcatgcgctctattaataag	ComM-F465A-F
Op844	cttattaatagagcgcatggagagattagcccttcaaccgctgctccaacaac	ComM-F465A-R
Op845	gttgttgagcaggcgggtgaaggcagaatctctcatgcgctctattaataag	ComM-F465Q-F
Op846	cttattaatagagcgcatggagagattctgccttcaaccgctgctccaacaac	ComM-F465Q-R
Op847	gatttaaagcgttgaggatataagaactctcacatgcttaaagcgtgagt	ComM-K493D-F
Op848	actcagcgtttaagcatgtgagagcttctatatctcgaagcgtttaatc	ComM-K493D-R
Op849	cgaggatataaaaaatctcacatggctaaagcgtgagtttagaaagatttc	ComM-L497A-F
Op850	gaaatcttctaaaactcagcgttttagcatgtgagattttctatatcctcg	ComM-L497A-R
Op851	cgaggatataaaaaatctcacatggagaaagcgtgagtttagaaagatttc	ComM-L497E-F
Op852	gaaatcttctaaaactcagcgtttctcatgtgagattttctatatcctcg	ComM-L497E-R
Op882	ggggataagcttttagaataaccggctgttgggtaagatcaagcgcatcaatc	DprA-E251R-F
Op883	gattgatgcgcttgatcttaccacagccggtattctaaaagcttatcccc	DprA-E251R-R
Op884	gcttaaagcgtgagtttagagagattctgattacaaggatgacgacgataag	ComM-K504E-T18 F
Op885	cttatcgtcgtcatccttgaatcagaaatctctaaaactcagcgtttaagc	ComM-K504E-T18 R
Op886	gcgctgagtttagagagatttctaactaagtaatatggtgcactctcagtacaat	T18-ComM-K504E-F
Op887	attgtactgagagtcacatattacttagttaagaaatctctaaaactcagcgc	T18-ComM-K504E-R
Op888	gaagcgttagaaatctgcaaaacctgaagattacaaggatgacgacgataag	ComM-Nter-T18 - F
Op889	cttatcgtcgtcatccttgaatctcagggtttgcaagatttctaacgcttc	ComM-Nter-T18 - R
Op890	gataacaatttcacacaggaacagctatgaacgataaagagtattattttcagacg	ComM-Cter-T18 - F
Op891	cgtctgaaaaataactctttatctgtcatagctgttctcgtgtgaaattgtatc	ComM-Cter-T18 - R
Op892	gaagcgttagaaatctgcaaaacctgaataactaagtaatatggtgcactctcag	T18-ComM-Nter - F

Op893	ctgagagtgcaccatattacttagttattcagggttttgaagatttcaacgcttc	T18-ComM-Nter - R
Op894	gggtaccgagctcgaattcatcgatagaacgataaagagtattatmtttcagacgcc	T18-ComM-Cter - F
Op895	ggcgtctgaaaaataataactctttatcgttctatcgatgaattcgagctcggtagcc	T18-ComM-Cter - R

Tableau 8 Liste des plasmides utilisés pour le double hybride bactérien

N°	Vecteur	Génotype
1542	pUT18C	T18-DprA
1544	pKNT25	DprA-T25
1545	pUT18	DprA-T18
1548	pKNT25	ComM-T25
1550	pUT18	ComM-T18
1551	pUT18	ComM-T18
1552	pUT18C	T18-ComM
1553	pUT18C	T18-RadA
1555	pKT25	T25-RadA
1561	pKT25	T25-Zip
1562	pUT18C	T18-Zip
1568	pUT18	WH-T18 (DprA)
1570	pUT18	RF-T18 (DprA)
1577	pKNT25	WH-T25 (DprA)
1578	pKNT25	RF-T25 (DprA)
1589	pKT25	T25-ComM
1645	pKNT25	DprA-WH-T25-D245K
1646	pKNT25	DprA-WH-T25-L248A
1647	pKNT25	DprA-WH-T25-L248E
1648	pKNT25	DprA-WH-T25-L249R
1649	pKNT25	DprA-WH-T25-L252A
1650	pKNT25	DprA-WH-T25-L252E
1651	pUT18	ComM-T18-F465A
1652	pUT18C	T18-ComM-F465AQ
1653	pUT18	ComM-T18-K493D
1654	pUT18C	T18-ComM-K493D
1655	pUT18	ComM-T18-L497A
1656	pUT18C	T18-ComM-L497A
1657	pUT18C	T18-ComM-L497E
1727	pUT18	ComM-T18 K504E
1728	pUT18C	T18-ComM K504E
1730	pUT18	ComM-Nter-T18
1732	pUT18	ComM-Cter-T18
1734	pKNT25	DprA-WH-T25 E251R
1745	pUT18	ComM-T18 R464E
1746	pUT18C	T18-ComM R464



# Référence bibliographique

Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. & Berg, D.E. (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 20 (19), 5137–5142.

Alloway, J.L. (1932) THE TRANSFORMATION IN VITRO OF R PNEUMOCOCCI INTO S FORMS OF DIFFERENT SPECIFIC TYPES BY THE USE OF FILTERED PNEUMOCOCCUS EXTRACTS. *The Journal of Experimental Medicine*. 55 (1), 91–99.

Alm, R.A., Ling, L.-S.L., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., et al. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397 (6715), 176–180. doi:10.1038/16495.

Alm, R.A. & Trust, T.J. (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *Journal of Molecular Medicine*. 77 (12), 834–846. doi:10.1007/s001099900067.

Ambur, O.H., Frye, S.A. & Tønjum, T. (2007) New functional identity for the DNA uptake sequence in transformation and its presence in transcriptional terminators. *Journal of Bacteriology*. 189 (5), 2077–2085. doi:10.1128/JB.01408-06.

Amundsen, S.K., Fero, J., Salama, N.R. & Smith, G.R. (2009) Dual nuclease and helicase activities of *Helicobacter pylori* AddAB are required for DNA repair, recombination, and mouse infectivity. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (25), 16759–16766. doi:10.1074/jbc.M109.005587.

Appelmelk, B.J., Faller, G., Claeys, D., Kirchner, T. & Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1998) Bugs on trial: the case of *Helicobacter pylori* and autoimmunity. *Immunology Today*. 19 (7), 296–299. doi:10.1016/S0167-5699(98)01281-X.

Appelmelk, B.J., Negrini, R., Moran, A.P. & Kuipers, E.J. (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends in Microbiology*. 5 (2), 70–73. doi:10.1016/S0966-842X(96)10084-6.

Attaiech, L., Olivier, A., Mortier-Barrière, I., Soulet, A.-L., Granadel, C., Martin, B., Polard, P. & Claverys, J.-P. (2011) Role of the Single-Stranded DNA-Binding Protein SsbB in Pneumococcal Transformation: Maintenance of a Reservoir for Genetic Plasticity. *PLoS Genetics*. 7 (6), e1002156. doi:10.1371/journal.pgen.1002156.

- Avery, O.T., MacLeod, C.M. & McCarty, M. (1944) STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *The Journal of Experimental Medicine*. 79 (2), 137–158.
- Azuma, T., Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ohtani, M., Muramatsu, A., Suto, H., Ito, Y., Dojo, M., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., Keida, Y., Higashi, H. & Hatakeyama, M. (2004) Association between Diversity in the Src Homology 2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatase Binding Site of *Helicobacter pylori* CagA Protein and Gastric Atrophy and Cancer. *The Journal of Infectious Diseases*. 189 (5), 820–827. doi:10.1086/381782.
- Backert, S., Haas, R., Gerhard, M. & Naumann, M. (2017) The *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System Encoded by the *cag* Pathogenicity Island: Architecture, Function, and Signaling. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 413, 187–220. doi:10.1007/978-3-319-75241-9\_8.
- Baker, J.A., Simkovic, F., Taylor, H.M.C. & Rigden, D.J. (2016) Potential DNA binding and nuclease functions of ComEC domains characterized in silico. *Proteins*. 84 (10), 1431–1442. doi:10.1002/prot.25088.
- Baltrus, D.A. & Guillemin, K. (2006) Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *FEMS Microbiology Letters*. 255 (1), 148–155. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00066.x.
- Beam, C.E., Saveson, C.J. & Lovett, S.T. (2002) Role for *radA/sms* in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184 (24), 6836–6844. doi:10.1128/JB.184.24.6836-6844.2002.
- Bell, J.C. & Kowalczykowski, S.C. (2016) RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends in Biochemical Sciences*. 41 (6), 491–507. doi:10.1016/j.tibs.2016.04.002.
- Bergé, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B. & Claverys, J.-P. (2003) Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Molecular Microbiology*. 50 (2), 527–536. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03702.x.
- Bergé, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B. & Claverys, J.-P. (2002) Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 45 (2), 411–421. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03013.x.
- Berry, J.-L., Xu, Y., Ward, P.N., Lea, S.M., Matthews, S.J. & Pelicic, V. (2016) A Comparative Structure/Function Analysis of Two Type IV Pilin DNA Receptors Defines a Novel Mode of DNA Binding. *Structure(London, England:1993)*. 24 (6), 926–934. doi:10.1016/j.str.2016.04.001.
- Bik, E.M., Eckburg, P.B., Gill, S.R., Nelson, K.E., Purdom, E.A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M.J. & Relman, D.A. (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (3), 732–737. doi:10.1073/pnas.0506655103.

- Bjorkholm, B., Sjolund, M., Falk, P.G., Berg, O.G., Engstrand, L. & Andersson, D.I. (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98 (25), 14607–14612. doi:10.1073/pnas.241517298.
- Blokesch, M. (2017) In and out—contribution of natural transformation to the shuffling of large genomic regions. *Current Opinion in Microbiology*. 38, 22–29. doi:10.1016/j.mib.2017.04.001.
- Blokesch, M. (2016) Natural competence for transformation. *Current Biology*. 26 (21), R1126–R1130. doi:10.1016/j.cub.2016.08.058.
- Bobb, D. (1963) Overnight Incubation Technique for obtaining Transformable *Bacillus subtilis* Cells of Reproducible Competency. *Nature*. 199 (4895), 828–829. doi:10.1038/199828a0.
- Bode, G., Rothenbacher, D., Brenner, H. & Adler, G. (1998) Pets are not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in young children: results of a population-based study in Southern Germany. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 17 (10), 909–912. doi:10.1097/00006454-199810000-00012.
- Boutry, C., Delplace, B., Clippe, A., Fontaine, L. & Hols, P. (2013) SOS response activation and competence development are antagonistic mechanisms in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*. 195 (4), 696–707. doi:10.1128/JB.01605-12.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. & Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68 (6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- Brimacombe, C.A., Ding, H., Johnson, J.A. & Beatty, J.T. (2015) Homologues of Genetic Transformation DNA Import Genes Are Required for *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Recipient Capability Regulated by the Response Regulator CtrA P. de Boer (ed.). *Journal of Bacteriology*. 197 (16), 2653–2663. doi:10.1128/JB.00332-15.
- Buck, G.E. & Smith, J.S. (1987) Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 25 (4), 597–599.
- Burmeister, A.R. (2015) Horizontal Gene Transfer. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 2015 (1), 193–194. doi:10.1093/emph/eov018.
- Cascales, E. & Christie, P.J. (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science (New York, N.Y.)*. 304 (5674), 1170–1173. doi:10.1126/science.1095211.
- Cave, D.R. (1997) How is *Helicobacter pylori* Transmitted? *Gastroenterology*. 113 (6), S9–S14. doi:10.1016/S0016-5085(97)80004-2.
- Cellini, L. (2014) *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 20 (19), 5575–5582. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5575.

- Chang, K.C., Yeh, Y.C., Lin, T.L. & Wang, J.T. (2001) Identification of genes associated with natural competence in *Helicobacter pylori* by transposon shuttle random mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288 (4), 961–968. doi:10.1006/bbrc.2001.5877.
- Chang, Y.-W., Rettberg, L.A., Treuner-Lange, A., Iwasa, J., Sogaard-Andersen, L. & Jensen, G.J. (2016) Architecture of the type IVa pilus machine. *Science (New York, N.Y.)*. 351 (6278), aad2001. doi:10.1126/science.aad2001.
- Chen, I. & Gotschlich, E.C. (2001) ComE, a Competence Protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-Binding Activity. *Journal of Bacteriology*. 183 (10), 3160–3168. doi:10.1128/JB.183.10.3160-3168.2001.
- Claverys, J.-P. & Havarstein, L.S. (2002) Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 7, d1798-1814. doi:10.2741/claverys.
- Claverys, J.-P., Martin, B. & Polard, P. (2009) The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS microbiology reviews*. 33 (3), 643–656. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00164.x.
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M. & Martin, B. (2006) Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 60 (1), 451–475. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142139.
- Corbinais, C., Mathieu, A., Damke, P.P., Kortulewski, T., Busso, D., Prado-Acosta, M., Radicella, J.P. & Marsin, S. (2017) ComB proteins expression levels determine *Helicobacter pylori* competence capacity. *Scientific Reports*. 7 (1). doi:10.1038/srep41495.
- Corbinais, C., Mathieu, A., Kortulewski, T., Radicella, J.P. & Marsin, S. (2016) Following transforming DNA in *Helicobacter pylori* from uptake to expression. *Molecular Microbiology*. 101 (6), 1039–1053. doi:10.1111/mmi.13440.
- Damke, P.P., Celma, L., Kondekar, S.M., Di Guilmi, A.M., Marsin, S., Dépagne, J., Veaute, X., Legrand, P., Walbott, H., Vercruyssen, J., Guérois, R., Quevillon-Cheruel, S. & Radicella, J.P. (2022) ComFC mediates transport and handling of single-stranded DNA during natural transformation. *Nature Communications*. 13 (1), 1961. doi:10.1038/s41467-022-29494-z.
- Damke, P.P., Di Guilmi, A.M., Varela, P.F., Velours, C., Marsin, S., Veaute, X., Machouri, M., Gunjal, G.V., Rao, D.N., Charbonnier, J.-B. & Radicella, J.P. (2019) Identification of the periplasmic DNA receptor for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *Nature Communications*. 10. doi:10.1038/s41467-019-13352-6.
- Diallo, A., Foster, H.R., Gromek, K.A., Perry, T.N., Dujeancourt, A., Krasteva, P.V., Gubellini, F., Falbel, T.G., Burton, B.M. & Fronzes, R. (2017) Bacterial transformation: ComFA is a DNA-dependent ATPase that forms complexes with ComFC and DprA. *Molecular Microbiology*. 105 (5), 741–754. doi:10.1111/mmi.13732.



- Dillingham, M.S. & Kowalczykowski, S.C. (2008) RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR.* 72 (4), 642–671. doi:10.1128/MMBR.00020-08.
- Dorer, M.S., Fero, J. & Salama, N.R. (2010) DNA Damage Triggers Genetic Exchange in *Helicobacter pylori*. S.R. Blanke (ed.). *PLoS Pathogens.* 6 (7), e1001026. doi:10.1371/journal.ppat.1001026.
- Draskovic, I. & Dubnau, D. (2005) Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Molecular Microbiology.* 55 (3), 881–896. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04430.x.
- Dubnau, D. (1999) DNA Uptake in Bacteria. *Annual Review of Microbiology.* 53 (1), 217–244. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.217.
- Dubois, A., Berg, D.E., Incecik, E.T., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Perez-Perez, G.I. & Blaser, M.J. (1996) Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infection and Immunity.* 64 (8), 2885–2891. doi:10.1128/iai.64.8.2885-2891.1996.
- Dwivedi, G.R., Srikanth, K.D., Anand, P., Naikoo, J., Srilatha, N.S. & Rao, D.N. (2015) Insights into the Functional Roles of N-Terminal and C-Terminal Domains of *Helicobacter pylori* DprA. *PLOS ONE.* 10 (7), e0131116. doi:10.1371/journal.pone.0131116.
- Ellison, C.K., Dalia, T.N., Vidal Ceballos, A., Wang, J.C.-Y., Biais, N., Brun, Y.V. & Dalia, A.B. (2018) Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nature Microbiology.* 3 (7), 773–780. doi:10.1038/s41564-018-0174-y.
- Enroth, H., Björkholm, B. & Engstrand, L. (1999) Occurrence of resistance mutation and clonal expansion in *Helicobacter pylori* multiple-strain infection: a potential risk in clarithromycin-based therapy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America.* 28 (6), 1305–1307. doi:10.1086/514796.
- Fauchère, J.-L. (2017) La folle histoire de la découverte de *Helicobacter pylori* - La Revue de Biologie Médicale. *Feuillets de Biologie.* 336 (51–8).
- Fernández, S., Ayora, S. & Alonso, J.C. (2000) *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Research in Microbiology.* 151 (6), 481–486. doi:10.1016/s0923-2508(00)00165-0.
- Ferrand, J. (2009) *Helicobacter pylori* dans un modèle de carcinogénèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses. These de doctorat. Bordeaux 2. <http://www.theses.fr/2009BOR21627>.
- Fischer, W., Püls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. & Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology.* 42 (5), 1337–1348. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02714.x.

- Fischer, W., Tegtmeyer, N., Stingl, K. & Backert, S. (2020) Four Chromosomal Type IV Secretion Systems in *Helicobacter pylori*: Composition, Structure and Function. *Frontiers in Microbiology*. 11, 1592. doi:10.3389/fmicb.2020.01592.
- Gangel, H., Hepp, C., Müller, S., Oldewurtel, E.R., Aas, F.E., Koomey, M. & Maier, B. (2014) Concerted Spatio-Temporal Dynamics of Imported DNA and ComE DNA Uptake Protein during Gonococcal Transformation. *PLOS Pathogens*. 10 (4), e1004043. doi:10.1371/journal.ppat.1004043.
- García-Ortíz, M.-V., Marsin, S., Arana, M.E., Gasparutto, D., Guérois, R., Kunkel, T.A. & Radicella, J.P. (2011) Unexpected Role for *Helicobacter pylori* DNA Polymerase I As a Source of Genetic Variability. *PLOS Genetics*. 7 (6), e1002152. doi:10.1371/journal.pgen.1002152.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y. & Burrows, L.L. (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 76 (4), 740–772. doi:10.1128/MMBR.00035-12.
- Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y. & Musser, J.M. (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *Journal of Bacteriology*. 178 (13), 3934–3938.
- Goodwin, C.S. & Armstrong, J.A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 9 (1), 1–13. doi:10.1007/BF01969526.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McCONNELL, W. & Harper, W.E.S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39 (4), 397–405. doi:10.1099/00207713-39-4-397.
- Goodwin, C.S., Blincow, E.D., Warren, J.R., Waters, T.E., Sanderson, C.R. & Easton, L. (1985) Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *Journal of Clinical Pathology*. 38 (10), 1127–1131.
- Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K.-P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y., Kraft, C., Suerbaum, S., Meyer, T.F. & Achtman, M. (2005) Gain and Loss of Multiple Genes During the Evolution of *Helicobacter pylori* T. Gojobori (ed.). *PLoS Genetics*. 1 (4), e43. doi:10.1371/journal.pgen.0010043.
- Griffith, Fred. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene*. 27 (2), 113–159.
- Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G. & Backert, S. (2018) Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 107 (4), 455–471. doi:10.1111/mmi.13896.

- Grossman, A.D. (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*. 29, 477–508. doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.002401.
- Grove, D.E., Willcox, S., Griffith, J.D. & Bryant, F.R. (2005) Differential Single-stranded DNA Binding Properties of the Paralogous SsbA and SsbB Proteins from *Streptococcus pneumoniae*\*. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (12), 11067–11073. doi:10.1074/jbc.M414057200.
- Guevara, B. & Cogdill, A.G. (2020) *Helicobacter pylori*: A Review of Current Diagnostic and Management Strategies. *Digestive Diseases and Sciences*. 65 (7), 1917–1931. doi:10.1007/s10620-020-06193-7.
- Gwinn, M.L., Ramanathan, R., Smith, H.O. & Tomb, J.-F. (1998) A New Transformation-Deficient Mutant of *Haemophilus influenzae* Rd with Normal DNA Uptake. *Journal of Bacteriology*. 180 (3), 746–748.
- Hamoen, L.W., Venema, G. & Kuipers, O.P. (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology (Reading, England)*. 149 (Pt 1), 9–17. doi:10.1099/mic.0.26003-0.
- Hardy, L. (2021) *Analyse génétique exhaustive du mécanisme de transformation naturelle chez Legionella pneumophila et caractérisation d'un nouvel acteur conservé chez les bactéries Gram-négative*. Université de Lyon
- Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews Cancer*. 4 (9), 688–694. doi:10.1038/nrc1433.
- Herriott, R.M., Meyer, E.M. & Vogt, M. (1970) Defined Nongrowth Media for Stage II Development of Competence in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*. 101 (2), 517–524. doi:10.1128/jb.101.2.517-524.1970.
- Hobbs, M. & Mattick, J.S. (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular Microbiology*. 10 (2), 233–243. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01949.x.
- Hofreuter, D., Karnholz, A. & Haas, R. (2003) Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *International Journal of Medical Microbiology*. 293 (2–3), 153–165. doi:10.1078/1438-4221-00258.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. & Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular Microbiology*. 41 (2), 379–391. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02502.x.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G. & Haas, R. (1998) Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori* : identification and genetic characterization of the comB locus. *Molecular Microbiology*. 28 (5), 1027–1038. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00879.x.

- Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G. & Ng, S.C. (2017) Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 153 (2), 420–429. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022.
- Huang, L., Tian, X., Liu, M., Wang, M., Biville, F., et al. (2019) DprA Is Essential for Natural Competence in *Riemerella anatipestifer* and Has a Conserved Evolutionary Mechanism. *Frontiers in Genetics*. 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00429>.
- Humbert, O., Dorer, M.S. & Salama, N.R. (2011) Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination: *Helicobacter pylori* inter-strain recombination. *Molecular Microbiology*. 79 (2), 387–401. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07456.x.
- Ivančić-Baće, I., Salaj-Šmic, E. & Brčić-Kostić, K. (2005) Effects of recJ, recQ, and recFOR Mutations on Recombination in Nuclease-Deficient recB recD Double Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 187 (4), 1350–1356. doi:10.1128/JB.187.4.1350-1356.2005.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. & Taylor, D.E. (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular Microbiology*. 20 (4), 833–842. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02521.x.
- Jiang, X. & Doyle, M.P. (2000) Growth Supplements for *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (5), 1984–1987.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. & Claverys, J.-P. (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology*. 12 (3), 181–196. doi:10.1038/nrmicro3199.
- Jonaitis, L., Pellicano, R. & Kupcinskas, L. (2018) *Helicobacter pylori* and nonmalignant upper gastrointestinal diseases. *Helicobacter*. 23 (S1), e12522. doi:10.1111/hel.12522.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596 (7873), 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kang, J. & Blaser, M.J. (2008) Repair and Antirepair DNA Helicases in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 190 (12), 4218–4224. doi:10.1128/JB.01848-07.
- Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D. & Haas, R. (2006) Functional and Topological Characterization of Novel Components of the comB DNA Transformation Competence System in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 188 (3), 882–893. doi:10.1128/JB.188.3.882-893.2006.
- Kaufenstein, M., van der Laan, M. & Graumann, P.L. (2011) The Three-Layered DNA Uptake Machinery at the Cell Pole in Competent *Bacillus subtilis* Cells Is a Stable Complex. *Journal of Bacteriology*. 193 (7), 1633–1642. doi:10.1128/JB.01128-10.

- Kidd, M. & Modlin, I.M. (1998) A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion*. 59 (1), 1–15. doi:10.1159/000007461.
- Konturek, S.J., Konturek, P.C., Konturek, J.W., Plonka, M., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T. & Bielanski, W. (2006) *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*. 57 Suppl 3, 29–50.
- Koomey, J.M. & Falkow, S. (1987) Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *Journal of Bacteriology*. 169 (2), 790–795. doi:10.1128/jb.169.2.790-795.1987.
- Kraft, C. & Suerbaum, S. (2005) Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 295 (5), 299–305. doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.002.
- Kramer, N., Hahn, J. & Dubnau, D. (2007) Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 65 (2), 454–464. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05799.x.
- Krüger, N.-J., Knüver, M.-T., Zawilak-Pawlik, A., Appel, B. & Stingl, K. (2016) Genetic Diversity as Consequence of a Microaerobic and Neutrophilic Lifestyle. *PLOS Pathogens*. 12 (5), e1005626. doi:10.1371/journal.ppat.1005626.
- Krzyżek, P. & Grande, R. (2020) Transformation of *Helicobacter pylori* into Coccoid Forms as a Challenge for Research Determining Activity of Antimicrobial Substances. *Pathogens*. 9 (3), 184. doi:10.3390/pathogens9030184.
- Kuipers, E.J., Israel, D.A., Kusters, J.G. & Blaser, M.J. (1998) Evidence for a Conjugation-Like Mechanism of DNA Transfer in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 180 (11), 2901–2905. doi:10.1128/JB.180.11.2901-2905.1998.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (4), 751–813.
- Labigne, A., Cussac, V. & Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *Journal of Bacteriology*. 173 (6), 1920–1931.
- Lacks, S., Greenberg, B. & Neuberger, M. (1975) Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 123 (1), 222–232.
- Lacks, S. & Neuberger, M. (1975) Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 124 (3), 1321–1329.
- Lazizzera, B.A. & Grossman, A.D. (1998) The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*. 6 (7), 288–294. doi:10.1016/S0966-842X(98)01313-4.

- Li, Y.G. & Christie, P.J. (2018) The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: Mechanism and Architecture Defined Through In Vivo Mutagenesis and Chimeric Systems. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 418, 233–260. doi:10.1007/82\_2018\_94.
- Lisboa, J., Celma, L., Sanchez, D., Marquis, M., Andreani, J., Guérois, R., Ochsenbein, F., Durand, D., Marsin, S., Cuniasse, P., Radicella, J.P. & Quevillon-Cheruel, S. (2019) The C-terminal domain of HpDprA is a DNA-binding winged helix domain that does not bind double-stranded DNA. *The FEBS Journal*. 286 (10), 1941–1958. doi:10.1111/febs.14788.
- Londoño-Vallejo, J.A. & Dubnau, D. (1993) comF, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Molecular Microbiology*. 9 (1), 119–131. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01674.x.
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1994) Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *MICROBIOL. REV.* 58, 40.
- Loughlin, M.F., Barnard, F.M., Jenkins, D., Sharples, G.J. & Jenks, P.J. (2003) *Helicobacter pylori* Mutants Defective in RuvC Holliday Junction Resolvase Display Reduced Macrophage Survival and Spontaneous Clearance from the Murine Gastric Mucosa. *Infection and Immunity*. 71 (4), 2022–2031. doi:10.1128/IAI.71.4.2022-2031.2003.
- Luo, C.-H., Chiou, P.-Y., Yang, C.-Y. & Lin, N.-T. (2012) Genome, integration, and transduction of a novel temperate phage of *Helicobacter pylori*. *Journal of Virology*. 86 (16), 8781–8792. doi:10.1128/JVI.00446-12.
- Maamar, H. & Dubnau, D. (2005) Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Molecular Microbiology*. 56 (3), 615–624. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04592.x.
- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D. & Sheetz, M.P. (2004) DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nature Structural & Molecular Biology*. 11 (7), 643–649. doi:10.1038/nsmb783.
- Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L. & Mégraud, F. (1999) Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (3), 642–674.
- Marie, L., Rapisarda, C., Morales, V., Bergé, M., Perry, T., Soulet, A.-L., Gruget, C., Remaut, H., Fronzes, R. & Polard, P. (2017) Bacterial RadA is a DnaB-type helicase interacting with RecA to promote bidirectional D-loop extension. *Nature Communications*. 8 (1). doi:10.1038/ncomms15638.
- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B. & Clancy, R.J. (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Medical Journal of Australia*. 142 (8), 436–439. doi:10.5694/j.1326-5377.1985.tb113443.x.
- Marshall, B.J., Royce, H.D., Di, A., Goodwin, C.S., Pearman, J.W., Warren, J.R. & Armstrong, J.A. (1984) *Original isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa*. In: 1984 p.

- Marsin, S., Lopes, A., Mathieu, A., Dizet, E., Orillard, E., Guérois, R. & Radicella, J.P. (2010) Genetic dissection of *Helicobacter pylori* AddAB role in homologous recombination. *FEMS microbiology letters*. 311 (1), 44–50. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02077.x.
- Marsin, S., Mathieu, A., Kortulewski, T., Guérois, R. & Radicella, J.P. (2008) Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS genetics*. 4 (8), e1000146. doi:10.1371/journal.pgen.1000146.
- Mathieu, A., O'Rourke, E.J. & Radicella, J.P. (2006) *Helicobacter pylori* genes involved in avoidance of mutations induced by 8-oxoguanine. *Journal of Bacteriology*. 188 (21), 7464–7469. doi:10.1128/JB.00851-06.
- Mell, J.C., Hall, I.M. & Redfield, R.J. (2012) Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells. *Nucleic Acids Research*. 40 (17), 8536–8549. doi:10.1093/nar/gks640.
- Michod, R.E., Wojciechowski, M.F. & Hoelzer, M.A. (1988) DNA repair and the evolution of transformation in the bacterium *Bacillus subtilis*. *Genetics*. 118 (1), 31–39. doi:10.1093/genetics/118.1.31.
- Mirouze, N., Ferret, C., Cornilleau, C. & Carballido-López, R. (2018) Antibiotic sensitivity reveals that wall teichoic acids mediate DNA binding during competence in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*. 9 (1), 5072. doi:10.1038/s41467-018-07553-8.
- Moore, M.E., Lam, A., Bhatnagar, S. & Solnick, J.V. (2014) Environmental Determinants of Transformation Efficiency in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 196 (2), 337–344. doi:10.1128/JB.00633-13.
- Morrison, D.A., Mortier-Barrière, I., Attaiech, L. & Claverys, J.-P. (2007) Identification of the Major Protein Component of the Pneumococcal Eclipse Complex. *Journal of Bacteriology*. 189 (17), 6497–6500. doi:10.1128/JB.00687-07.
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., Le Cam, E., Polard, P. & Claverys, J.-P. (2007) A Key Presynaptic Role in Transformation for a Widespread Bacterial Protein: DprA Conveys Incoming ssDNA to RecA. *Cell*. 130 (5), 824–836. doi:10.1016/j.cell.2007.07.038.
- Muñoz, A.B., Stepanian, J., Trespalacios, A.A. & Vale, F.F. (2020) Bacteriophages of *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology*. 11, 549084. doi:10.3389/fmicb.2020.549084.
- Nero, T.M., Dalia, T.N., Wang, J.C.-Y., Kysela, D.T., Bochman, M.L. & Dalia, A.B. (2018a) ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Research*. 46 (12), 6099–6111. doi:10.1093/nar/gky343.
- Nero, T.M., Dalia, T.N., Wang, J.C.-Y., Kysela, D.T., Bochman, M.L. & Dalia, A.B. (2018b) ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Research*. 46 (12), 6099–6111. doi:10.1093/nar/gky343.

- Nilius, M. & Malfertheiner, P. (1996) Helicobacter pylori enzymes. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 10 (Sup1), 65–71. doi:10.1046/j.1365-2036.1996.22164007.x.
- Orillard, E., Radicella, J.P. & Marsin, S. (2011) Biochemical and cellular characterization of Helicobacter pylori RecA, a protein with high-level constitutive expression. *Journal of Bacteriology*. 193 (23), 6490–6497. doi:10.1128/JB.05646-11.
- O'Toole, P.W., Lane, M.C. & Porwollik, S. (2000) Helicobacter pylori motility. *Microbes and Infection*. 2 (10), 1207–1214. doi:10.1016/S1286-4579(00)01274-0.
- Peden, J.F., Moxon, E.R. & Saunders, N.J. (1999) Absence in Helicobacter pylori of an uptake sequence for enhancing uptake of homospesific DNA during transformation. *Microbiology*. 145 (12), 3523–3528. doi:10.1099/00221287-145-12-3523.
- Pimentel, Z.T. & Zhang, Y. (2018) Evolution of the Natural Transformation Protein, ComEC, in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2980. doi:10.3389/fmicb.2018.02980.
- Pinto, A.V., Mathieu, A., Marsin, S., Veaute, X., Ielpi, L., Labigne, A. & Radicella, J.P. (2005) Suppression of Homologous and Homeologous Recombination by the Bacterial MutS2 Protein. *Molecular Cell*. 17 (1), 113–120. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.035.
- Provedì, R., Chen, I. & Dubnau, D. (2001) NucA is required for DNA cleavage during transformation of Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*. 40 (3), 634–644. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02406.x.
- Provedì, R. & Dubnau, D. (1999) ComEA is a DNA receptor for transformation of competent Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*. 31 (1), 271–280. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01170.x.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B. & Claverys, J.-P. (2006) Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen Streptococcus pneumoniae. *Science*. 313 (5783), 89–92. doi:10.1126/science.1127912.
- Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barrière, I., Brooks, M.A., Boudes, M., Durand, D., Soulet, A.-L., Lisboa, J., Noirot, P., Martin, B., van Tilbeurgh, H., Noirot-Gros, M.-F., Claverys, J.-P. & Polard, P. (2012) Structure–function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (37), E2466–E2475. doi:10.1073/pnas.1205638109.
- Redfield, R.J. (2001) Do bacteria have sex? *Nature Reviews Genetics*. 2 (8), 634–639. doi:10.1038/35084593.
- Redfield, R.J., Cameron, A.D.S., Qian, Q., Hinds, J., Ali, T.R., Kroll, J.S. & Langford, P.R. (2005) A Novel CRP-dependent Regulon Controls Expression of Competence Genes in Haemophilus influenzae. *Journal of Molecular Biology*. 347 (4), 735–747. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.012.
- de Reuse, H. & Bereswill, S. (2007) Ten years after the first Helicobacter pylori genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability and adaptability



of a persistent pathogen. *FEMS immunology and medical microbiology*. 50 (2), 165–176. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00244.x.

Rohrer, S., Holsten, L., Weiss, E., Benghezal, M., Fischer, W. & Haas, R. (2012) Multiple Pathways of Plasmid DNA Transfer in *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE*. 7 (9), e45623. doi:10.1371/journal.pone.0045623.

Rosenthal, A.L. & Lacks, S.A. (1980) Complex structure of the membrane nuclease of *Streptococcus pneumoniae* revealed by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 141 (2), 133–146. doi:10.1016/0022-2836(80)90381-2.

Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T. & Asaka, M. (2003) Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *The Journal of Infection*. 46 (1), 49–55. doi:10.1053/jinf.2002.1047.

Saunders, N.J., Peden, J.F., Hood, D.W. & Moxon, E.R. (1998) Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Molecular Microbiology*. 27 (6), 1091–1098. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00768.x.

Schmitt, W., Odenbreit, S., Heuermann, D. & Haas, R. (1995) Cloning of the *Helicobacter pylori* recA gene and functional characterization of its product. *Molecular and General Genetics MGG*. 248 (5), 563–572. doi:10.1007/BF02423452.

Seitz, P. & Blokesch, M. (2013a) Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 37 (3), 336–363. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x.

Seitz, P. & Blokesch, M. (2013b) DNA-uptake machinery of naturally competent *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (44), 17987–17992. doi:10.1073/pnas.1315647110.

Seitz, P., Modarres, H.P., Borgeaud, S., Bulushev, R.D., Steinbock, L.J., Radenovic, A., Peraro, M.D. & Blokesch, M. (2014) ComEA Is Essential for the Transfer of External DNA into the Periplasm in Naturally Transformable *Vibrio cholerae* Cells. *PLOS Genetics*. 10 (1), e1004066. doi:10.1371/journal.pgen.1004066.

Servetas, S.L., Bridge, D.R. & Merrell, D.S. (2016) Molecular Mechanisms of Gastric Cancer Initiation and Progression by *Helicobacter pylori*. *Current opinion in infectious diseases*. 29 (3), 304–310. doi:10.1097/QCO.0000000000000248.

Sharples, G.J., Ingleston, S.M. & Lloyd, R.G. (1999) Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *Journal of Bacteriology*. 181 (18), 5543–5550. doi:10.1128/JB.181.18.5543-5550.1999.

Sia, R.H.P. & Dawson, M.H. (1931) IN VITRO TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *The Journal of Experimental Medicine*. 54 (5), 701–710.

- Silale, A., Lea, S.M. & Berks, B.C. (2021) The DNA transporter ComEC has metal-dependent nuclease activity that is important for natural transformation. *Molecular Microbiology*. 116 (2), 416–426. doi:10.1111/mmi.14720.
- Smits, W.K., Eschevins, C.C., Susanna, K.A., Bron, S., Kuipers, O.P. & Hamoen, L.W. (2005) Stripping Bacillus: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Molecular Microbiology*. 56 (3), 604–614. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04488.x.
- Smoot, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F. & Resau, J.H. (1990) Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 58 (6), 1992–1994. doi:10.1128/iai.58.6.1992-1994.1990.
- Stefano, K., Marco, M., Federica, G., Laura, B., Barbara, B., Gioacchino, L., Francesco, di M. & Gian, L. de'Angelis (2018) Helicobacter pylori, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. 89 (Suppl 8), 72–76. doi:10.23750/abm.v89i8-S.7947.
- Stingl, K., Muller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M. & Maier, B. (2010) Composite system mediates two-step DNA uptake into Helicobacter pylori. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (3), 1184–1189. doi:10.1073/pnas.0909955107.
- Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I. & Achtman, M. (1998) Free recombination within Helicobacter pylori. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (21), 12619–12624. doi:10.1073/pnas.95.21.12619.
- Sun, Y., Bernardy, E.E., Hammer, B.K. & Miyashiro, T. (2013) Competence and natural transformation in vibrios. *Molecular Microbiology*. 89 (4), 583–595. doi:10.1111/mmi.12307.
- Sysoeva, T.A., Bane, L.B., Xiao, D.Y., Bose, B., Chilton, S.S., Gaudet, R. & Burton, B.M. (2015) Structural characterization of the late competence protein ComFB from Bacillus subtilis. *Bioscience Reports*. 35 (2), e00183. doi:10.1042/BSR20140174.
- Thalmaier, U., Lehn, N., Pfeffer, K., Stolte, M., Vieth, M. & Schneider-Brachert, W. (2002) Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Helicobacter pylori Gastritis in Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Deficient Mice. *Infection and Immunity*. 70 (6), 3149–3155. doi:10.1128/IAI.70.6.3149-3155.2002.
- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature*. 388 (6642), 539–547. doi:10.1038/41483.
- Torres, R., Serrano, E. & Alonso, J.C. (2019) Bacillus subtilis RecA interacts with and loads RadA/Sms to unwind recombination intermediates during natural chromosomal transformation. *Nucleic Acids Research*. 47 (17), 9198–9215. doi:10.1093/nar/gkz647.
- Torres, R., Serrano, E., Tramm, K. & Alonso, J.C. (2019a) Bacillus subtilis RadA/Sms contributes to chromosomal transformation and DNA repair in concert with RecA and circumvents

replicative stress in concert with DisA. *DNA Repair*. 77, 45–57. doi:10.1016/j.DNAREP.2019.03.002.

Torres, R., Serrano, E., Tramm, K. & Alonso, J.C. (2019b) *Bacillus subtilis* RadA/Sms contributes to chromosomal transformation and DNA repair in concert with RecA and circumvents replicative stress in concert with DisA. *DNA Repair*. 77, 45–57. doi:10.1016/j.dnarep.2019.03.002.

Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. & Elofsson, A. (2015) The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*. 43 (W1), W401–407. doi:10.1093/nar/gkv485.

Vegge, C.S., Brøndsted, L., Ligowska-Marzeta, M. & Ingmer, H. (2012) Natural Transformation of *Campylobacter jejuni* Occurs Beyond Limits of Growth. *PLOS ONE*. 7 (9), e45467. doi:10.1371/journal.pone.0045467.

Wiesner, R.S., Hendrixson, D.R. & DiRita, V.J. (2003) Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. *Journal of Bacteriology*. 185 (18), 5408–5418. doi:10.1128/JB.185.18.5408-5418.2003.

Wizla-Derambure, N., Michaud, L., Ategbo, S., Vincent, P., Ganga-Zandzou, S., Turck, D. & Gottrand, F. (2001) Familial and community environmental risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 33 (1), 58–63. doi:10.1097/00005176-200107000-00010.

Yeh, Y.-C., Lin, T.-L., Chang, K.-C. & Wang, J.-T. (2003) Characterization of a ComE3 Homologue Essential for DNA Transformation in *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 71 (9), 5427–5431. doi:10.1128/IAI.71.9.5427-5431.2003.

Yu, X.-J., Walker, D.H., Liu, Y. & Zhang, L. (2009) Amino acid biosynthesis deficiency in bacteria associated with human and animal hosts. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 9 (4), 514–517. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.002.

Zahradka, D., Zahradka, K., Petranović, M., Dermić, D. & Brčić-Kostić, K. (2002) The RuvABC Resolvase Is Indispensable for Recombinational Repair in *sbcB15* Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184 (15), 4141–4147. doi:10.1128/JB.184.15.4141-4147.2002.

Zhang, X., Jin, T., Deng, L., Wang, C., Zhang, Y. & Chen, X. (2018) Stress-Induced, Highly Efficient, Donor Cell-Dependent Cell-to-Cell Natural Transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 200 (17), e00267-18. doi:10.1128/JB.00267-18.

Zoaiter, M., Nasser, R., Hage-Sleiman, R., Abdel-Sater, F., Badran, B. & Zeaiter, Z. (2021) *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce expression and secretion of oncostatin M in AGS gastric cancer cells. *Brazilian Journal of Microbiology*. 52 (3), 1057–1066. doi:10.1007/s42770-021-00490-7.





**Titre : Etude de l'hélicase ComM dans la recombinaison homologue chez *Helicobacter pylori***

**Mots clés :** *Helicobacter pylori*, transformation naturelle, recombinaison homologue

**Résumé :** La transformation naturelle joue un rôle clé dans l'importante plasticité génomique de la bactérie à Gram-négatif *Helicobacter pylori*. Ce pathogène humain, qui infecte l'estomac de la moitié de la population, est à l'origine de nombreuses pathologies, telles que des gastrites, les ulcères et des cancers. Le transfert horizontal de gènes à travers la transformation naturelle est considéré comme un contributeur majeur à la propagation de résistances aux antibiotiques observée actuellement dans les infections par *H. pylori*. Chez *H. pylori* la capture et l'internalisation de l'ADN présentent des caractéristiques uniques. Certains des acteurs conservés dans la plupart des bactéries compétentes sont absents chez *H. pylori* alors que de nouvelles protéines impliquées dans la transformation y ont été identifiées. Parmi elles, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux candidates que nous avons découvertes comme essentielles pour la transformation. La majeure partie du travail de thèse se concentre sur HP0792, un homologue de ComM, une protéine présente chez les Gram négatifs. ComM est une hélicase jouant un rôle dans la recombinaison homologue lors de la transformation naturelle.

Par des approches génétiques et biochimiques, nous avons identifié deux fonctions de cette protéine chez *H. pylori*, dans la transformation naturelle et dans la recombinaison intra-génomique. Une délétion de *comM* entraîne une diminution de la transformation par un ADN portant une mutation ponctuelle (StrepR) d'un facteur 200 et d'un facteur similaire lors de l'intégration d'un ADN possédant 842 bp hétérologues. De plus, nous avons mis en évidence que ComM n'a pas d'impact sur la taille d'ADN inséré dans le génome. Ces résultats diffèrent des études publiées sur ComM chez *Vibrio cholerae* et *Acinetobacter baylyi*. Nous avons également mis en évidence par double hybride bactérien une interaction avec DprA et nous avons exploré les interactions de surface entre ces deux protéines. En parallèle, nous avons découvert un second rôle à ComM qui intervient dans la recombinaison de séquences répétées dans le génome. La seconde partie, mineure, explore le rôle de HP1421, une ATPase impliquée dans les premières étapes de la transformation naturelle chez *H. pylori* et potentiellement liée au système de sécrétion de type IV ComB.

**Title: Study of the ComM helicase in the homologous recombination in *Helicobacter pylori***

**Key words :** *Helicobacter pylori*, natural transformation, homologous recombination

**Abstract:** Natural transformation plays a major role in establishing the amazing genomic plasticity of *Helicobacter pylori*, a Gram-negative bacterium that infects the stomach of half of the human population and is at the origin of multiple pathologies including gastritis, ulcers and cancer. Horizontal gene transfer through natural transformation is thought to be a major contributor for the increase in antibiotic resistant strains observed in *H. pylori* infections. In this project, we will address some of the unique characteristics of the natural transformation mechanisms used by this human pathogen. Whilst many of the players in natural transformation are conserved among naturally competent bacteria, other components are absent in *H. pylori*. Furthermore, some seem to be unique for this pathogen. We focused our attention on two of those proteins that we have shown to be essential for transformation. The main part of this thesis aims at characterizing the role of HP0792, which is a homologue of ComM, a protein conserved in Gram-negative bacteria. ComM is a helicase potentially involved in the homologous recombination during natural transformation.

Our project combined genetics and biochemical approaches to identify two functions for ComM, in natural transformation and in intragenomic recombination. A *comM* deletion leads to a 200-fold reduction of the natural transformation rate when inserting a point mutation (StrepR). A similar reduction of the transformation rate is observed when integrating an 842 bp heterologous region. Moreover, we show that ComM is not involved in defining the length of tDNA inserted in the genome. Interestingly, these results are different from what was reported for *Vibrio cholera* and *Acinetobacter baylyi* in the literature. By bacterial two hybrid, we have also unveiled an interaction between ComM and DprA and have explored the surface interaction between the two proteins. In parallel, we discovered a new role for ComM in the recombination of genomic repeats. The second part addresses the role of HP1421, an ATPase involved in the first steps of the natural transformation in *H. pylori* and potentially associated with the ComB Type IV secretion system.