

Mécanisme d'arrêt de la compétence chez *Streptococcus salivarius*

Mémoire présenté lors de l'année académique 2019-2020
en vue de l'obtention du Master en Biochimie et Biologie
Moléculaire et Cellulaire

Par Morgane Lamontagne

Promoteur : Pr. Pascal Hols
Encadrant : Adrien Knoops

Université catholique de Louvain (UCL)
Louvain Institute of Biomolecular Science and Technology (LIBST)

Biochemistry and Genetics of Microorganisms (BGM)

Remerciements

Pour ce mémoire, il me faut remercier :

Pascal Hols, mon promoteur, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour ses nombreux conseils.

Adrien Knoops, mon encadrant, pour le temps passé à me former et à répondre à mes questions ainsi que pour la patience dont il a fait preuve au cours de ce mémoire et plus particulièrement lors de sa rédaction.

L'équipe BGM, pour m'avoir aidée quand Adrien n'était pas disponible. Je tiens d'ailleurs à remercier tout particulièrement Damien Evrard et Brigitte Delplace.

Ma famille pour m'avoir encouragée et aidé et en particulier ma belle-mère Rachèle Brivio pour les très nombreuses corrections orthographiques.

Résumé

Chez les bactéries, la réplication asexuée ne permet pas d'engendrer de la diversité génotypique. Celles-ci ont donc dû mettre en place des mécanismes alternatifs pour provoquer des échanges génétiques nécessaires à leur survie. Ces mécanismes, connus sous le nom de transfert horizontal de gènes comprennent principalement la conjugaison, la transduction et la transformation. Ces dernières années, l'étude de ces mécanismes a mis en lumière leur implication dans des problématiques bactériennes majeures comme l'acquisition de caractères pathogènes ou la propagation de résistance aux antibiotiques.

Streptococcus salivarius est une bactérie commensale évoluant dans une des niches écologiques la plus compétitive qui soit : la cavité orale humaine. Dans cet environnement où la concurrence est rude, cette bactérie a mis en place un système particulièrement efficace afin d'augmenter ses chances de survie. La production de molécules anti-bactériennes (bactériocines) couplée à un mécanisme de transformation naturelle lui permet ainsi de tuer ses concurrentes et de profiter du matériel génétique alors disponible pour acquérir de nouveaux gènes.

Cette stratégie est mise en place lors d'un stade physiologique particulier et appelé compétence. Étant donné le coût énergétique important de la compétence, celle-ci n'est déclenchée de manière transitoire que dans certaines conditions particulièrement propices. Le contrôle de l'activation de cet état physiologique est effectué par le système de régulation transcriptionnel ComRS qui implique un système de communication bactérien par phéromone particulièrement sensible. Ce système fonctionne via production d'un peptide, ComS, qui peut être exporté et maturé en dehors du cytosol pour former la phéromone XIP (*ComX Inducing Peptide*). Celle-ci peut être réimportée et s'associer à ComR, un récepteur intracellulaire. Le complexe ComRS formé peut alors s'associer au promoteur de *comS* et engendrer une boucle de rétroaction positive sur le système. En parallèle, le complexe ComRS peut aussi activer la transcription de *comX*, un facteur sigma alternatif qui va permettre d'activer la transcription d'un nombre important de gènes requis pour effectuer la transformation naturelle. Alors que l'activation du système ComRS commence à être mieux comprise, aucun mécanisme de désactivation (*shut-off*) n'a encore été caractérisé chez *S. salivarius*.

Lors de ce mémoire, nous avons cherché à comprendre les mécanismes d'arrêt de la compétence chez *S. salivarius*. Dans un premier temps nous avons validé la présence d'une boucle de rétroaction négative du système permettant de limiter l'activation dans le temps de la compétence. En effet, une souche dans laquelle le gène *comX* est délété présente une activation de la compétence plus intense et plus longue.

Dans un deuxième temps, des systèmes rapporteurs transcriptionnels pouvant être utilisés lors de la phase stationnaire au cours de laquelle le *shut-off* est actif ont été étudiés.

Finalement, une méthode de criblage via mutagenèse aléatoire transpositionnelle a été optimisée. Alors que la méthode de production de l'outil de transposition (pKrrmit) et de criblage (rapporteur *lacZ*) ont été optimisés avec succès, aucune méthode d'identification des insertions aléatoires n'a permis de caractériser ces dernières.

Summary

In bacteria, asexual propagation comes with the cost of low genotypic diversity. To overcome this drawback, various gene exchange strategies known as lateral gene transfer have emerged through evolution such as conjugation, transduction and natural transformation. During the last decades, investigations of those mechanisms have shed light on their importance for the emergence of antibiotic multi-resistant strains and pathogenicity acquisition.

Streptococcus salivarius is a commensal bacterium living in one of the most challenging ecological niche: the human oral cavity. In this competitive environment, this bacterium has evolved an efficient survival strategy involving the production of antimicrobial compounds coupled to natural transformation. This strategy allows *S. salivarius* to kill its competitors and take benefit from their genetic material to acquire new genes.

This strategy is implemented during a particular physiological state called competence. Since this strategy is costly from an energetic point of view, it is only activated (transiently) in favorable conditions. In *S. salivarius*, the control of the activation is performed through a transcriptional regulation network called the ComRS system. This system implies the production of a small peptide (*comS*) that can be exported and matured to form the pheromone XIP (ComX Inducing Peptide). The pheromone can be reimported and bound to ComR, an intracellular sensor. The resulting ComRS complex is then able to activate *comS*, generating a positive feedback loop on the system. Besides, the complex can also activate the production of ComX, an alternative sigma factor that will in turn activate the transcription of all the late genes necessary for the assembly of the transformation machinery (transformosome). While the activation of the ComRS system starts to be fairly understood, no *shut-off* mechanism explaining competence extinction has been described in *S. salivarius*.

During this master thesis, we seek to understand mechanisms underlying natural competence arrest in *S. salivarius*. To this aim, we first validated the presence of a negative feedback loop acting through ComX, since the deletion of *comX* showed an increased and time-extended competence activation.

Then, we investigated transcriptional reporter systems for their functionality during the entry in stationary phase since the shut-off is mainly present at this stage.

Finally, a random transpositional screening method was optimized in order to identify genes involved in the shut-off. While the use of the transposition tool (pKrrmit) and the screening method were successfully optimized, we were not able to generate a functional method for identifying random insertions within the genome of *S. salivarius*.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CDM	Milieu chimiquement défini
ComGA	Gène tardif de la compétence
ComR	<i>Competence Regulator</i>
ComS	<i>Competence signal</i>
ComX	Régulateur central de la compétence
CSP	<i>Competence-stimulating peptide</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>lacZ</i>	Gène de β -galactosidase
<i>luc</i>	Gène de luciférase de luciole
<i>luxAB</i>	Gène de luciférase bactérienne
M17+G1%	M17 + glucose 1%
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
<i>Ssa</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Spn</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Spy</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Smu</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Sth</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
THG	Transfert horizontal de gène
XIP	<i>ComX-inducing peptide</i>

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Summary	4
Abréviations	5
Table des matières	6
1. Introduction.....	9
a. Transfert horizontal de gènes	9
i. Transduction par phage.....	9
ii. Conjugaison	10
iii. Transformation naturelle	10
b. <i>Streptococcus salivarius</i>	11
c. La transformation naturelle chez les streptocoques.....	12
i. Phase tardive	12
ii. Phase précoce	13
1. Système ComCDE	13
2. Système ComRS	14
d. <i>Shut-off</i> de la compétence chez les streptocoques	15
i. <i>S. pneumoniae</i>	15
ii. <i>S. mutans</i>	16
iii. <i>S. pyogenes</i>	17
iv. <i>S. thermophilus</i>	18
2. Objectifs.....	19
e. ComX et <i>shut-off</i>	19
f. Développement de systèmes rapporteurs pour la phase stationnaire	19
g. Mutagenèse aléatoire transpositionnelle	19
2. Matériel et méthodes.....	20
a. Matériel	20
i. Souches.....	20
ii. Plasmides	22
iii. Oligonucléotides.....	22
iv. Milieux de culture et tampons	24
1. M17	24

2.	CDM	24
a.	Tampon de croissance (1 L)	25
b.	Solution de vitamine 100x (1L)	25
c.	Solution de métal 100x (1L)	25
d.	Mélange de précurseur d'ADN 50X (20 ml)	25
e.	Solution d'acide aminé (1 L)	26
3.	LB	26
4.	Phosphate Saline Buffer (PBS)	26
v.	Antibiotiques	27
b.	Méthodes	27
i.	Transformation génétique chez <i>S. salivarius</i>	27
1.	Construction génétique	27
a.	Amplification des fragments d'ADN par PCR	27
2.	Assemblage des segments d'ADN	28
3.	Insertion de l'ADN dans le génome de <i>Ssa</i>	29
ii.	Mesure de luminescence avec luminomètre multi-plaque	30
1.	Luciférase bactérienne (<i>luxAB</i>)	30
2.	Luciférase de luciole (<i>luc</i>)	30
iii.	Production du plasmide pKrrmit	30
1.	Production des cellules électrocompétentes	31
2.	Electroporation	31
3.	Vérification et purification du plasmide	31
iv.	Production de mutants aléatoires	32
1.	Transformation	32
2.	Purification ADN	33
3.	PCR arbitraire pour l'identification du locus de transposition	33
a.	PCR 1 avec amorce dégénérée	33
b.	PCR 1 avec amorce dégénérée et pentanucléotide optimisé	34
4.	PCR 2 « <i>nested</i> » et séquençage	34
5.	Back-transformation	35
6.	Identification du locus de transposition par PCR inverse	35
v.	Criblage	36
1.	Criblage via système rapporteur <i>lacZ</i> et coloration bleue	36
2.	Sélection par système <i>lacZ</i>	36
3.	Résultats	38
a.	Validation de l'implication du régulon de <i>comX</i> dans le <i>shut-off</i> de la compétence chez <i>Ssa</i> .	38

i.	Effet du régulon de ComX sur le <i>shut-off</i> : activation via XIP.....	39
ii.	Effet du régulon de ComX sur le <i>Shut-off</i> : activation via surexpression de <i>comR</i>	40
b.	Développement d'outils pour étudier l'expression des gènes du <i>shut-off</i> durant la fin de la phase exponentielle et la phase stationnaire	42
c.	Mise en place d'un système de mutation aléatoire transpositionnelle pour l'identification de gènes impliqués dans le <i>shut off</i>	46
i.	Transformation.....	47
ii.	Transposition.....	47
iii.	Criblage.....	47
1.	Criblage par nuance de bleu.....	49
2.	Criblage via auxotrophie.....	50
iv.	Caractérisation des insertions.....	51
4.	DISCUSSION	57
5.	CONCLUSION	60
	Bibliographie	61

1. Introduction

a. Transfert horizontal de gènes

La division asexuée chez les bactéries est une des stratégies les plus fructueuses dans le monde vivant. Malheureusement, ce type de reproduction ne permet pas de générer de la diversité génétique par échange allélique. Le monde bactérien a donc mis en place des stratégies d'échanges génétiques alternatifs. Ces mécanismes parfois complexes sont appelés transferts horizontaux de gènes (THG) par opposition aux transferts verticaux du parent vers sa progéniture (Fontaine, Wahl, Fléchar, Mignolet, & Hols, 2015). Ces mécanismes sont utiles non seulement pour générer de la diversité, mais aussi pour réparer des lésions dans l'ADN ou pour acquérir de nouveaux gènes et donc de nouvelles propriétés (Mashburn-Warren, Goodman, Federle, & Prehna, 2018). Cette dernière propriété est particulièrement mise sur le devant de la scène actuellement avec l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques. La rapidité de la propagation de ces souches ainsi que des gènes de résistances associés a mis en lumière toute l'importance et l'efficacité de ces systèmes (Muylaert & Mainil, 2012).

Il existe trois systèmes principaux de transferts horizontaux de gènes : la transformation, la transduction et la conjugaison (*Figure 1*).

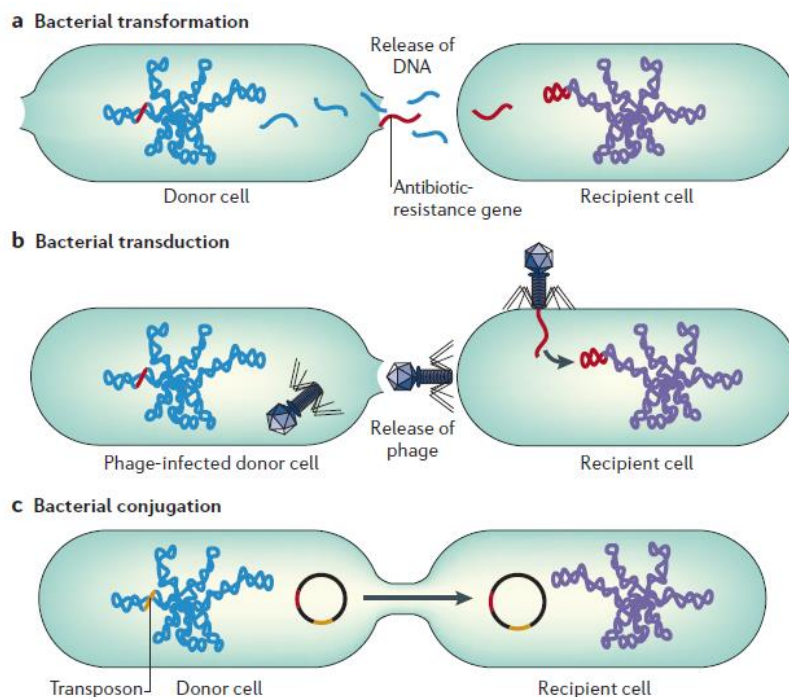


Figure 1 : THG chez les bactéries : Transformation, conjugaison et transduction (Chen & Dubnau, 2004)(Fontaine et al., 2015).

i. Transduction par phage

La transduction est le transfert d'informations génétiques d'une bactérie à une autre en passant par un virus (ou bactériophage). Il existe deux types de transduction. Cependant, dans les deux cas, le virus dont nous parlons est un virus à ADN double brin. De plus, il faut noter que les virus ont une certaine spécificité en termes d'hôtes. Ce qui oblige ces transferts d'ADN à avoir lieu au sein de la même espèce ou entre des espèces relativement proches (Moura De Sousa, 2017).

Dans le premier cas, on parle de transduction généralisée. Un exemple classique est le phage P1. Lors de son cycle d'infection, ce phage produit une désoxyribonucléase qui vient digérer l'ADN bactérien. Ensuite, lors de la formation des capsides, il arrive que le virion au lieu d'intégrer l'ADN viral intègre un morceau de l'ADN bactérien. Ensuite ce virion infecte une autre bactérie, l'ADN bactérien contenu dans le virion est injecté dans la bactérie et peut s'intégrer au génome bactérien par recombinaison homologue (Kenzaka, Tani, & Nasu, 2010).

Dans le deuxième cas, on parle de transduction localisée. Un exemple courant est le phage λ . Lors de l'infection, le virus peut choisir d'effectuer un cycle lysogénique durant lequel il intègre son génome à celui de la bactérie et attend plusieurs générations afin de se disséminer dans la population. Il arrive que lors de l'excision du génome du phage, l'excision ne se fasse pas au bon endroit. Dans certains cas, la bactérie garde une partie du génome du phage et le phage possède une partie du génome de la bactérie. Ensuite, comme le virion est assemblé normalement, l'ADN encapsidé peut être injecté dans une autre bactérie mais comme le génome du phage n'est pas complet, l'infection s'arrête à cette étape. D'autre part, la portion d'ADN bactérien transférée peut être réintégrée par recombinaison homologue comme dans le cas des transductions généralisées (Kenzaka et al., 2010).

ii. Conjugaison

La conjugaison est un transfert d'ADN sous forme de plasmide. La plupart du temps (bien qu'il existe des cas décrits de transfert chromosomique, notamment chez *E. coli*) le transfert d'ADN est sous forme plasmidique, et implique un contact physique entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse (Chandler, Hirt, Dunny, & Greenberg, 2005). Le mécanisme exact du transfert d'ADN n'est pas encore complètement compris (particulièrement chez les bactéries à Gram positif). En revanche, on sait qu'il est nécessaire que le plasmide présent chez la bactérie donneuse encode la machinerie responsable du transfert d'ADN qui implique la formation d'un pilus chez les bactéries à Gram négatif (Shi et al., 2005).

La transposition est un mécanisme qui peut être associé à la conjugaison. Celui-ci implique une transposase qui coupe au niveau de séquences inversement répétées de l'ADN qui sont des palindromes encadrant une séquence particulière appelée transposon. Ensuite, la transposase peut intégrer ce transposon dans une autre séquence de manière aléatoire ou non. Cette autre séquence peut être le chromosome bactérien. La conjugaison d'un plasmide portant ce genre de système peut donc résulter en une modification du chromosome et pas seulement dans le transfert du plasmide (Dunny, 2007).

iii. Transformation naturelle

Le dernier mécanisme classique de transfert horizontal de gènes est la transformation naturelle. Celle-ci permet à une bactérie d'intégrer de l'ADN exogène dans son génome via recombinaison homologue. Cette dernière propriété implique donc un certain degré d'homologie entre l'ADN donneur et le génome de la bactérie compétente. La capture, l'internalisation et l'intégration de l'ADN se fait via un complexe protéique relativement complexe appelé transformasome qui est encodé dans le génome de la bactérie compétente. Bien que cette machinerie soit très bien conservée chez les bactéries, même phylogénétiquement distantes, les mécanismes de régulation conduisant à son activation peuvent être extrêmement différents, même chez des espèces très proches (Fontaine et al., 2015). Nous détaillerons les mécanismes associés à la transformation naturelle pour le cas particulier des streptocoques plus loin.

b. Streptococcus salivarius

Streptococcus salivarius (Ssa) est une bactérie anaérobie facultative. Elle est retrouvée exclusivement dans la cavité orale et dans le tractus digestif de l'Homme et son mode de vie est commensal (Paster, Stokes, Olsen, Dewhirst, & Aas, 2005). Même si certains cas de pathogénicité de type opportuniste ont été rapportés, son effet positif sur le microbiome oral et digestif est reconnu et son utilisation probiotique commercialisée (Tunkel & Sepkowitz, 2002).

L'espèce *Ssa* appartient au groupe des bactéries à Gram positif et fait partie de streptocoques. Chez les streptocoques, on retrouve plusieurs groupes phylogénétiques dont le groupe mitis, anginosus, pyogenes, bovis, mutans et salivarius.**(Erreur ! Source du renvoi introuvable.)**.

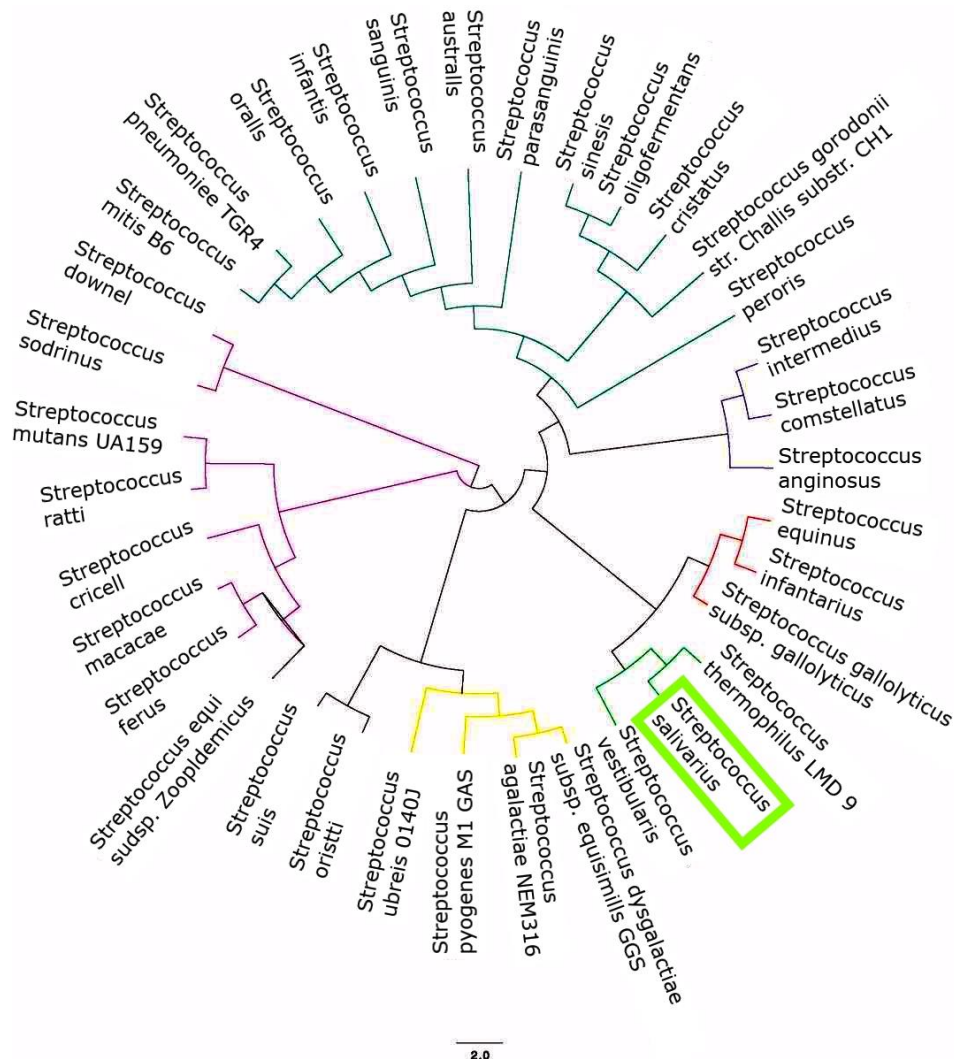


Figure 2: Arbre phylogénétique des différents groupes de streptocoques. Les différents groupes représentés sont : groupe mitis en vert foncé, le groupe anginosus en noir, le groupe bovis/gallolyticus en rouge, le groupe salivarius en vert, le groupe pyogenes en jaune, le groupe suis en noir, et le groupe mutans en mauve. (Nicolas & Lavoie, 2011).

Parmi tous ces groupes comprenant des pathogènes humains, le groupe salivarius fait figure d'exception car il comprend principalement des espèces commensales ou d'un intérêt industriel. Parmi ces espèces, *S. thermophilus* (*Sth*) une espèce couramment utilisé dans l'industrie de la fermentation laitière. Cette espèce est très proche de *Ssa* et possède un génome fort similaire bien que plus petit (Colmin, Pebay, Simonet, & Decaris, 1991). Cette dernière propriété est probablement due à une non-nécessité de garder certains gènes, causée par les faibles variations de l'environnement de *Sth*. En

effet, cette dernière est principalement utilisée dans la fabrication de yaourt, une niche écologique spécialisée, contrairement à *Ssa* qui doit continuellement s'adapter et entrer en concurrence avec d'autres espèces présentes dans la cavité buccale (Mignolet et al., 2018a).

Ssa est une bactérie étudiée pour sa capacité de compétence naturelle et sa production de bactériocines. Bien que la compétence puisse être activée de manière artificielle en laboratoire via ajout d'une phéromone activatrice, les conditions naturelles d'activation n'ont pas encore été élucidées (Mignolet et al., 2018b).

c. La transformation naturelle chez les streptocoques

La transformation naturelle est un phénomène transitoire qui prend place lors de l'entrée dans un état physiologique particulier appelé compétence. On peut diviser la compétence en deux phases. La phase précoce qui regroupe tout ce qui se passe avant l'expression d'un facteur sigma alternatif (σ^x) aussi appelé ComX et la phase tardive qui se déroule après l'expression de ComX. La production du facteur sigma alternatif va permettre à l'ARN polymérase de se fixer à un ensemble de gènes (régulon de ComX) dont ceux responsables de l'assemblage du transformasome et de la transformation naturelle dont il est responsable (Fontaine et al., 2015). Nous allons commencer par nous intéresser à la phase tardive.

i. Phase tardive

Lors la phase tardive, la bactérie produit un pseudopilus qui sert à guider l'ADN libre dans le milieu, à travers la paroi bactérienne. Le pseudopilus est polymérisé par ComGB (ou un équivalent). Ce mécanisme est rendu possible par ComGA, une NTPase qui fournit l'énergie nécessaire pour la polymérisation à comGB. Ensuite, l'hypothèse la plus courante est que le pseudopilus ait une capacité d'adhésion à l'ADN et que suite à cette capture de l'ADN, ComGB dépolymérise le pseudopilus pour que l'ADN arrive jusqu'à la membrane (Figure 3) (Chen & Dubnau, 2004).

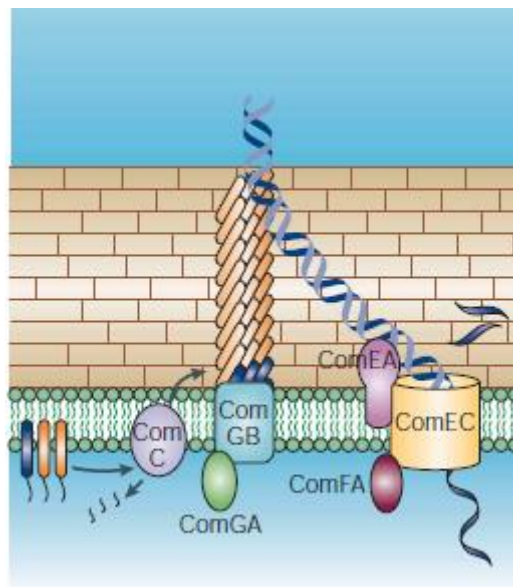


Figure 3: Schéma reprenant les principaux composants du transformasome (Chen & Dubnau, 2004)

Ensuite, ComEA, un récepteur membranaire capable de lier l'ADN, va mettre en contact ComEC avec l'ADN exogène pour assurer son transport à travers la membrane. De manière concomitante, l'ADN double brin est alors transformé en ADN simple brin pour faciliter son intégration dans le génome. Il est ensuite associé à la protéine Ssb afin d'empêcher sa dégradation par des nucléases (Marie et al.,

2017). Finalement, s'il y a des brins avec une homologie suffisante, l'ADN exogène est intégré au génome bactérien par recombinaison homologue. Bien que le système exact de recombinaison via transformation naturelle ne soit pas encore totalement compris, il semblerait qu'au moins RecA, une protéine de recombinaison fortement conservée chez les bactéries et DprA seraient impliqués. DprA va permettre de scanner le génome bactérien pour chercher une région d'homologie avec l'ADN simple brin qui sera potentiellement intégré. Une fois la région d'homologie trouvée, RecA va intégrer l'ADN simple brin via la création d'un D-loop (Figure 4) (Mortier-Barrière et al., 2016).



Figure 4 :Schéma de la recombinaison homologue (Marie et al., 2017)

ii. Phase précoce

Il existe deux grands types de systèmes de régulation de l'activation de la compétence chez les streptocoques. Ces deux systèmes partagent des propriétés similaires au niveau de la topologie (boucle de rétroaction positive) et au niveau des mécanismes (production d'une phéromone activatrice du système) mais n'ont pas d'homologie entre eux. Ces deux systèmes s'appellent ComCDE et ComRS. Il est à noter qu'au sein même d'un système, on peut retrouver des différences entre espèces apparentées, notamment au niveau de la structure de la phéromone (Fontaine et al., 2015).

1. Système ComCDE

Le système de régulation ComCDE est le système de régulation de la compétence retrouvé chez les streptocoques des groupes mitis et anginosus dont l'espèce servant de modèle est *S. pneumoniae* (*Spn*).

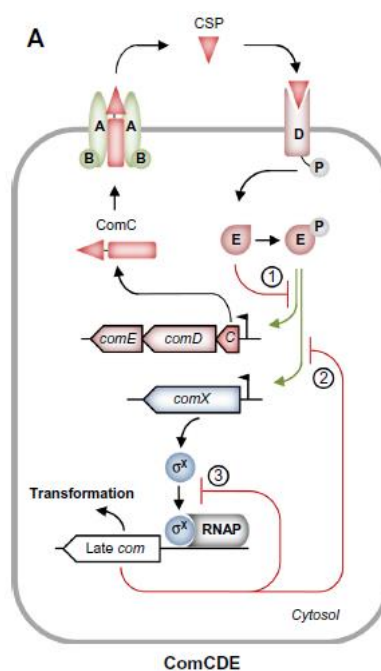


Figure 5: Schéma de l'activation de la compétence par le système ComCDE (Fontaine et al., 2015)

Le système débute par la production d'un peptide (ComC) qui possède une séquence d'adressage spécifique pour le transporteur ComAB. Cette séquence sera clivée lors de son passage à travers le complexe transmembranaire pour produire une version maturée de ComC, appelée CSP (Competence Stimulating Peptide). Lorsque la concentration en CSP atteint un seuil critique, il se fixe au récepteur transmembranaire comD. Cette fixation provoque l'autophosphorylation de ce dernier. ComD transfère alors son groupe phosphate à comE qui est alors capable de dimériser. Le dimère de comE~P va ensuite agir comme facteur de transcription, activant les gènes *comX*, *comAB*, *comCDE* et *comW* (Figure 5)(Sigve Havarstein, Coomaraswamy, & Morrisont, 1995).

L'augmentation de l'expression des loci *comAB* et *comCDE* est nécessaire au maintien de la compétence car sans cette boucle de rétroaction positive, le seuil de CSP nécessaire pour l'activation et le maintien de la compétence ne serait jamais atteint (Weng, Piotrowski, & Morrison, 2013).

Quant à *comX*, c'est le gène responsable de la production du facteur σ^X . Ce facteur est activateur de la transcription de nombreux gènes de la phase tardive de la compétence mais il est aussi responsable de l'activation de la production de bactériocines chez de nombreux streptocoques. De plus, on le soupçonne également d'être impliqué dans l'activation de gènes nécessaires à la formation de biofilm. Le facteur σ^X est donc un régulateur central chez les streptocoques.

Quant à ComW, il est nécessaire à la stabilité de ComX afin d'empêcher sa dégradation par le système protéolytique Clp. Ce système de dégradation a une plus haute affinité pour ComW. ComW sature donc le système pour empêcher la dégradation de ComX.

2. Système ComRS

Dans un nombre plus élevé de streptocoques (tous les autres groupes, excepté mitis et anginosus), la phase précoce de la transformation n'est pas le système de régulation ComCDE mais le système de régulation ComRS. Les deux bactéries modèles les plus souvent utilisées pour étudier ce système sont *Sth* et *S. mutans* (*Smu*).

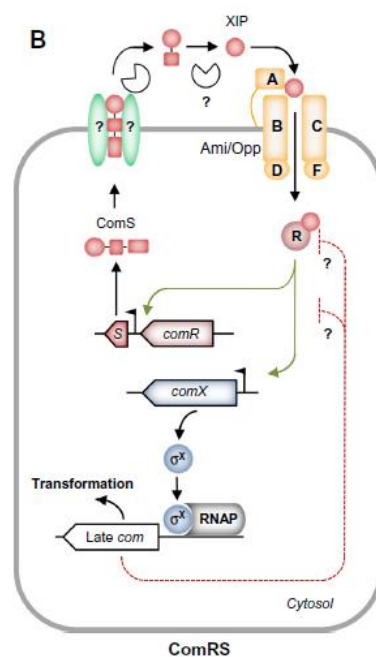


Figure 6 :Schéma de l'activation de la compétence par le système ComRS (Fontaine et al., 2015)

Le système ComRS est moins bien connu que le système ComCDE. Toutefois, on sait que ComS est un peptide produit et maturé en XIP (ComX Inducing Peptide). En revanche, on ne sait pas quand ComS est maturé, ni par quelle protéase/peptidase. XIP est un peptide phéromone à séquence variable en fonction de l'espèce considérée. XIP peut être réinternalisé par la bactérie grâce au transporteur Ami/Opp. Une fois réimporté, il peut se fixer ensuite à son récepteur ComR. La fixation de XIP sur ComR permet à ce dernier de former des dimères stables (Talagas et al., 2016). Cette forme dimérique active la transcription des gènes *comS* et *comX*. La boucle de rétroaction positive sur *comS* permet de fournir une concentration suffisante de XIP pour maintenir la compétence. Quant à ComX, il agit de la même façon que pour les autres streptocoques. C'est à dire qu'il active l'expression des gènes tardifs de la compétence (Figure 6) (Håvarstein, 2010). En ce qui concerne la régulation de ComR, elle semble être contrôlée par des stimuli extérieurs mais sa régulation est encore mal comprise (Florence Vande Capelle, données non-publiées).

d. Shut-off de la compétence chez les streptocoques

La compétence est un état physiologique très énergivore et qui va entraîner un changement métabolique incompatible avec la prolifération cellulaire (Zaccaria, Wels, Baarlen, & Wells, 2016). Il est donc important qu'une fois l'ADN intégré via transformation naturelle, la compétence soit inactivée au plus vite. Il existe donc un système de régulation négative de la compétence (*shut-off*) qui va permettre de restreindre l'activation à une fenêtre temporelle limitée.

i. *S. pneumoniae*

Le *shut-off* a été relativement bien étudié chez *Spn*. Différents modes d'actions du *shut off* ont été identifiés et c'est probablement le streptocoque sur lequel on a le plus d'informations.

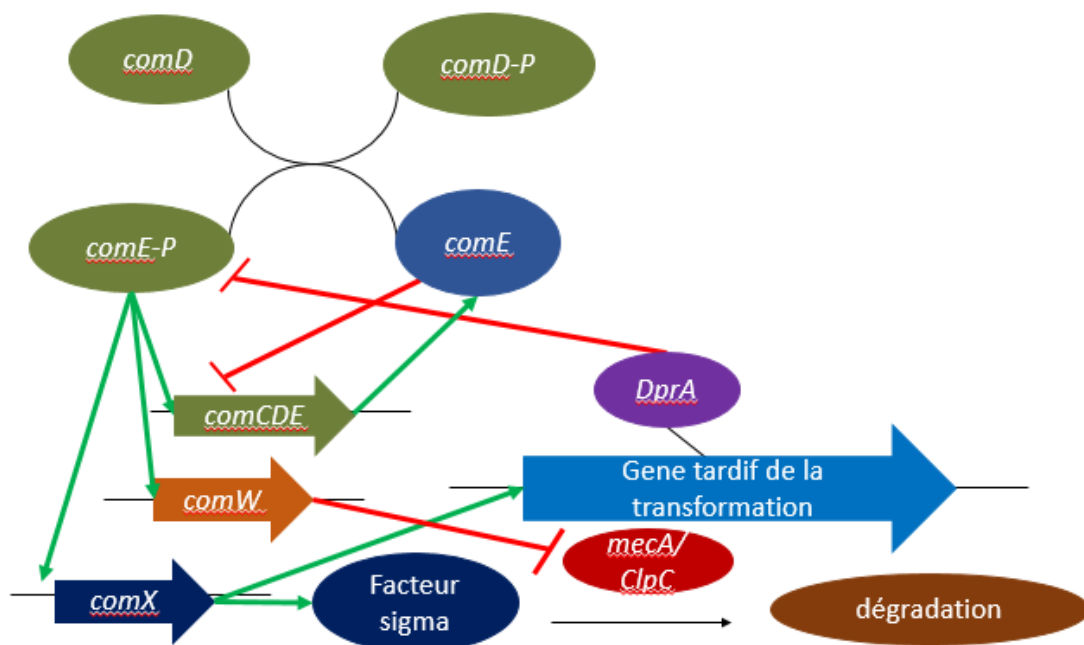


Figure 7: Schéma des mécanismes du shut off connus chez *Spn*

La compétence chez *Spn* est activée par le système ComCDE. Au moins trois mécanismes de régulation négative du système ont été découverts ces dernières années.

Premièrement, si le locus *comCDE* est activé par la présence de ComE phosphorylé (ComE~P), il est inactivé par la présence de comE non phosphorylé (ComE) (Figure 7). Dès lors, quand la production de ComE dépasse sa vitesse de phosphorylation via comD, l'excès de ComE va inhiber l'activation du locus *comCDE* (Martin et al., 2013).

Deuxièmement, il existe une protéine produite lors de la phase tardive de la compétence, DprA, qui est capable de se lier à ComE~P. Une fois DprA lié à comE~P, ce dernier n'est plus en mesure de se lier à l'ADN, ce qui va empêcher l'activation du locus *comCDE* (Mirouze et al., 2013).

Troisièmement, un mécanisme implique ComW, une protéine produite lors de l'entrée en compétence et responsable de l'inhibition du système de dégradation MecA-Clp de ComX. Ceci permet que lors de l'entrée en compétence, ComX soit produit en quantité suffisante pour activer la phase tardive de manière optimale. Toutefois l'expression de ComW est très sensible à la présence de ComE non phosphorylé. Son expression s'arrête donc rapidement et la machinerie MecA-Clp n'est plus inhibée et peut alors dégrader ComX, et ainsi arrêter l'activation des gènes tardifs de la compétence (Piotrowski, Luo, & Morrison, 2009)

ii. *S. mutans*

Chez *Smu*, la transformation naturelle est à la fois régulée par un système ComCDE (similaire à celui de *Spn* mais principalement impliqué dans la production de bactériocines) et le système ComRS. Les deux systèmes agissent sur l'expression de *comX* qui régule l'expression des gènes tardifs de la compétence (Mignolet et al., 2018a).

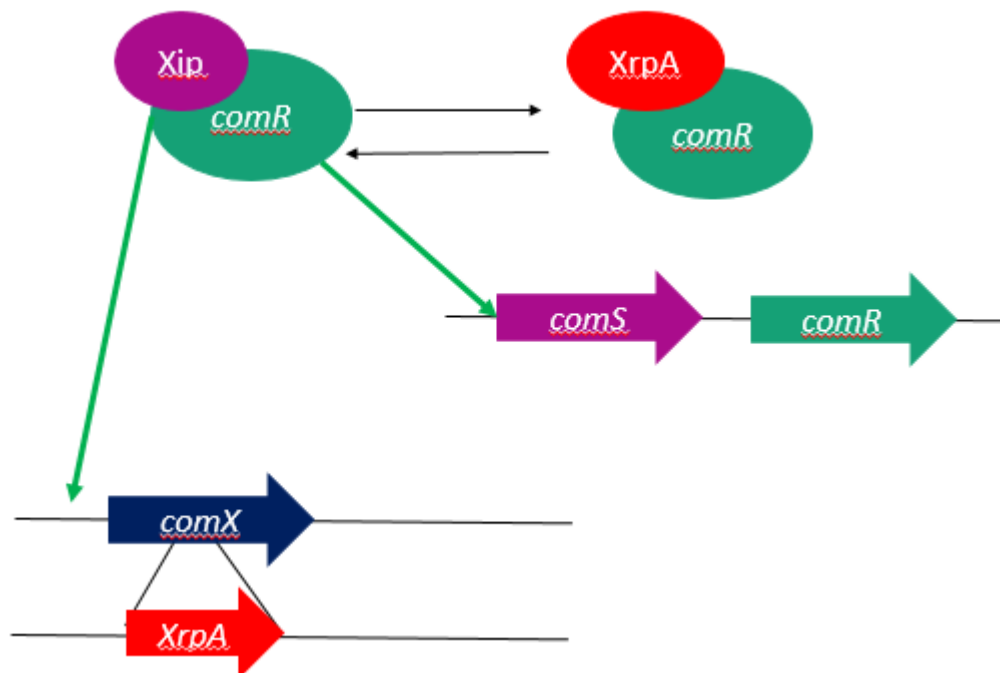


Figure 8: Schéma du mécanisme de shut-off via XrpA décrit chez *S. mutans*

Le peptide XrpA est encodée à l'intérieur même du gène *comX* mais dans un cadre de lecture alternatif. L'activation de l'expression de *comX* va entraîner la production de XrpA de concert avec ComX. XrpA va alors fixer ComR qui n'est dès lors plus capable de fixer XIP et d'activer l'expression de *comX* et *comS*. Il est à noter que l'expression de *xrpA* semble avoir un impact sur l'intensité d'expression de *comS* et *comX* mais pas sur la durée de son expression, ce qui sous-entend que d'autres régulateurs

agiraient également sur le *shut-off* de la compétence chez *Smu* (J. Kaspar, S. Ahn, S. Palmer, S. Choi, M. Stanhope, 2015) (Figure 8). De plus, son expression hétérogène au sein d'une population tend à montrer que XrpA sert davantage à intégrer de la variation d'activation de la compétence au sein d'une population génétiquement identique (hétérogénéité phénotypique), plutôt qu'à véritablement produire un *shut-off* de la compétence (J. Kaspar, 2016).

iii. *S. pyogenes*

Dans certaines souches de *S. pyogenes* (*Spy*), un peptide appelé Prx (paratox) encodé dans le génome a montré un effet inhibiteur sur la compétence. De manière analogue au peptide XrpA encodé chez *Smu*, Prx se lie à comR avec une affinité bien plus élevée que XIP. La fixation de ce peptide empêcherait donc la formation du complexe ComRS. Toutefois, aucune information concernant le site de fixation de Prx sur ComR ou sur le changement de configuration que cette fixation impliquerait n'est disponible (Figure 9). Et bien que l'action de Prx ait été démontrée chez *Spy*, aucun homologue n'a été retrouvé chez *Ssa* (Mashburn-Warren et al., 2018).

Il est à noter que la délétion du gène codant pour le polypeptide Prx chez des souches non-naturellement compétentes mais possédant des gènes fonctionnels de compétence n'a pas permis de les rendre naturellement compétentes. Cette dernière constatation suggère qu'il existe probablement d'autres mécanismes de régulation négative chez *Spy* (Mashburn-Warren et al., 2018).

Finalement, une dernière information intéressante concernant Prx montre que ce peptide provient de l'intégration d'un phage dans le génome de *Spy*. Une hypothèse de l'utilité de ce peptide pour le phage est qu'il permettrait de diminuer l'activation de la compétence après l'intégration du phage dans le génome de *Spy*. Cette stratégie permettrait d'empêcher la transformation naturelle qui pourrait générer une excision du phage via réparation de l'ADN du chromosome de *Spy* (Aziz et al., 2005).

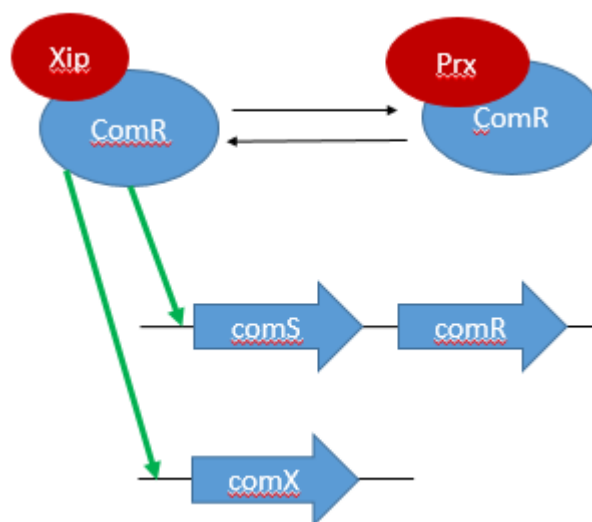


Figure 9: Schéma du mécanisme de *shut-off* via Prx décrit chez *Spy*

iv. *S. thermophilus*

Comme mentionné précédemment, *Sth* est génétiquement très proche de *Ssa* et l'étude du *shut-off* chez *Sth* peut donc être transposable dans une certaine mesure à *Ssa*. Une modélisation de la régulation de la compétence chez *Sth* a été réalisée dans notre laboratoire et suggère qu'il existe probablement au moins un gène impliqué dans le *shut off* qui serait activé par ComX. La modélisation tend à montrer que ce gène hypothétique « *comZ* » inhiberait la compétence en agissant directement sur le complexe ComRS (Figure 10). Au vu de ces données et de celles présentes chez *Spn*, il a rapidement été suggéré que DprA pourrait aussi jouer un rôle dans le *shut-off* chez *Sth*. Malheureusement, la délétion de *dprA* chez *Sth* n'a pas montré d'inactivation du *shut-off*, soulignant l'existence d'un mécanisme alternatif (Haustenne, Bastin, Hols, & Fontaine, 2015).

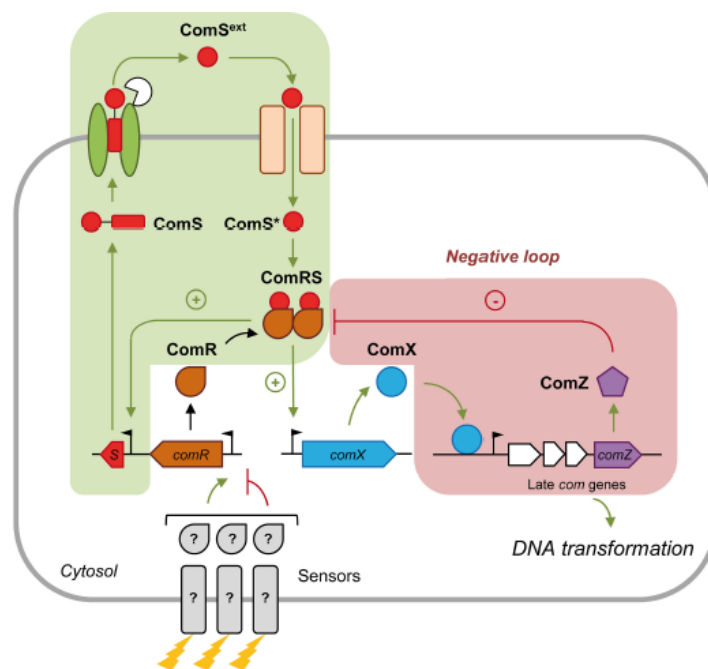


Figure 10: Schéma de la modélisation de la régulation de la compétence chez *Sth* (Haustenne et al., 2015)

2. Objectifs

La transformation naturelle, et plus largement la compétence, est un processus extrêmement important pour l'adaptabilité, la compétitivité et la plasticité génomique des bactéries (Muylaert & Mainil, 2012). Mais cet état physiologique est aussi fortement énergivore, et limite la croissance bactérienne (Piotrowski et al., 2009). Chez *Streptococcus salivarius* (*Ssa*), ces différentes caractéristiques, ainsi que l'absence d'activation de la compétence en conditions de laboratoire, suggèrent qu'il existe des régulateurs négatifs de la compétence potentiellement impliqués dans le *shut-off*. De plus, nous avons choisi de travailler sur *Ssa* car son système de régulation ComRS est partagé avec la majorité des streptocoques. L'identification d'acteurs et la description de mécanismes impliqués dans le *shut-off* pourrait donc être potentiellement étendu à d'autres espèces du genre *Streptococcus*, dont certains pathogènes d'un intérêt médical majeur.

L'objectif principal de ce mémoire sera donc d'étudier comment la bactérie *Ssa* est capable de sortir de l'état de compétence.

Plus précisément, nous avons divisé ce travail en trois parties :

e. ComX et *shut-off*

ComX est le régulateur central de la compétence. Il est présent chez les streptocoques utilisant le système ComRS mais également chez les autres (système ComCDE) et des homologues sont retrouvés dans tous les génomes des streptocoques. Ceci suggère que peu importe le système de régulation utilisé, c'est toujours le facteur sigma alternatif encodé par *comX* qui active les gènes tardifs de la compétence. Chez *S. thermophilus* (*Sth*, espèce très proche de *Ssa*), des recherches menées au laboratoire ont montré qu'il existerait un gène du régulon de ComX impliqué dans le *shut-off* de ComRS (Haustenne et al., 2015). Puisque *Ssa* et *Sth* sont deux espèces très proches, nous pensons que cette hypothèse est également applicable à *Ssa*. Cette première partie du mémoire visera donc à confirmer/inférer cette hypothèse selon laquelle le régulon de ComX serait impliqué dans le *shut-off* chez *Ssa*.

f. Développement de systèmes rapporteurs pour la phase stationnaire

Les gènes de la phase précoce de la compétence (*comX*, *comS* et *comR*) sont activés en début de phase exponentielle pour progressivement diminuer et s'éteindre en début de phase exponentielle chez *Ssa* (résultats non-publiés, Adrien Knoops). Ceci suggère que les gènes du *shut off* qui bloqueraient le système ComRS et/ou ComX s'expriment durant la fin de la phase exponentielle. Or les systèmes rapporteurs utilisés classiquement au laboratoire (luciférase bactérienne, gènes *luxAB*) sont inutilisables en fin de phase exponentielle, et ce à cause de la déplétion en FMNH₂, un cofacteur essentiel du système *luxAB*. Dans cette deuxième partie du mémoire, nous tenterons de développer de nouveaux systèmes rapporteurs, capables de mesurer l'expression des gènes durant la phase stationnaire (gène *luc*).

g. Mutagenèse aléatoire transpositionnelle

Finalement, la troisième partie de ce mémoire visera à mettre en place une stratégie expérimentale permettant d'identifier des gènes impliqués dans le *shut off* chez *Ssa*. Nous avons choisi d'adapter une méthode de mutagenèse aléatoire transpositionnelle largement utilisée et basée sur l'utilisation d'un plasmide thermosensible possédant un transposon de type mariner (Breton & McIver, 2013).

2. Matériel et méthodes

a. Matériel

i. Souches

Tableau 1: Liste des souches bactériennes utilisées dans ce mémoire

Souche	déscription	référence
HSISS4	Souche sauvage isolée d'un échantillon de selles d'un homme de 79 ans ayant subi une iléostomie	(Mignolet, Fontaine, Kleerebezem, & Hols, 2016)
HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur de <i>comS</i> avec les gènes de luciférase <i>luxA luxB</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Laura Ledesma, données non-publiées
HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur de <i>comX</i> avec les gènes de luciférase <i>luxA luxB</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Adrien Knoop, données non publiées
HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur de <i>comR</i> avec les gènes de luciférase <i>luxA luxB</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Adrien Knoop, données non-publiées
HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) <i>ΔcomX::cat</i>	HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) <i>ΔcomX::cat</i>	HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR) <i>ΔcomX::cat</i>	HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-cat</i> (SER)	HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une fusion du promoteur inducible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène <i>comR</i> , accompagné d'une résistance à l'érythromycine inséré au locus proche de l'ARN _t serine (SER).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER)	HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une fusion du promoteur inducible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène <i>comR</i> , accompagné d'une résistance à l'érythromycine inséré au locus proche de l'ARN _t serine (SER).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER)	HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR) contenant une fusion du promoteur inducible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène <i>comR</i> , accompagné d'une résistance à l'érythromycine inséré au locus proche de l'ARN _t serine (SER).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER) <i>ΔcomX::cat</i>	HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-cat</i> (SER) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire

HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER) $\Delta comX::cat$	HSISS4 <i>P_{comS}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-cat</i> (SER) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{comX}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER) $\Delta comX::cat$	HSISS4 <i>P_{comR}-luxAB-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-cat</i> (SER) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{xyl1}-luxAB-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl1}</i> avec les gènes de luciférase <i>luxA luxB</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{xyl2}-luxAB-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec les gènes de luciférase <i>luxA luxB</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{xyl1}-luc-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl1}</i> avec le gène de luciférase <i>luc</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 <i>P_{xyl2}-luc-spec</i> (THR)	HSISS4 contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène de luciférase <i>luc</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$	HSISS4 contenant une délétion du gène <i>lacZ</i> par substitution avec un gène de résistance au chloramphénicol.	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comS}-lacZ-spec</i> (THR)	HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ contenant une fusion du promoteur de <i>comS</i> avec le gène <i>lacZ</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comX}-lacZ-spec</i> (THR)	HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ contenant une fusion du promoteur de <i>comX</i> avec le gène <i>lacZ</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comGA}-lacZ-spec</i> (THR)	HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ contenant une fusion du promoteur de <i>comGA</i> avec le gène <i>lacZ</i> , accompagné d'une résistance à la spectinomycine inséré au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comS}-lacZ-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER)	HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comS}-lacZ-spec</i> (THR) contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène <i>comR</i> , accompagné d'une résistance à l'érythromycine inséré au locus proche de l'ARN _t serine (SER).	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comX}-lacZ-spec</i> (THR) <i>P_{xyl2}-comR-ery</i> (SER)	HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ <i>P_{comX}-lacZ-spec</i> (THR) contenant une fusion du promoteur inductible au xylose <i>P_{xyl2}</i> avec le gène <i>comR</i> , accompagné d'une résistance à l'érythromycine inséré au locus proche de l'ARN _t serine (SER).	Ce mémoire

HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ $P_{comGA}-lacZ-spec$ (THR) $\Delta comGA::ery$	HSISS4 $\Delta lacZ::cat P_{comGA}-lacZ-spec$ (THR) contenant une délétion du gène <i>comGA</i> par substitution avec un gène de résistance à l'érythromycine.	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ $P_{comS}-lacZ-spec$ (THR) $\Delta comR::ery$	HSISS4 $\Delta lacZ::cat P_{comS}-lacZ-spec$ (THR) contenant une délétion du gène <i>comR</i> par substitution avec un gène de résistance à l'érythromycine.	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ $P_{comX}-lacZ-spec$ (THR) $\Delta comR::ery$	HSISS4 $\Delta lacZ::cat P_{comX}-lacZ-spec$ (THR) contenant une délétion du gène <i>comR</i> par substitution avec un gène de résistance à l'érythromycine.	Ce mémoire
HSISS4 $\Delta lacZ::cat$ $P_{comX}-lacZ-spec$ (THR) $\Delta comX::ery$	HSISS4 $\Delta lacZ::cat P_{comGA}-lacZ-spec$ (THR) contenant une délétion du gène <i>comX</i> par substitution avec un gène de résistance à l'érythromycine.	Ce mémoire
HSISS4 <i>kan^R</i> (THR)	HSISS4 contenant une insertion d'une résistance à la kanamycine au locus proche de l'ARN _t threonine (THR).	Ce mémoire
HSISS4 <i>kan^R</i> (SER)	HSISS4 contenant une insertion d'une résistance à la kanamycine au locus proche de l'ARN _t sérine (SER).	Ce mémoire
<i>E. coli</i> C43	Souche de <i>E. coli</i> sélectionnée pour une résistance accrue à la transposition.	(Breton & McIver, 2013)
<i>E. coli</i> Top10	Souche de <i>E. coli</i> utilisée pour la PCR inverse.	Invitrogen, CA

ii. Plasmides

Tableau 2 : liste des plasmides utilisés

pKmit	Plasmide contenant le gène <i>repA</i> , le gène de la transposase <i>tnpC9</i> sous contrôle d'un promoteur constitutif, une résistance à la spectinomycine, une résistance à la kanamicine entre deux IR et une origine de réplication <i>colE1</i> . Ce plasmide est utilisé pour réaliser la mutagenèse transpositionnelle aléatoire.	(Breton & McIver, 2013)
pUC18	Il contient un gène <i>lacZ</i> , une résistance à l'ampicilline et une origine de réplication pMB1.	(Norlander, Kemp and co, 1983)

iii. Oligonucléotides

Tableau 3: Liste des oligonucléotides utilisés dans ce mémoire

Nom	Séquence	T _{hybridation} (°C)
Johann ComX Down	TTCCAGTATCTAGCCTCCTT	62
Johann ComX Up	TAAGTGTGAAGCCACCTAC	66
Up-Fw.tRNAthr	TGTCAAAGGATTAGGAAAAC	57
Up-Rv.tRNAthr	TTGATTTATACCTCTCAATTT	53
Down-Rv.tRNAthr	AAGGAGAAAATTATGTACAC	54
Down-FwtRNAthr	AAATCAACCTCTTTGAACATA	56
Down-FwtRNAser2	AAGCTGTAAAACCATCTTC	57

Down-Rv.tRNAs ^{er} 2	TTGGATAAGGTCTTGACTTC	56
Up-Fw.tRNAs ^{er}	CAAGATTAACCATGACCTTC	55
Up-Rv.tRNAs ^{er}	AGTAATTA ^{AAAA} AGAAGATGG	51
Fw.Up-lox66	TAAGGAAGATAAATCCCATAAAGG	58
Rv.Dn-lox71	TTCACGTTACTAAAGGGAATGTA	61
Rv.Up-lox66	AGAAACAGAAGCCACTGGAG	60
Fw.Dn-lox71	ATAGTGCGTCTTCTCGTAGC	59
ML1-Fw.Up.thr-xyIR	CTTTTGAAAAATTGAGAGGTATAAATCAA ^{ACTTATAGGGG} ^{TAACACTTA}	60/56
ML2-Rv.pxyl-luxAB	GTAAGCAAAAAGTTTCCAAATTCAT ^{ATTACCTCCTTTGAT} ^{TTAAG}	60/54
ML3-Fw.luxAB.ATG	ATGAAATTTGGAACTTTTTGC	55
ML4-Rv.luc-lox66	CCTTATGGGATTTATCTTCCTTAG ^{AACGAAAATCAAGCTTTT} ^A	60/56
ML5-Fw.Up.lacZ	GAAGTGATCTCATCAAAAAGC	59
ML6-Rv.Dn.lacZ	AGTATTATTGGACTTTGCC	56
ML7-Fw.Up.lacZ-lox66	GGAGGCCAAAGTCCAATAATACT ^{TAAGGAAGATAAATCCCA} ^{TAAG}	62/56
ML8-Rv.lox71-DnlacZ	GTTATTACCTTCAAAAAGGAGAATAATCT ^{TTCACGTTACT} ^{AAAGGGAATG}	61/59
ML9-Fw.Dn.LacZ	AGATTATTCTCCTTTTTTGAAG	55
ML10-Rv.Dn.lacZ	CATTATTGCTCGTAAAATCAC	56
ML11-Rv.PcomX-lacZ	GTTTGAATTTTTTCAGTCGTGTTTCAT ^{TCAACCTCCTATTAAT} ^{AGATATAATTTTTG}	62/58
ML12-Fw.lacZ.ATG	ATGAACACGACTGAAAAAATTC	59
ML13-Rv.lacZ.stop	TTAGTTGAGTGTTCAATCATG	60
ML14-Fw.lacZ-lox66	CATGATTGAACCACTCAACTAAT ^{TAAGGAAGATAAATCCCAT} ^{AAGG}	60/58
ML16-Rv.PcomGA-lacZ	GTTTGAATTTTTTCAGTCGTGTTTCAT ^{AAGGACCTCCTCATAA} ^{ACC}	62/61
ML17-Fw.Up.thr-Kanr	CTTTTGAAAAATTGAGAGGTATAAATCAA ^{AAATTCTATCAT} ^{AATTGTGGTTTC}	60/56
ML18-Rv.Kanr-Dn.thr	GATTTTTTATGTTCAAAGAGGTTGATTT ^{TGTACTTCAGAAA} ^{AGATTAGATG}	60/57
ML19-Fw.Up.comR	CACGCTTTTTTAAACTATTAC	55
ML20-Rv.Up.comR-lox71	TACATTCCTTTAGTAACGTGAA ^{CTTTATTTCGAAATTTTAA} ^{AAACATTATATC}	61/56
ML23.1-Rv.in.comR	GAGAAGGAATTGTGAAAAATC	56
ML26-Tn.seq.oPCR1	TACTGGATGAATTGTTTGTAGTACC	55
ML27-Tn.seq.Deg3	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGAT ^{NNNNNNNNNN}	45
ML28-Tn.seq.anchor1	CGCAACTGTCCATACTCTG	55
ML29-Tn.seq.Deg4	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGAT	55
ML30-Tn.seq.anchor2	GCCTACGAGGAATTTGTATCG	55
ML35-Rv.ery-lox71	TTCACGTTACTAAAGGGAATGTACT ^{ACACTACCTAATAATT} ^{TATCTACATTC}	61/58
ML36-Fw.ery-lox66	TAAGGAAGATAAATCCCATAAAGG ^{AGTGCAAAAAAAGATAT} ^{AATGG}	58/56
ML37-Rv.lox66-xyIR	CCTTATGGGATTTATCTTCCTTA ^{ACTTATAGGGGTAACACTT} ^{AAAAAAG}	58/60

ML38-Fw.up.comR	CTTTATCTACGTCAGTATAAATC	55
ML40-Fw.lox71-dn.comR	TACATTCCCTTTAGTAACGTGAA AAATGGTGGTGACATAAA TG	61/57
ML41-Rv.dn.comR	CTTACGACGAAACAAAATTG	57
ML45-Fw.lox66-ery	TAAGGAAGATAAATCCCATAAGG TAAACATAAACATGCAA GGAG	58/57
ML46-Rv.ery-lox71	TTCACGTTACTAAAGGGAATGTAG AAAAGGCAATTGCGTT ACC	61/62
ML54-Deg3_penta_F_1	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNAAAA A	45
ML55-Deg3_penta_F_2	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNAAAA T	45
ML56-Deg3_penta_F_3	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNAAAA G	45
ML57-Deg3_penta_F_4	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNAAAA C	45
ML58-Deg3_penta_R_1	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNTTTTT	45
ML59-Deg3_penta_R_2	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNTTTTA	45
ML60-Deg3_penta_R_3	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNTTTTTG	45
ML61-Deg3_penta_R_4	TAGAGTTATTAATGGAATTGCTGATNNNNNNNNNNTTTTTC	45

iv. Milieux de culture et tampons

1. M17

Le milieu M17 se présente sous forme lyophilisée (Oxoid, ThermoScientific). Du glucose nécessaire à la croissance bactérienne est ajouté au M17 et dissous dans de l'eau déminéralisée selon les proportions suivantes (1L de milieu):

Tableau 4 : ingrédients nécessaires pour produire 1L de M17

Composant (1L)	Quantité (g)
M17	37,25
D-Glucose	10
(Agar)	(15)

2. CDM

Le CDM est un milieu de composition contrôlée et composé de différents acides aminés, de bases azotées, de métaux, de tampon phosphate et de sucre. Il est conservé à -20 °C après sa confection. Une fois décongelé, il est conservé à 4 °C. Il doit être entouré de papier aluminium car les vitamines présentes dans le milieu sont photosensibles.

Pour 1 L de CDM, différentes solutions sont mélangées selon les proportions suivantes :

- 860 ml de tampon de croissance
- 100 ml d'une solution d'acide aminé 10x concentrée
- 20 ml d'un mélange de précurseur d'ADN 50x concentré
- 10 ml d'une solution de vitamine 100x concentrée
- 10 ml d'une solution de métaux 100x concentrée

Le pH est ensuite amené à 6.6 avec de l'HCl 32% ou du NaOH 10 M. Le tout est filtré avec un filtre de 0.2 µm car certains composants ne supportent pas d'être autoclavés.

La composition de ces différentes solutions est rapportée ci-dessous.

a. Tampon de croissance (1 L)

- Monohydrate de lactose 10 g
- Acétate de sodium 1 g
- Citrate de triammonium 0,6 g
- Dihydrogénate de potassium 3 g
- Hydrogénate de potassium 2,5 g
- Urée 0,24 g
- L-tyrosine 0,29 g
- L-acide ascorbique 0,5 g
- Glutamine 0,39 g
- Glutamate 0,40 g

Le tout est dissout dans de l'eau MiliQ chauffée à 40°C pour faciliter la solubilisation. Attention toutefois à ne pas dépasser cette température au risque de dégrader les éléments les plus sensibles.

b. Solution de vitamine 100x (1L)

- Pyridoxamine – HCL 0,5 g
- Acide nicotinique 0,1 g
- Riboflavine 0,1 g
- Thiamine –HCl 0,1 g
- Pyridoxine –HCl 0,2 g
- Sel d'acide para-aminobenzoïque 1 g
- Biotine 1 g
- Acide folique 0,1 g
- Vitamine B12 0,1 g
- Acide orotique 0,5 g
- Thymidine 0,5 g
- Inosine 0,5 g
- Acide lipoïque 0,25 g

Le tout est dissout dans 700 ml d'eau MiliQ. Le pH est amené à 10 avec du NaOH 10 M pour dissoudre toutes les vitamines. Ensuite, il est redescendu à 6.6 avec de l'HCl 32%. Et le volume final est amené à 1 L avec de l'eau MiliQ.

c. Solution de métal 100x (1L)

- $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ 20 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ 5 g
- $\text{Fe(II)Cl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_4$ 0,5 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$ 0,5 g
- $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$ 0,01 g
- $\text{Co(II)Cl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ 0,25 g
- $\text{Mn(II)SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,8 g

Le tout est dissout dans 800 ml d'eau MiliQ à laquelle on ajoute 4.8 ml d'HCL 32% pour faciliter la dissolution des métaux. La solution est ensuite amenée à 1 L en ajoutant de l'eau MiliQ.

d. Mélange de précurseur d'ADN 50X (20 ml)

- Adénine 0,01 g
- Guanine 0,01 g
- Xanthine 0,01 g
- Uracile 0,01 g

Les précurseurs d'ADN sont dissous dans 20 ml de NaOH 0,1M stérile. Pour aider la dissolution le mélange est porté à 40°C.

e. Solution d'acide aminé (1 L)

- L-arginine-HCl 3,5 g
- L-cystéine 2,5 g
- L-Histidine 1,5 g
- L-proline 6,75 g
- L-alanine 2,4 g
- L-asparagine 3,5 g
- L-acide aspartique 4,55 g
- L-glycine 1,75 g
- Isoleucine 2,1 g
- L-leucine 4,75 g
- L-lysine-HCl 4,4 g
- L-méthionine 1,25 g
- L-phenylalanine 2,75 g
- L-serine 2,25 g
- L-serine 1,7 g
- L-tryptophane 0,5 g
- L-valine 3,25 g

800 ml d'eau miliQ sont ajoutés et le pH est amené entre 7 et 7.2 pour dissoudre tous les acides aminés. Le volume final est amené à 1 L avec de l'eau MiliQ.

3. LB

Le milieu Lysogeny Broth (LB) est produit à partir de tryptone, yeast extract et de NaCl. Le mélange est dissous dans de l'eau déminéralisée selon les proportions suivantes (1L de milieu) :

Tableau 5 : ingrédients nécessaires pour produire 1L de LB

Composant (1L)	Quantité (g)
Tryptone	10
Yeast extract	5
NaCl	5
(Agar)	(15)

4. Phosphate Saline Buffer (PBS)

Le tampon phosphate 10X est produit à partir de NaCl, KCl, Na₂HPO₄ et KH₂PO₄. Le mélange est dissous dans de l'eau déminéralisée selon les proportions suivantes (1L) :

Tableau 6 : ingrédients nécessaires pour produire 1L PBS 10X

Composant (1L)	Quantité (g)
NaCl	80
KCl	2

Na ₂ HPO ₄	14.4
KH ₂ PO ₄	2.4

La solution stock 10X est filtrée/stérilisée et diluer 10X avec de l'eau déminéralisée stérile avant utilisation.

v. Antibiotiques

Tableau 7 : Liste de différents antibiotiques utilisés avec leur concentration dans le milieu en fonction de l'espèce bactérienne utilisée.

Antibiotique	Organisme	Concentration utilisée (mg/L)
Spectinomycine	<i>Ssa</i>	200
Chloramphénicol	<i>Ssa</i>	5
Erythromycine	<i>Ssa</i>	10
Kanamycine	<i>Ssa</i>	1000
Kanamycine	<i>E. coli</i>	50
Ampicilline	<i>E. coli</i>	50

b. Méthodes

i. Transformation génétique chez *S. salivarius*

La construction de souches génétiquement modifiées dans *Ssa* peut être réalisée en 2 étapes. Premièrement, une construction génétique est effectuée via PCR et PCR de recouvrement. Deuxièmement, l'ADN linéaire produit est transformé dans la bactérie via activation de la transformation naturelle propre à *Ssa*. Les transformants sont ensuite sélectionnés sur milieu de culture contenant un antibiotique correspondant à une résistance placée dans la construction génétique.

1. Construction génétique

a. Amplification des fragments d'ADN par PCR

Une PCR est d'abord effectuée pour obtenir les différents fragments qui seront assemblés ensuite en vue de la production d'un ADN linéaire portant la construction voulue. La séquence des amorces utilisées dans le cadre de ce mémoire est donnée dans le Tableau 3.

Un mix PCR classique pour un volume de 50 µl contient :

- 35,5 µl d'eau déminéralisée,
- 10 µl de buffer Q5 (NEB),
- 1 µl de chaque amorce (forward et reverse),
- 1 µl de dNTP,
- 1 µl d'ADN à amplifier,
- 0,5 µl de polymérase Q5 (NEB).

Le tout est vortexé et placé dans un thermocycleur. Le programme classique des cycles utilisés est donné au Tableau 8. Pour connaître la température d'hybridation des oligonucléotides, se référer au Tableau 3 de la section « matériel ».

Tableau 8: Cycle PCR * la température initiale est la température la plus basse entre les températures des différents oligonucléotides utilisés ; à cette température, on ajoute 6°C puis on retire 1°C par cycle effectué. ** Le temps d'élongation du fragment est fonction de sa taille ; il faut compter 15 sec pour 500 paires de base.

Etape	dénaturation	dénaturation	hybridation	élongation	dénaturation	hybridation	élongation	maturation	inactivation
T° (°C)	98	98	Tprimer+6- >Tp-1*	72	98	Tp-1	72	72	16
Temps	2 min	15 sec	20 sec	15 sec par 500 paires de base**	15 sec	20 sec	15 sec par 500 paires de base**	5 min	non-défini
# cycles	1	7			25			1	1

Une fois le cycle PCR achevé, le produit d'amplification est :

- Chargé sur un gel d'agarose 0.8% (5 µl de la réaction PCR et 2µl d'alourdisant).
- Migré pendant 20 min à 120V (petit gel) ou 40 min à 150V (grand gel).
- Le gel est placé dans du Bromure d'éthidium (BET) pendant 20 min.
- Le gel est ensuite révélé via UV.
- Si le fragment possède la taille attendue, celui-ci est purifié sur colonne via le kit Monarch (NEB).
- La concentration du fragment purifié est ensuite mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop).

2. Assemblage des segments d'ADN

Une fois les fragments de la construction amplifiés, on effectue une deuxième PCR dite de recouvrement avec les différents fragments à assembler. Un mix PCR classique pour un volume de 50 µl contient :

- 10 µl de buffer PCR Q5 (NEB).
- 1 µl de chaque amorce (forward et reverse) des extrémités de la construction.
- 1 µl dNTP.
- Environ 2 µl de chaque fragment précédemment amplifié (le volume est calculé pour avoir un ratio molaire de 1:1 pour chaque fragment).
- 0,5 µl de polymérase Q5 (NEB).
- Un volume d'eau déminéralisée pour obtenir un volume total de 50 µl ;

Le tout est vortexé et placé dans un thermocycleur. Le programme classique des cycles utilisés est donné au Tableau 9. Pour connaître la température des amorces, se référer au Tableau 3 dans la partie matériel.

Tableau 9: Cycle PCR overlap * la température initiale est la température la plus basse entre les températures des différents oligonucléotides utilisés ; à cette température, on ajoute 3°C puis on retire 1°C par cycle effectué. ** Le temps d'élongation des 7 premiers cycles est fonction de la taille du plus grand fragment (15sec/500pb). ***Le temps d'élongation des 25 derniers cycles est fonction de la taille totale de la construction (15sec/500pb).

étape	dénaturation	dénaturation	hybridation	élongation	dénaturation	hybridation	élongation	maturation	inactivation
T° (°C)	98	98	$T_{hyb}+3- >T_{hyb}-5^*$	72	98	$T_{hyb}-1$	72	72	16
Temps	2 min	15 sec	20 sec	15 sec par 500 paires de base (fonction du plus long fragment)**	15 sec	20 sec	15 sec par 500 paires de base***	5 min	non-défini
cycle	1	7			25			1	1

Le même protocole que précédemment appliqué au fragment individuel est ensuite appliqué (chargement sur gel, migration, révélation, purification, quantification)

3. Insertion de l'ADN dans le génome de *Ssa*

J-1

- Inoculation de 500 µl de CDM avec antibiotique correspondant ou non à partir d'un stock - 80°C. Culture « overnight » (préculture).

J0

- Réinoculation de *Ssa* (à partir de la préculture) dans 500 µl de CDM ($OD_{600}=0.05$).
- Incubation pendant 2H à 37°C, afin que les bactéries atteignent le début de phase exponentielle.
- 10 µl d'ADN de la construction à introduire, ainsi que 5 µl de XIP pour activer la compétence, sont ajoutés.
- Incubation 4H à 37°C.
- Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte M17G contenant l'antibiotique correspondant à la construction à insérer. On place les boîtes à 37°C tout la nuit en conditions anaérobies (GaspaK, BD).

J+1

- 8 colonies sont sélectionnées et striées sur boîte contenant du M17G avec le même antibiotique que précédemment.

J+2

- Une colonie par strie est sélectionnée et chaque clone est inoculé dans 900 µl de M17G et un autre tube de 400 µl de CDM contenant les antibiotiques appropriés. La culture est placée « overnight » à 37°C.

J+3

- 100 µl de DMSO sont ajoutés au tube de M17G, et placé à -80°C.

- Les cultures CDM sont utilisées pour effectuer une PCR de vérification de l'insertion. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification sont donnés dans le Tableau 3. La taille du fragment est vérifiée sur gel via électrophorèse (*cfr.* Section méthode) et le fragment est purifié. Le produit PCR purifié est ensuite préparé pour le séquençage en mixant 7 µl d'ADN, 3 µl d'un oligonucléotide s'hybridant à la séquence et 5 µl d'eau déminéralisée.

ii. Mesure de luminescence avec luminomètre multi-plaque

1. Luciférase bactérienne (*luxAB*)

J-1

- 500 µl de CDM sont inoculés avec les souches de *Ssa* à analyser avec un antibiotique si nécessaire.

J0

- Une plaque multi-puits est remplie selon le schéma repris dans le Tableau 10.

Tableau 10: Agencement de la plaque multi-puits pour le luminomètre. Chaque puit est rempli avec 300µl de CDM ou d'eau déminéralisée.

CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM
CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM
CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM
H2O	Blanc	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O	H2O
CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM
CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM
CDM	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	H2O	CDM	H2O	CDM	H2O	CDM

- Chaque triplicat de puits CDM permet de tester un clone différent. Il est donc possible de tester 12 conditions. Chaque puit CDM est inoculé avec un clone à une OD₆₀₀ de 0.05.
- Le blanc est rempli de 300 µl de CDM sans inoculation bactérienne.
- Dans les interstices entre les puits, on dépose 50 µl d'un mélange formé par 105 µL de nonyl-aldehyde (Sigma Aldrich) dilué dans 10 ml d'huile minérale (Sigma Aldrich).
- La plaque est refermée et placée dans un luminomètre (Hidex Plate reader ou Varioskan, Thermofischer) à 37°C. Le luminomètre mesure l'absorbance de chaque puit à 600nm et la production de lumière toutes les 15 minutes.

2. Luciférase de luciole (*luc*)

Le protocole est le même que celui décrit dans la section précédente mise à part que le réactif utilisé est différent. Dans ce cas, 300 µl de luciférine (Sigma Aldrich) est mélangé à 4,5 ml de CDM avant remplissage des puits.

iii. Production du plasmide pK_{mit}

Le plasmide pK_{mit} est un plasmide possédant un gène de transposase ainsi qu'un transposon extrêmement actif. (Tableau 2 et Figure 24) Pour cette raison, celui-ci est particulièrement instable et compliqué à produire en large quantité.

1. Production des cellules électrocompétentes

Etant donné le caractère instable du plasmide pKmit et de la souche C43 résistante à la transposition (Breton & McIver, 2013), des cellules électrocompétentes fraîches sont produites pour chaque électroporation.

J-1

- Inoculer 25 ml de LB avec une souche de *E. coli* C43 (Breton & McIver, 2013). Culture à 37°C overnight avec agitation.

J0

- 250 ml de LB sont inoculés avec 2,5 ml de préculture de C43 et incubés avec agitation à 37°C.
- Lorsque la culture atteint une OD₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,8, celle-ci est placée sur glace pendant 1 heure.
- La culture est ensuite centrifugée à 4°C (4000 RPM) pendant 10 minutes.
- Le surnageant est jeté et le culot resolubilisé dans 250 ml d'eau milliQ à 4°C.
- Le culot resolubilisé est centrifugé à 4°C (4000 RPM) pendant 10 minutes et resolubilisé dans 50 ml d'eau milliQ à 4°C.
- Le culot resolubilisé est centrifugé à 4°C (4000 RPM) pendant 10 minutes et resolubilisé dans 25 ml d'un mélange eau milliQ-glycérol (10:1) à 4°C.
- Le culot resolubilisé est centrifugé à 4°C (4000 RPM) pendant 10 minutes et resolubilisé dans 500 µl d'un mélange eau milliQ-glycérol (10:1) à 4°C.
- Les 500 µl sont aliquotés par 50 µl et dilués dans 150 µl d'eau milliQ à 4°C.

2. Electroporation

- 5 µl de pKmit (~50 ng/µl) sont transférés dans un aliquot de 200 µl de cellules compétentes et le mélange est injecté dans une cuvette d'électroporation.
- L'électroporation est effectuée avec un électroporateur réglé à 2500V et 25µF.
- 900 µl de LB préchauffé à 30°C sont rapidement ajoutés à la cuvette et les cellules resuspendues dans le LB chaud sont transférées dans un tube eppendorf.
- Le tube est incubé une heure à 30°C (le pKmit possède une origine de réplication thermosensible).
- La culture est étalée sur boîte LB contenant de la spectinomycine et de la kanamycine et incubée à 30°C.
- Dès l'apparition de micro-colonies (~12 heures), les boîtes sont placées à 4°C pour éviter l'expression de la transposase et la perte d'intégrité du plasmide.
- Dès que possible, 8 clones sont inoculés dans 8 x 250 ml de LB contenant de la spectinomycine et de la kanamycine et incubés avec agitation à 30°C.
- Lorsque la culture atteint une OD₆₀₀ de 1 (afin de minimiser le temps de séjour du plasmide dans la bactérie), la culture est centrifugée à 4°C (4000 RPM) pendant 10 minutes.
- Le surnageant est évacué et les cellules sont resuspendues dans 2 ml d'eau et conservées à -20°C.

3. Vérification et purification du plasmide

- 100 µl de la suspension cellulaire obtenue au point précédent sont purifiés avec un kit miniprep (NEB).

- Le plasmide purifié obtenu est ensuite digéré avec les enzymes de restriction PstI (NEB) et EcoRI (NEB).

Un mélange de digestion classique pour un volume de 10 µl contient :

- 8,8 µl de Plasmide,
- 0,2 µl d'enzyme
- 1 µl de tampon.
- Après digestion 1 heure à 37°C, 10 µl sont chargés sur gel d'agarose et l'ADN est révélé par du BET.
- Une taille de 1,5 kb et 5,5kb pour les deux digestions doit alors être visible.
- Les clones qui possèdent les profils de restriction attendus sont ensuite purifiés selon la même méthode (miniprep) par 100 µl.
- La concentration de chaque purification est alors mesurée via spectrophotométrie (Nanodrop).

iv. Production de mutants aléatoires

Après avoir produit le plasmide pK_{mit} en quantité suffisante, celui-ci peut être utilisé pour réaliser une mutagenèse aléatoire chez *Ssa*.

1. Transformation

J-1

- Une préculture de la souche à transformer et inoculée à partir d'un stock -80°C dans 500 µl de M17G avec l'antibiotique approprié.

J0

- 10 µl de la préculture de *Ssa* sont inoculés dans 500 µl de CDMG et incubés à 37°C pendant 2h30.
- Lorsque le début de phase exponentielle est atteint, environ 250 ng de pK_{mit} sont ajoutés avec du XIP à une concentration finale de 1 µM.
- La culture est ensuite incubée 3h30 à 30°C et étalée sur boîte M17G spec²⁵⁰ kan¹⁰⁰⁰.
- Les boîtes sont incubées à 30°C « overnight » en conditions anaérobies (Gaspak, BD).

J+1

- Les colonies obtenues sur boîte de Petri sont resuspendues dans 3 ml de PBS (Phosphate Saline Buffer).
- Le tampon phosphate contenant les cellules transformées est ensuite étalé à des dilutions allant de 10⁻² à 10⁻⁴ sur boîte M17G kan¹⁰⁰⁰ et incubé à 30°C pendant 4 heures, puis à 40°C pendant 7 heures. Cette étape permet de sélectionner uniquement les transposants qui ont intégré dans le génome le transposon portant le gène *kan*.
- Le volume non utilisé de PBS contenant les cellules transformées peut être aliquoté à -80°C pour conservation.

J+2

- Un certain nombre de transposants ayant poussé sur boîte kan¹⁰⁰⁰ sont transférés dans 10 ml de M17G kan¹⁰⁰⁰ et incubés à 37°C « overnight » (1 colonie par tube).

J+3

- 1 ml de culture du transposant est conservé à -80°C (DMSO 10%) et les 9 ml de culture supplémentaire sont congelés à -20°C en vue d'une extraction génomique.

2. Purification ADN

Afin de vérifier le site d'insertion du transposon dans le transposant sélectionné, une purification d'ADN chromosomique est nécessaire afin d'obtenir de l'ADN de qualité sur lequel il sera possible d'effectuer des PCR d'identification du locus d'insertion.

Lyse

- Les cultures de transposants sont dégelées et centrifugées à 6000 RPM pendant 8 min (4°C).
- Le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse fraîchement préparé (250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 65 mg/L lysosyme).
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes.
- 30 µl de SDS 10% est ajouté et le mélange est vortexé vigoureusement.
- Le mélange est ensuite incubé à 60°C pendant 20 minutes et vortexé régulièrement pendant l'incubation.

Extraction phénol-chloroforme

- 600 µl d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (50:49:1) sont ajoutés à la solution de lyse.
- Le mélange est alors vortexé vigoureusement, puis centrifugé à 10000 RPM pendant 10 minutes. La phase aqueuse supérieure est récupérée.
- L'extraction est répétée deux fois.
- La phase aqueuse obtenue est mélangée à 600 µl de chloroforme saturé à l'eau, vortexée et centrifugée à 10 000 RPM pendant 5 minutes.
- La partie aqueuse est mélangée à un volume d'éthanol (1:1) et placée à -20°C pendant une heure.
- Le mélange est ensuite centrifugé à 4°C à 12000 RPM pendant 15 minutes.
- Le culot est séché à vide (SpeedVac, ThermoScientific) à 40°C pendant 20 minutes.
- Finalement, le culot est resuspendu dans 100 µl d'eau déminéralisée et la concentration en ADN mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop).

3. PCR arbitraire pour l'identification du locus de transposition

Une fois l'ADN chromosomique purifié, il est possible d'effectuer une PCR arbitraire afin d'identifier le locus dans lequel s'est inséré le transposon. Plusieurs variantes de cette méthode ont été testées et sont décrites dans cette section. Néanmoins, le principe général reste le même, une PCR arbitraire avec une amorce s'hybridant dans le transposon et une amorce dégénérée pouvant s'hybrider n'importe où dans le génome est réalisée. Ensuite, une PCR supplémentaire est effectuée avec une amorce correspondant à une région amplifiée du transposon et une autre amorce correspondant à la queue flottante de l'amorce dégénérée utilisée précédemment (Figure 30).

a. PCR 1 avec amorce dégénérée

On a effectué une première PCR avec les amorces ML26 et ML27. Celle-ci est réalisée avec la Taq polymérase (Promega) et non la Q5 comme précédemment.

Un mélange PCR classique pour un volume de 50 µl contient :

- 30,5 µl d'eau déminéralisée,
- 10 µl de tampon PCR TAQ (Promega),
- 5 µl de tampon Mg additionnel (Promega),
- 1 µl de chaque amorce,
- 1 µl de dNTP,
- 1 µl d'ADN à amplifier,
- 0,5 µl de polymérase TAQ (Promega).

Le tout est vortexé et placé dans un thermocycleur. Le programme classique de cycles utilisés est donné au Tableau 11. Pour connaître la température des oligonucléotides, se référer au Tableau 3 dans la partie matériel.

Tableau 11: Cycle PCR avec amorce dégénérée

étape	dénaturation	dénaturation	hybridation	élongation	dénaturation	hybridation	élongation	maturation	inactivation
T° (°C)	95	95	30	72	95	45	72	72	16
Temps	5 min	30 sec	30 sec	1 min	30 sec	30 sec	1 min	5 min	Non-défini
cycles	1	6			30			1	1

Le produit PCR obtenu est chargé sur gel, visualisé, purifié et quantifié comme décrit précédemment pour une PCR classique. La présence d'un « smear » sur gel correspond à l'amplification de différentes tailles d'ADN lié à l'utilisation de l'amorce dégénérée.

b. PCR 1 avec amorce dégénérée et pentanucléotide optimisé

La méthode utilisée ici est identique à la précédente mais l'amorce dégénérée n'est plus ML27. Celle-ci est remplacée par un mélange de 4 amorces reverse possédant une extrémité 3' constituée d'une séquence de 5 nucléotides non-dégénérés. Les 4 séquences de 5 nucléotides correspondent aux pentanucléotides les plus fréquents dans le génome de *Ssa* (AAAAA, AAAAT, AAAAG, AAAAC, ou TTTTT, TTTTA, TTTTG, TTTTC). Ces séquences ont été déterminées via le programme *wordcount*. Les amorces correspondant à ces pentanucléotides, suivi de 10 nucléotides dégénérés et d'une queue flottante, sont les oligonucléotides ML54 à ML57 et ML58 à ML61 (Tableau 3).

Comme précédemment, le produit PCR est vérifié sur gel, purifié et quantifié. La présence d'un « smear » est indicatif d'une amplification réussie.

4. PCR 2 « nested » et séquençage

Pour cette réaction de PCR, les amorces utilisées sont ML28 et ML29. Le mélange PCR est identique à celui décrit précédemment (utilisation TAQ polymérase). Le tout est vortexé et placé dans un thermocycleur. Le programme classique de cycles utilisés est donné au Tableau 12. Pour connaître la température des amorces, se référer au Tableau 3 dans la partie matériel.

Tableau 12 : Cycles PCR pour la « nested » PCR

étape	dénaturation	dénaturation	hybridation	élongation	maturation	inactivation
T° (°C)	95	95	50	72	72	16

Temps	5 min	30 sec	30 sec	1 min	5 min	non-défini
cycle	1	30			1	1

Le produit PCR est vérifié sur gel (le « smear » devrait être encore présent mais réduit), purifié et quantifié comme précédemment. 7 µl du produit PCR sont mélangés à 3 µl de l'amorce ML30 et 5 µl d'eau déminéralisée. Le mélange est envoyé au séquençage pour identification du locus d'insertion.

5. Back-transformation

Comme la transposase du plasmide pKrmIt est extrêmement active, il est possible que plusieurs événements de transposition aient lieu dans un transformant du plasmide. Pour limiter le nombre d'événement de transposition par cellule, une stratégie possible est d'utiliser l'ADN chromosomique d'un ou plusieurs transposant(s) pour effectuer une transformation naturelle de *Ssa*. On limite ainsi la probabilité de trouver plusieurs événements de transposition par cellule.

J-1

- 500 µl de CDMG avec antibiotique approprié sont inoculés à partir du stock -80°C et incubés à 37°C « overnight ».

J0

- 500 µl de CDMG sont inoculés avec 10 µl de la préculture et incubés 2h30 à 37°C.
- 10 µl d'ADN chromosomique, ainsi que du XIP à une concentration finale de 1 µM, sont ajoutés à la culture liquide.
- La culture est incubée 4 heures à 37°C et étalée sur boîte M17G kan¹⁰⁰⁰.
- Les boîtes sont incubées à 37°C « overnight » en conditions anaérobies (Gaspak, BD)

J+1

- Les colonies obtenues sont réinoculées dans 10 ml de M17G kan¹⁰⁰⁰, incubées à 37°C « overnight ».

J+2

- 900 µl de culture sont conservés à -80°C (10% DMSO) et le reste de la culture est utilisée pour faire une extraction chromosomique suivi d'une PCR arbitraire d'identification comme décrits au point 4.2 et 4.3, respectivement.

6. Identification du locus de transposition par PCR inverse

Etant donné les problèmes rencontrés lors de la mise en place de la PCR arbitraire pour identifier le locus d'insertion du transposon, une méthode alternative a été développée pour *Ssa*. Celle-ci consiste à utiliser la méthode dite de « PCR inverse ». En bref, l'ADN chromosomique d'un transposant est purifié et digéré avec une enzyme de restriction capable de digérer l'ADN chromosomique de *Ssa* de manière importante (taille moyenne de 2000 pb) mais incapable de digérer le transposon. Les fragments obtenus sont ensuite insérés dans le plasmide pUC18 via ligation et le mélange transformé dans *E. coli*. Les transformants résistants à la kanamycine sont séquencés et les régions flanquantes du transposon identifiées dans le génome de *Ssa* (Figure 38).

- Une transformation de *Ssa* est effectuée avec le plasmide pKmit (section 4.1). l'ADN chromosomique d'un transposant est purifié (section 4.2) et digéré pendant 4 heures avec l'enzyme de restriction BanI ou Bsp1286I (NEB).
- Un mélange de digestion classique pour un volume de 50 µl contient :
 - 1 µl d'ADN (~1µg)
 - 0,5 µl de BanI (NEB) ou 0,5 µl de Bsp1286I (NEB)
 - 10 µl de tampon « cut smart » (NEB)
 - 38,5 µl d'eau déminéralisée
- Le mélange de restriction est ensuite inactivé à 60°C pendant 20 minutes
- En parallèle, le plasmide pUC18 est digéré avec le même protocole mais avec les enzymes KpnI ou SacI (celles-ci produisent les mêmes extrémités collantes que BanI ou Bsp1286I, respectivement).
- Les deux produits de restriction sont ensuite soumis à une ligation.
- Un mix de ligation classique pour un volume de 50 µl contient :
 - 5 µg d'ADN génomique digéré par BanI ou par Bsp1286I
 - 50 ng de pUC18 digéré par KpnI ou par SacI,
 - 25 µl de tampon de ligation (NEB),
 - 1 µl de ligase T4 (NEB).
 - 9 µl d'eau déminéralisée
- Le mix de ligation est laissé à température ambiante pendant 5 heures.
- Le produit de ligation est ensuite utilisé pour électroporer des souches de *E. coli* TOP10 (cfr. Section 3.2).
- Les transformant sont sélectionnés sur boîte LB kan⁵⁰ contenant du X-gal. La présence de colonies blanches est révélatrice d'une insertion du transposon contenant le gène de résistance à la kanamycine dans le gène *lacZ* du pUC18.

v. Criblage

1. Criblage via système rapporteur *lacZ* et coloration bleue

Afin de cribler des transposant ayant perdu la fonctionnalité de gènes impliqués dans le *shut-off*, des mutants portant une délétion du gène *lacZ* ($\Delta lacZ::cat$, permet d'éliminer l'activité basale de *lacZ*) ainsi qu'une fusion transcriptionnelle entre les promoteurs P_{comX} , P_{comS} , ou P_{comGA} avec le gène *lacZ* ($P_{comS/comX/comGA-lacZ}$, permet d'avoir une activité bêta-galactosidase compétence-dépendante) ont été produits. Ceux-ci permettent de lier la perte de fonctionnalité d'un gène impliqué dans le *shut-off* via inactivation transpositionnelle à un phénotype bleu intense. Les conditions optimales de criblage sur boîtes M17 sont les suivants :

- Glucose 0,5%
- IPTG 0,1%
- Xgal 0,2%
- XIP 250nM.
- Les boîtes sont incubées une journée à 37°C en conditions anaérobies (Gaspak, BD).
- Les boîtes sont ensuite laissées à 4°C en conditions aérobies pendant 4 heures afin de permettre le développement de la coloration bleue.

2. Sélection par système *lacZ*

En utilisant les souches décrites dans la section précédente ($\Delta lacZ::cat$; $P_{comS/comX/comGA-lacZ}$), il est aussi possible d'effectuer une sélection des mutants capables de pousser sur milieu CDM contenant du

lactose comme source principale de carbone. Afin de réaliser ce criblage, des transposants préalablement sélectionnés sont étalés (dilutions 10^{-2} à 10^{-4}) sur boîtes CDM contenant du lactose a la place du glucose. Les boîtes sont incubées à 37°C en conditions anaérobies « overnight ».

3. Résultats

a. Validation de l'implication du régulon de *comX* dans le *shut-off* de la compétence chez *Ssa*

Chez *Streptococcus pneumoniae*, ComX active la transcription du gène *dprA*, un gène tardif de la compétence. Or, des études récentes ont montré que DprA inhibe fortement l'activation du gène *comX* (Mirouze et al., 2013). D'autre part, la délétion de *comX* chez *Streptococcus thermophilus* (*Sth*) entraîne une activation de la compétence plus longue et plus intense, suggérant qu'un gène de la phase tardive serait impliqué dans le *shut-off* (Haustenne et al., 2015). De manière analogue à *Sth*, nous supposons donc que chez *Streptococcus salivarius* (*Ssa*), un ou plusieurs gène(s) du *shut-off* est/sont activé(s) par ComX et que ce ou ces gène(s) agisse(nt) en diminuant l'activité d'un des deux acteurs de la phase précoce de la compétence : ComR et ComS. Nous pensons que cela pourrait se traduire soit par une inhibition au niveau de la transcription, soit par une inhibition directe au niveau protéique (séquestration ou dégradation).

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience dans laquelle nous avons observé l'expression des gènes *comR* et *comS* grâce à une fusion transcriptionnelle de leurs promoteurs avec les gènes de la luciférase bactérienne (*luxAB*) (Figure 11). Il est à noter que nous avons construit aussi une fusion transcriptionnelle P_{comX} -*luxAB* mais que les résultats ne seront pas décrits dans ce mémoire car ceux-ci montrent une variabilité importante. Etant donné l'activation transcriptionnelle similaire de P_{comS} et P_{comX} via ComRS, on émettra l'hypothèse que les résultats obtenus sur P_{comS} sont transposables à P_{comX} .

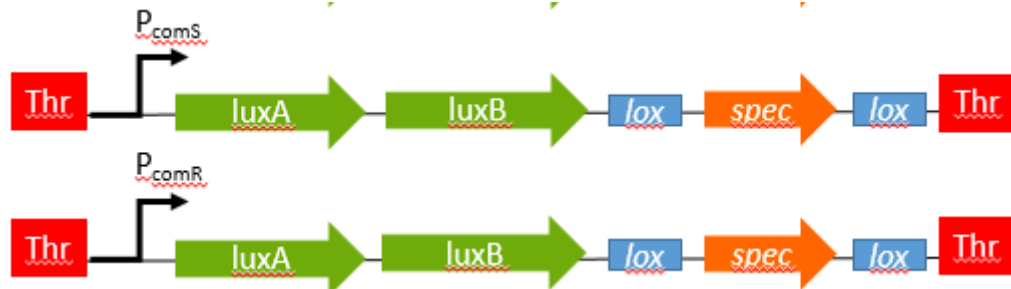


Figure 11: Schéma des différents rapporteurs utilisés pour l'expérience. Les flèches vertes représentent les deux gènes de la luciférase bactérienne, les flèches oranges représentent une résistance à la spectinomycine. Les flèches noires représentent le promoteur d'un des deux acteurs de la phase précoce de la compétence (*comS* et *comR*). Les carrés bleus représentent des régions possédant des répétitions directes qui permettent d'exciser la cassette de résistance si besoin. Finalement, les carrés rouges représentent des portions du locus ARNt thréonine entre lesquelles la construction a été intégrée.

Au plus le promoteur des différents gènes précoces de la compétence est activé, au plus le rapporteur *luxAB* sera exprimé. Or l'expression de la luciférase est directement quantifiable via la mesure de luminescence. Nous comparerons la production de lumière liée à l'activation de ces deux promoteurs dans une souche « WT » (pas de constructions supplémentaires) et dans une souche $\Delta comX$ (souche dans laquelle nous avons délété le gène *comX*) (Figure 12 et Figure 13).

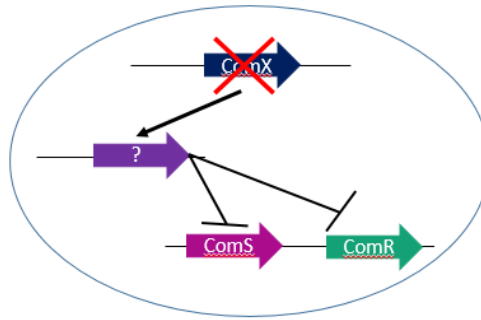


Figure 12: Schéma de l'expérience permettant de vérifier la présence d'un gène de shut-off activé via ComX. Dans cette expérience, nous délétions *comX* afin d'empêcher l'activation du régulon de ComX via activation de la compétence. L'effet inhibiteur du régulon de ComX sur la phase précoce ne devrait donc pas être observable dans ces conditions.

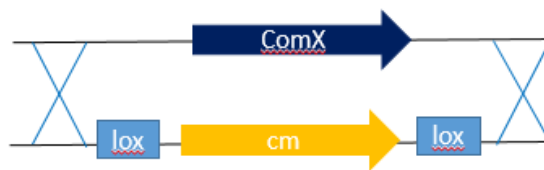


Figure 13: Schéma de la délétion de *comX*. La flèche bleue représente le gène *comX* tandis que la flèche jaune représente le gène de résistance au chloramphénicol. Les carrés bleus représentent des régions possédant des répétitions directes qui permettent d'exciser la cassette de résistance si besoin.

i. Effet du régulon de ComX sur le shut-off : activation via XIP

Pour cette expérience, nous avons décidé d'ajouter du XIP₅ à une concentration de 1 μ M afin d'induire la compétence (*Ssa* n'est pas naturellement compétent en conditions de laboratoire). Les résultats obtenus sont montrés à la figure 14.

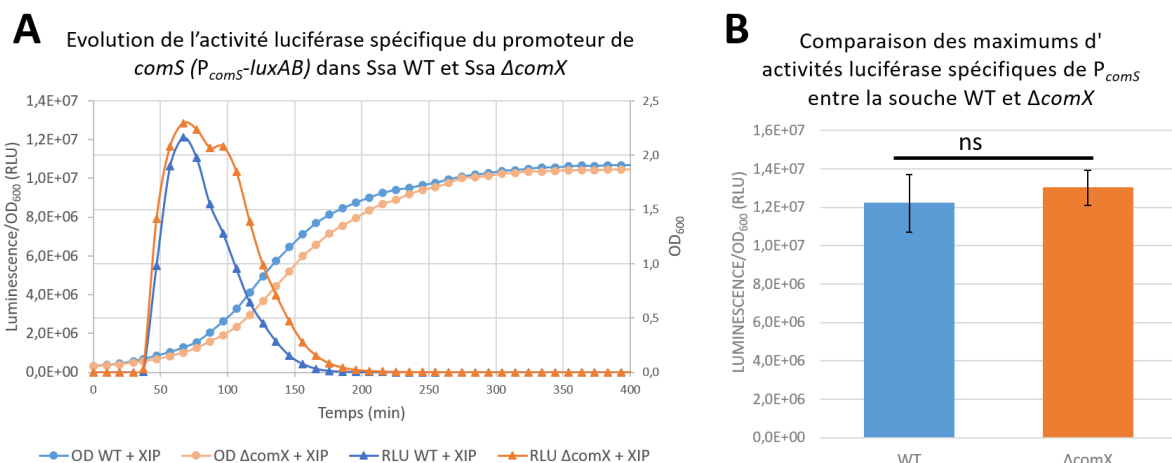


Figure 14 : **A.** Graphique de l'évolution de la croissance bactérienne mesurée via densité optique (DO_{600}) et de la luminescence spécifique associée à l'activation de P_{comS} mesurées dans une souche avec ($\Delta comX$) ou sans (WT) délétion de *comX*. **B.** Comparaison des intensités maximales de luminescence spécifique. La compétence est activée dans les deux souches via ajout de XIP₅ 1 μ M. Les graphiques sont représentatifs de triplicats biologiques. Le test statistique de Student est appliqué pour comparer les moyennes de maximums (ns : non significatif).

La Figure 14 nous permet d'observer que l'intensité de l'expression du promoteur P_{comS} ne varie pas si nous supprimons le gène $comX$. En revanche la délétion semble impacter légèrement la durée de l'expression du promoteur P_{comS} . Nous observons aussi que la luminescence n'est plus produite dès la fin de la phase exponentielle. Cela peut être expliqué par l'absence d'expression de $comS$ lors de cette étape de la croissance mais cela peut aussi s'expliquer par la diminution de FMNH₂ en phase stationnaire. En effet, le FMNH₂ est un cofacteur obligatoire pour la production de luminescence via LuxAB.

Dans un deuxième temps, nous avons observé l'effet de la délétion de $comX$ sur l'activation du promoteur de $comR$. Bien que ComX n'ait jusqu'à présent jamais montré d'effet sur l'expression de $comR$, nous avons ajouté du XIP₅ pour être dans des conditions d'activation de la compétence. Les résultats sont donnés à la Figure 15.

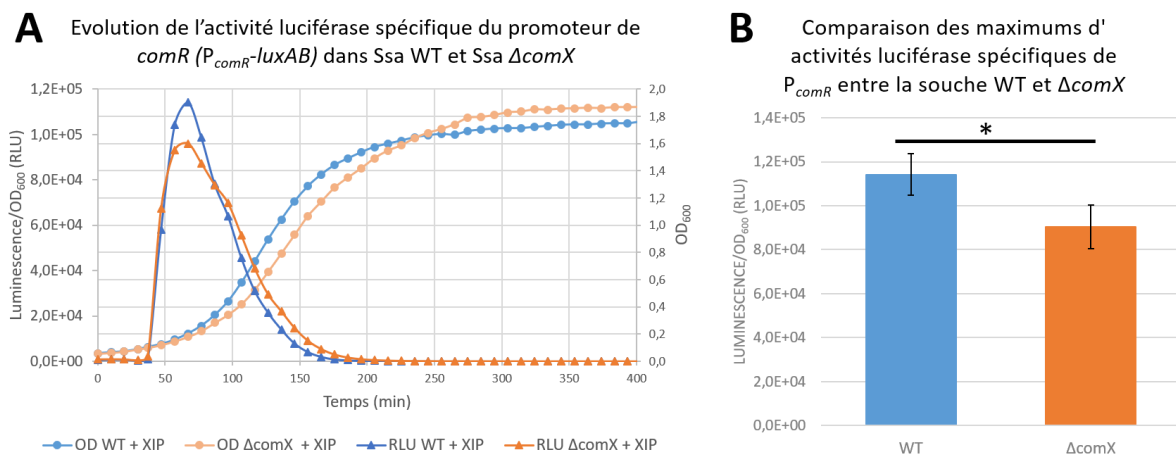


Figure 15 : **A.** Graphique de l'évolution de la croissance bactérienne mesurée via densité optique (DO_{600}) et de la luminescence spécifique associée à l'activation de P_{comR} mesurées dans une souche avec ($\Delta comX$) ou sans (WT) délétion de $comX$. **B.** Comparaison des intensités maximales de luminescence spécifique. La compétence est activée dans les deux souches via ajout de XIP₅ 1 μ M. Les graphiques sont représentatifs de triplicats biologiques. Le test statistique de Student est appliqué pour comparer les moyennes de maximums (* : p -valeur < 0.05).

La Figure 15 nous permet d'observer que l'expression du promoteur P_{comR} semble légèrement, mais de manière significative, diminuer d'intensité lorsque le gène $comX$ est supprimé. D'autre part, l'activité de P_{comR} reste assez faible.

Les résultats obtenus à la Figure 14 et à la Figure 15 suggèrent que la délétion de $comX$ n'a pas d'effet sur le *shut-off* de la compétence. Toutefois, l'addition de XIP synthétique à des hautes concentrations (1 μ M) telles que utilisées dans ces expériences n'est probablement pas le mode d'activation le plus proche de la réalité physiologique des cellules. En effet, il est peu probable que *Ssa* soit soumis à de telles concentrations en XIP dans son environnement naturel. Pour cette raison, nous avons décidé d'activer la compétence via la surexpression de $comR$ dans les mêmes souches rapportrices, de manière à avoir un système d'activation potentiellement plus proche de la réalité physiologique de *Ssa*.

ii. Effet du régulon de ComX sur le *Shut-off* : activation via surexpression de $comR$

Pour cette expérience, nous avons décidé d'activer la compétence de manière plus naturelle afin d'éviter une concentration en XIP non-physiologique. Pour ce faire, nous avons produit des mutants dans lesquels nous pouvions induire l'expression de $comR$ par ajout de xylose grâce à une fusion transcriptionnelle d'un promoteur inductible au xylose avec $comR$ (P_{xy12} - $comR$) (Figure 16).

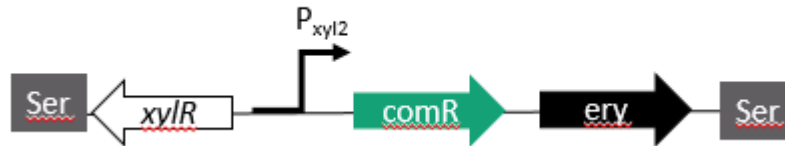


Figure 16 : Schéma du système d'induction de la compétence via surexpression de *comR*. La flèche blanche représente le répresseur de l'opéron xylose (*xyIR*), la flèche verte représente le gène *comR* et la flèche noire le gène de résistance à l'érythromycine. Quant à la petite flèche noire elle représente le promoteur inductible au xylose P_{xyl2} . Finalement, les carrés gris représentent des portions du locus ARNt sérine entre lesquelles la construction a été intégrée.

Lors de cette expérience, nous avons ajouté du xylose à une concentration finale de 1% afin d'activer la compétence via surexpression de *comR*. La Figure 17 montre les résultats obtenus pour le système rapporteur P_{comS} -*luxAB*.

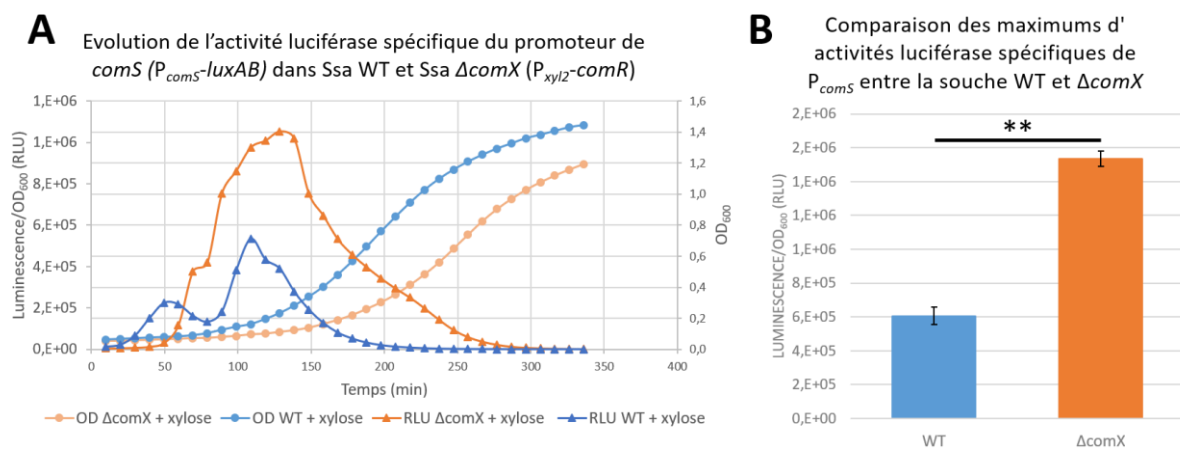


Figure 17 : **A.** Graphique de l'évolution de la croissance bactérienne mesurée via densité optique (DO_{600}) et de la luminescence spécifique associée à l'activation de P_{comS} mesurées dans une souche avec ($\Delta comX$) ou sans (WT) délétion de *comX*. **B.** Comparaison des intensités maximales de luminescence spécifique. La compétence est activée dans les deux souches par surexpression de *comR* via la construction P_{xyl2} -*comR*. Les graphiques sont représentatifs de triplicats biologiques. Le test statistique de Student est appliqué pour comparer les moyennes de maximums (** : p -valeur < 0.01).

La Figure 17 nous permet d'observer que non seulement l'expression de *comS* est significativement plus intense dans le clone $\Delta comX$ mais qu'en plus son expression semble durer plus longtemps.

Nous avons ensuite utilisé le même système d'activation via surexpression de *comR* avec le système rapporteur P_{comR} -*luxAB*. Les données sont reprises dans la Figure 18.

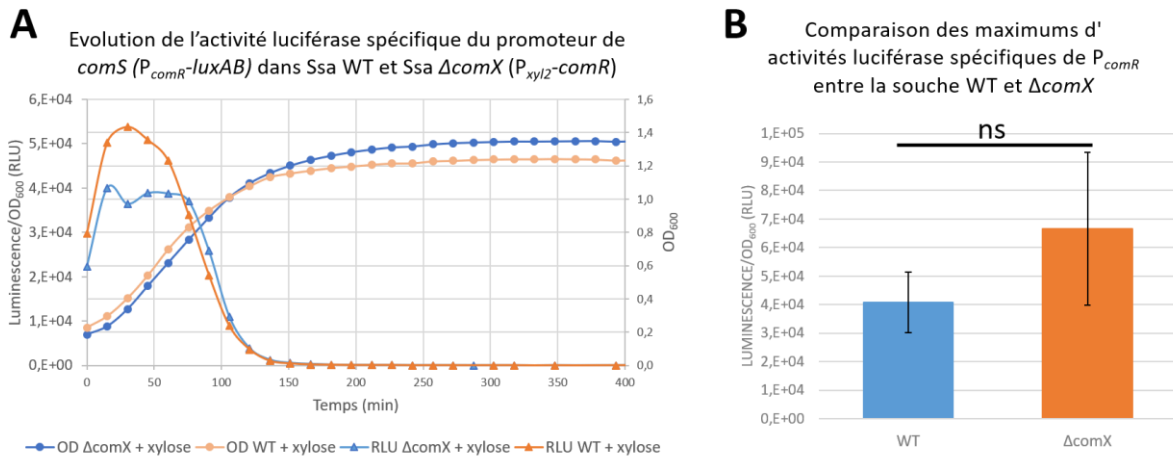


Figure 18 : **A.** Graphique de l'évolution de la croissance bactérienne mesurée via densité optique (DO_{600}) et de la luminescence spécifique associée à l'activation de P_{comR} mesurées dans une souche avec ($\Delta comX$) ou sans (WT) délétion de *comX*. **B.** Comparaison des intensités maximales de luminescence spécifique. La compétence est activée dans les deux souches par surexpression de *comR* via la construction P_{xyI2} -*comR*. Les graphiques sont représentatifs de triplicats biologiques. Le test statistique de Student est appliqué pour comparer les moyennes de maximums (ns : non-significatif).

La Figure 18 nous permet d'observer que l'ajout de xylose ne provoque pas de changement significatif (p -valeur=0,2) de l'expression du promoteur de *comR* lors de l'activation de la compétence via surexpression de *comR*.

On observe donc des résultats différents pour l'activation de la compétence via ajout de XIPs ou bien via surexpression de *comR*. La deuxième stratégie étant celle qui semble la plus proche de la réalité, nous pouvons raisonnablement penser que la délétion de *comX* a un effet sur l'expression de *comS* mais pas sur *comR*.

b. Développement d'outils pour étudier l'expression des gènes du *shut-off* durant la fin de la phase exponentielle et la phase stationnaire

Pour étudier l'expression des gènes via luminescence, nous utilisons classiquement au laboratoire la luciférase bactérienne (*luxAB*). Le problème est que cette dernière utilise du FMNH₂ comme cofacteur, or la concentration en FMNH₂ diminue fortement lors de la phase stationnaire. Cette caractéristique propre à la croissance bactérienne est problématique pour l'étude des gènes du *shut-off* qui seraient exprimés durant la phase stationnaire. Afin de contourner cette problématique, nous avons testé plusieurs constructions avec un système de luciférase alternatif indépendant du FMNH₂ (*luc*) (Figure 19).

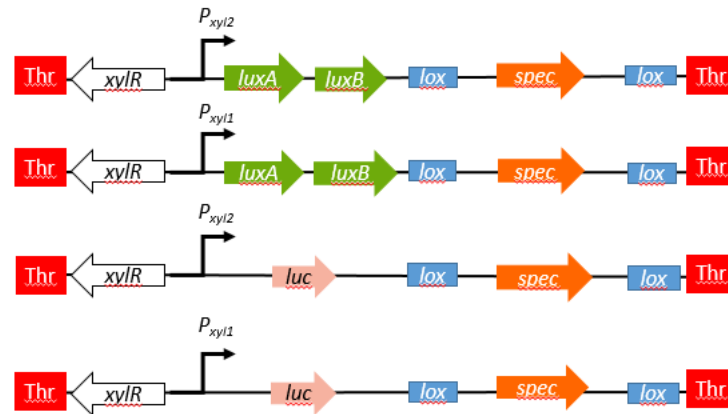


Figure 19 : Schéma des différents rapporteurs testés. Différentes combinaisons entre les promoteurs P_{xyl1} ou P_{xyl2} et les luciférases *luxAB* et *luc* ont été testées. La flèche blanche représente le répresseur de l'opéron xylose (*xylR*), les flèches vertes représentent les gènes *luxA* et *luxB* (luciférase bactérienne), la flèche rose représente le gène *luc* (luciférase chez la luciole) et la flèche orange représente le gène de résistance à la spectinomycine. Quant aux petites flèches noires, elles représentent les différents promoteurs inductibles au xylose (P_{xyl1} et P_{xyl2}). Les carrés bleus représentent des régions possédant des répétitions directes qui permettent d'exciser la cassette de résistance si besoin. Finalement, les carrés rouges représentent des portions du locus ARNt thréonine entre lesquels la construction a été intégrée.

Dans ces constructions, nous avons utilisé deux promoteurs différents inductibles au xylose : P_{xyl2} étant un promoteur faible mais n'ayant pas de bruit de fond et P_{xyl1} étant un promoteur fort mais possédant un bruit de fond plus important. Finalement, nous avons fait varier l'activité luciférase en utilisant soit *luxAB* (luciférase bactérienne qui utilise le FMNH₂ comme cofacteur), soit *luc* (luciférase de luciole qui utilise l'ATP comme cofacteur) (Figure 19).

Les résultats obtenus pour les systèmes rapporteurs P_{xyl1} -*luxAB* et P_{xyl2} -*luxAB* sont donnés à la Figure 20 et à la Figure 21, respectivement.

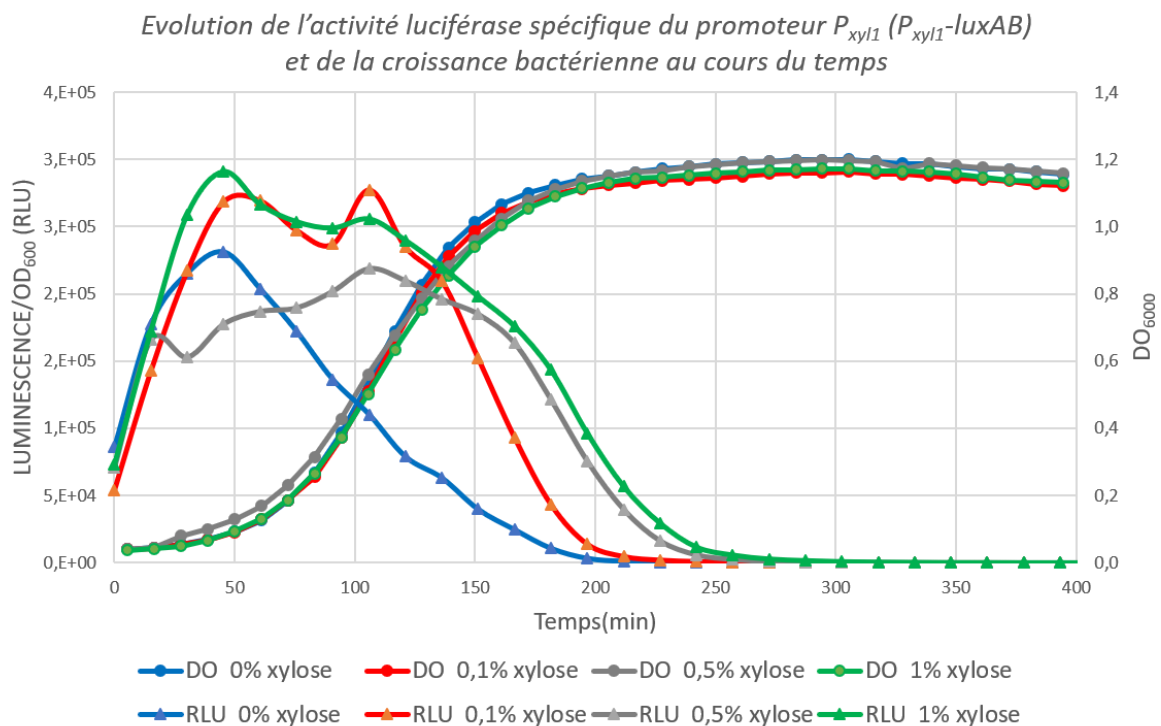


Figure 20 : Graphique de l'évolution de la luminescence spécifique (RLU/DO₆₀₀) associée à l'activation de P_{xyl1} fusionné aux gènes de luciférase luxAB et de la densité optique (DO₆₀₀) mesurées avec différentes concentrations en xylose.

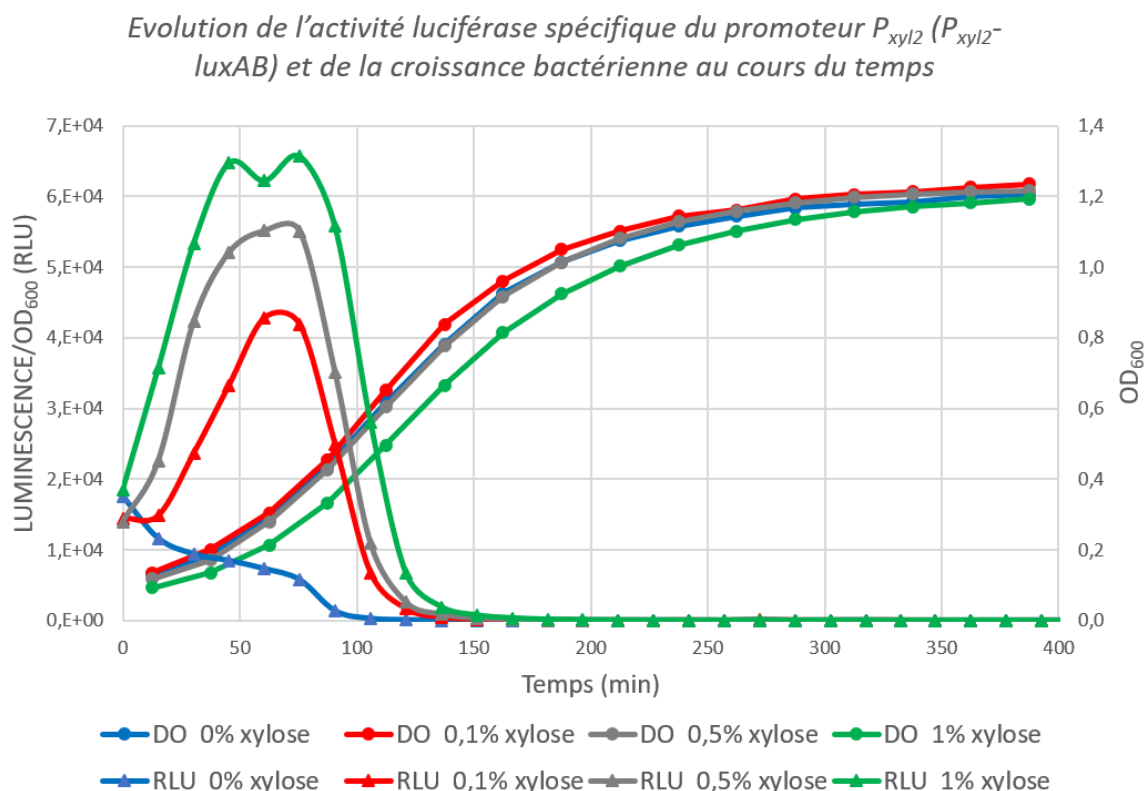


Figure 21 : Graphique de l'évolution de la luminescence spécifique (RLU/DO₆₀₀) associée à l'activation de P_{xyl2} fusionné aux gènes de luciférase luxAB et de la densité optique (DO₆₀₀) mesurées avec différentes concentrations en xylose.

Comme attendu, le promoteur P_{xyl1} présente un bruit de fond très important mais une activation plus intense que le promoteur P_{xyl2} . En parallèle, le promoteur P_{xyl2} montre une activation plus graduelle en fonction de la concentration en xylose. Néanmoins, l'activité des deux promoteurs devient rapidement indétectable lors de la phase exponentielle (P_{xyl2}) ou de l'entrée phase stationnaire (P_{xyl1}).

Nous avons ensuite mesuré la luminescence produite au cours du temps par les mêmes promoteurs mais fusionnés au gène de luciférase *luc*. Les données sont reprises à la Figure 22 pour la fusion P_{xyl1} -*luc* et à la Figure 23 pour la fusion P_{xyl2} -*luc*.

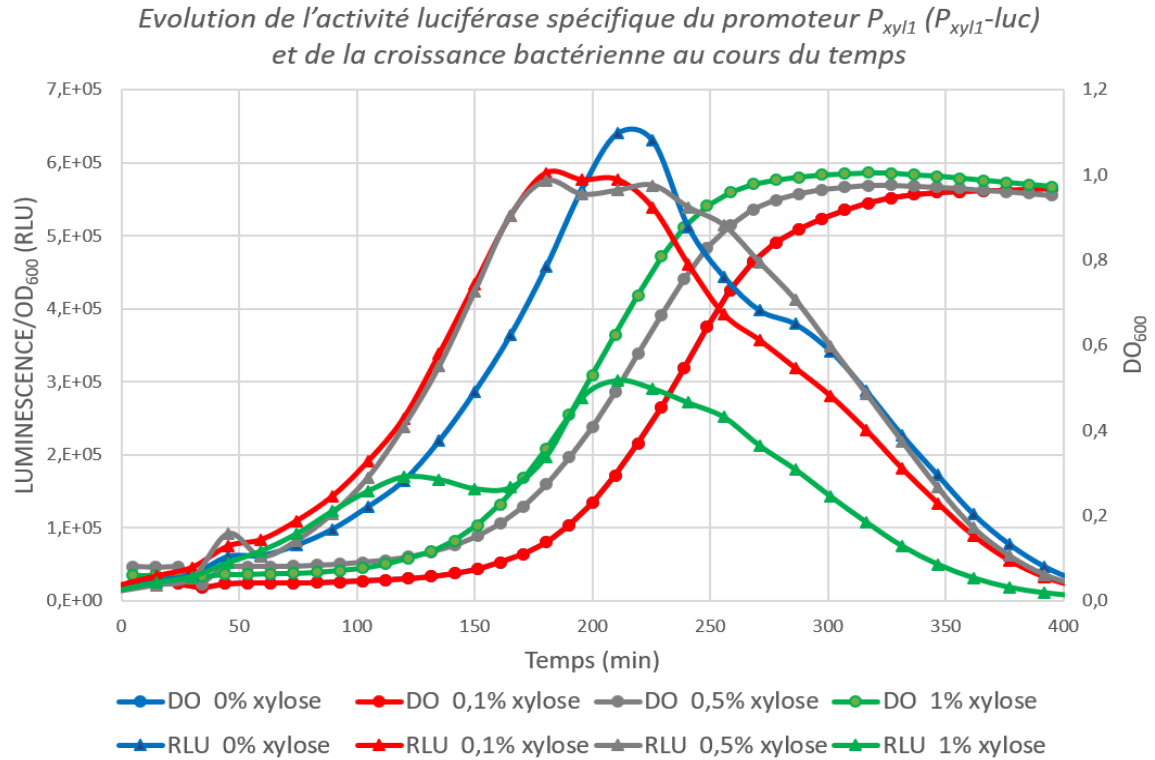


Figure 22 : Graphique de l'évolution de la luminescence spécifique (RLU/DO₆₀₀) associée à l'activation de P_{xyl1} fusionné au gène de luciférase luc et de la densité optique (DO₆₀₀) mesurées avec différentes concentrations en xylose.

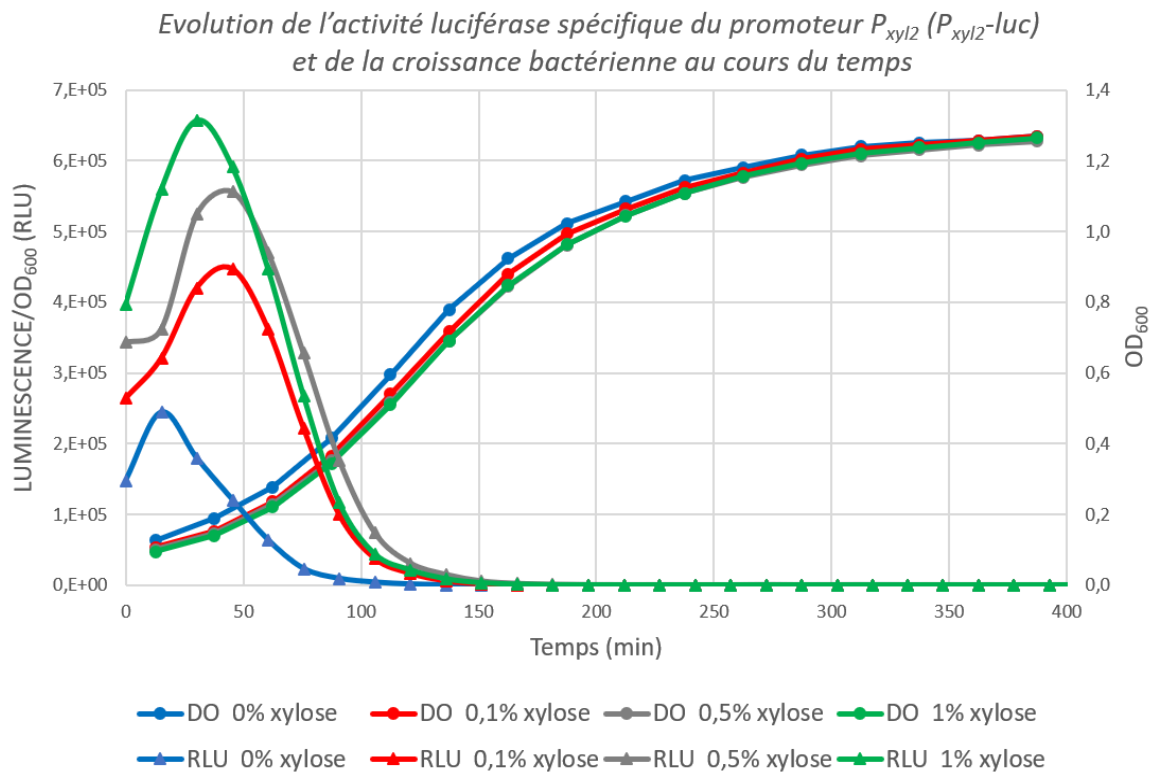


Figure 23 : Graphique de l'évolution de la luminescence spécifique (RLU/DO₆₀₀) associée à l'activation de P_{xyl2} fusionné au gène de luciférase luc et de la densité optique (DO₆₀₀) mesurées avec différentes concentrations de xylose.

Un premier commentaire peut être fait sur la dynamique des deux promoteurs P_{xyl1} et P_{xyl2} . Ceux-ci semblent avoir le même comportement avec le rapporteur *luc* qu'avec *luxAB*, P_{xyl1} étant peu contrôlé et P_{xyl2} répondant de manière progressive aux différentes concentrations en xylose.

En ce qui concerne la comparaison de dynamique entre les gènes *luxAB* et *luc*, il semble qu'il n'y ait pas de différences marquées entre leur expression au cours de la phase exponentielle. En effet, la luminescence produite pour les deux variants de luciférase diminue drastiquement dès la fin de la phase exponentielle pour P_{xyl1} et même dès le début de la phase exponentielle pour P_{xyl2} .

c. Mise en place d'un système de mutation aléatoire transpositionnelle pour l'identification de gènes impliqués dans le *shut off*

Grâce aux données présentées dans la section 1 des résultats, nous avons la confirmation qu'il existerait des gènes sous contrôle de ComX impliqués dans le *shut-off*. Toutefois, il est aussi possible que d'autres gènes non-régulés par ComX puissent aussi être impliqués dans le *shut-off*. Afin de réaliser un criblage sur tous les gènes du génome de *Ssa*, un système de mutagenèse aléatoire couvrant l'entièreté du génome est nécessaire. Nous avons décidé d'utiliser un système de mutagenèse transpositionnelle via le plasmide pKrmIt basé sur un transposon de la famille mariner (Figure 24).

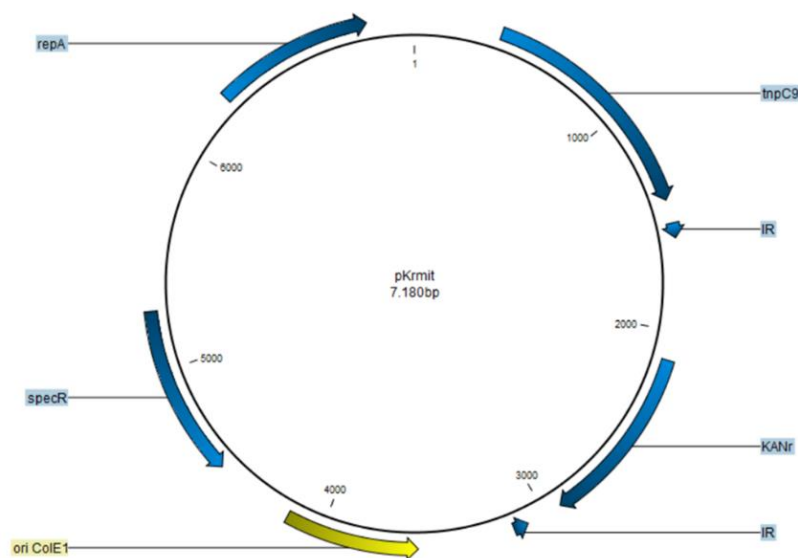


Figure 24 : Schéma représentant le plasmide pKrmIt. Il comprend une origine de réplication de *E.coli* (ColE1), une origine de réplication thermosensible chez *Ssa* (*repA*), une transposase sous contrôle d'un promoteur constitutif (*tnpC9*) et enfin KAN^R et $spec^R$: un gène de résistance à la kanamycine et à la spectinomycine, respectivement (Breton & McIver, 2013). Il est à noter que le mini-transposon porté par le plasmide comprend le gène de résistance à la kanamycine ($IR-KAN^R-IR$).

pKrmIt est un plasmide à faible nombre de copie. Nous avons choisi d'utiliser un plasmide à faible nombre de copie afin de diminuer la probabilité d'insertions multiples du transposon dans la bactérie. Il possède également une origine de réplication thermosensible qui nous permet de curer les bactéries de ce plasmide. Ce plasmide possède une transposase qui agit en « *cut and paste* » c'est-à-dire qu'il ne peut y avoir qu'une seule insertion dans le génome par copie de plasmide donneur. Finalement, il possède deux cassettes de résistance : une résistance à la streptomycine pour maintenir le plasmide et une résistance à la kanamycine entre les IR pour sélectionner les bactéries possédant l'insertion du mini-transposon.

Le criblage via mutagenèse par transposition aléatoire s'effectue en cinq étapes :

- La transformation qui permet le transfert du plasmide.

- La transposition au cours de laquelle le mini-transposon s'insère de manière aléatoire dans le génome pour produire une mutation (Figure 25).
- Le criblage qui permet de sélectionner les mutants intéressants pour le phénotype de *shut-off* (déficience pour l'arrêt de la compétence).
- Le séquençage qui permet d'identifier le gène inactivé par la mutation (Figure 30).
- Une complémentation du gène inactivé.

Les quatre premières étapes ont fait l'objet d'une optimisation durant ce mémoire.

i. Transformation

Pour transférer le plasmide chez *Ssa*, nous avons utilisé la transformation naturelle. La transformation a été obtenue via l'ajout de XIP durant le début de la phase exponentielle. Une fois la phase stationnaire atteinte, un étalement sur boîte kanamycine et spectinomycine a été effectué pour sélectionner les bactéries transformées. On a ensuite laissé pousser pendant 36h pour obtenir des colonies suffisamment grosses que pour pouvoir les repiquer. Au-delà de 36 heures, il semble que le plasmide ait un effet toxique sur les cellules car leur repiquage devient impossible (absence de croissance). Le plasmide étant thermosensible, il est important de faire toutes ces manipulations à 30°C. Etant donné l'instabilité des souches portant le plasmide, l'étape de sélection des transposants doit être réalisée rapidement.

ii. Transposition

Durant cette étape, on a laissé la transposase intégrer le mini-transposon contenant la cassette kanamycine de manière aléatoire dans le génome (Figure 25). Le plasmide a ensuite été curé via augmentation de la température. Pour ce faire, les bactéries ont été incubées sur milieu solide kanamycine pendant 4 h à 30°C. Les bactéries ont ensuite été placées à 40°C pendant 7h. Il est à noter que les tests réalisés sur cette étape ont montré qu'une température de 42°C était létale pour les cellules et une température de 38°C n'était pas suffisante pour curer le plasmide (données non-montrées). Un curage à 40°C pendant plus de 8 heures est aussi létal pour les cellules (données non-montrées). Une fois cette étape terminée, les colonies ont été récoltées et resuspendues dans du PBS, homogénéisées et stockées à -80°C pour l'étape suivante de criblage.

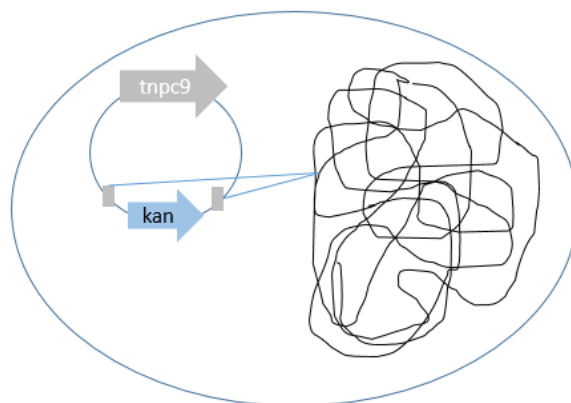


Figure 25 : Schéma représentant le plasmide pK_{mit} présent en une copie dans *Ssa*. Puisque le système est de type « cut and paste », la transposase *tnpc9* intègre une seule fois la cassette de résistance à la kanamycine dans un locus aléatoire du génome.

iii. Criblage

Pour pouvoir sélectionner les bactéries sur lesquelles la mutation toucherait un gène du *shut-off*, trois promoteurs différents (P_{comX} , P_{comS} et P_{comGA} (Figure 17)) ont été utilisés. Les promoteurs de *comS* et *comX* ont été choisis pour mesurer l'effet sur la phase précoce tandis que le promoteur de *comGA* a été sélectionné pour représenter la phase tardive. Pour pouvoir observer les effets à des moments différents de la compétence, les promoteurs ont été couplés au gène rapporteur *lacZ* (bêta-galactosidase). Toutefois avant de faire cela, nous avons délété le gène *lacZ* qui se trouvait déjà dans le chromosome de la bactérie. Cette délétion préalable est nécessaire pour éviter une activité bêta-galactosidase qui ne serait pas associée à l'activation des promoteurs de la compétence.

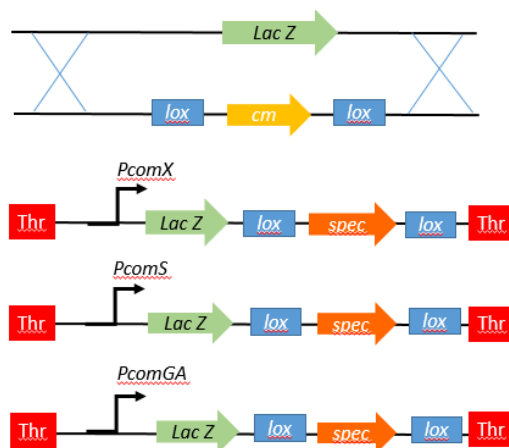


Figure 26 : Schéma de la délétion de *lacZ* et des différents rapporteurs utilisés pour l'expérience. Les flèches vertes représentent le gène *lacZ*, la flèche jaune représente le gène de résistance au chloramphénicol, la flèche orange représente le gène de résistance à la spectinomycine. Quant aux flèches noires, elles représentent le promoteur de trois gènes actifs dans la compétence (*comX*, *comS* et *comGA*). Les carrés bleus représentent des régions possédant des répétitions directes qui permettent d'exciser la cassette de résistance si besoin. Finalement les carrés rouges représentent des portions du locus thréonine entre lesquels la construction a été intégrée.

Afin de valider notre méthode de criblage, nous avons produit des contrôles (Tableau 13). Puisque *comX* et *comS* sont activés par le complexe ComRS, nous avons réalisé une fusion de *comR* avec P_{xylZ} afin de pouvoir générer un gradient d'activation de la compétence et de voir si ce gradient pouvait se traduire en phénotype « bleu » plus ou moins fort sur boîte grâce à l'activité bêta-galactosidase d'hydrolyse du X-gal. De plus, nous avons réalisé un mutant de *comR* ($\Delta comR$) que nous avons introduit dans les souches $P_{comX}-lacZ$ et $P_{comS}-lacZ$. Pour *comGA* qui est activé par ComX, nous avons décidé de déléter *comX* ($\Delta comX$, contrôle négatif) ou *clpC* ($\Delta clpC$, contrôle positif) qui encode une sous-unité du complexe protéolytique responsable de la dégradation de ComX (Figure 27).

Tableau 13 : Constructions génétiques réalisées pour les contrôles positifs et négatifs des trois rapporteurs *lacZ*

	Contrôle +	Contrôle -
$P_{comX}-lacZ$	$P_{xylZ}-comR$	$\Delta comR$
$P_{comS}-lacZ$	$P_{xylZ}-comR$	$\Delta comR$
$P_{comGA}-lacZ$	$\Delta clpC$	$\Delta comX$

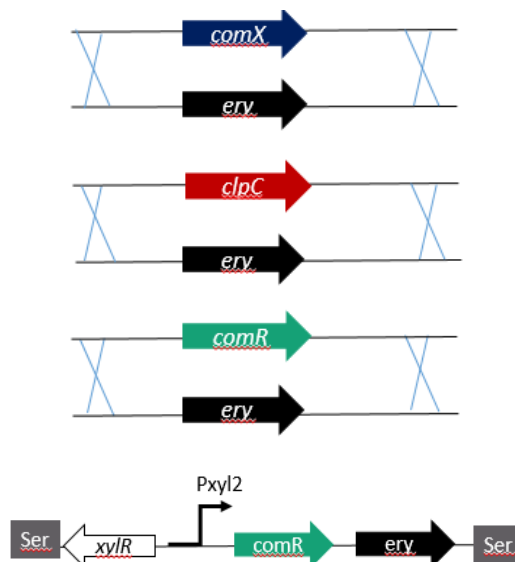


Figure 27: Schéma des délétions de *comX*, *clpC*, *comR* et du système d'expression contrôlée de *comR* par induction au xylose. La flèche bleue représente le gène *comX*, la flèche rouge représente le gène *clpC*. La flèche blanche représente le répresseur de l'opéron xylose (*xylR*), la flèche verte représente le gène *comR* et la flèche noire le gène de résistance à l'érythromycine. Quant à la petite flèche noire, elle représente le promoteur inducible au xylose P_{xyl2} . Finalement les carrés gris représentent des portions du locus ARNt sérine entre lesquels la construction a été intégrée.

1. Criblage par nuance de bleu

Ensuite, différents milieux ont été testé pour obtenir la plus grande variation de bleu possible entre les contrôles positifs et négatifs (Tableau 14). Dans cette expérience, nous avons utilisé du XIP₅ a (entre 0 et 1 μ M) pour faciliter l'activation de la compétence et permettre à des mutants déficients pour le *shut-off* de montrer un phénotype bleu foncé. Nous avons aussi utilisé de l'IPTG (analogue non-métabolisable du lactose) pour faciliter le transport du X-gal par *Ssa*.

Tableau 14 : Tableau des différentes conditions testées pour les milieux de criblage au X-gal.

Glucose (%)	0		0,5		1
Lactose (%)	0		0,5		1
XIP ₅ (μ M)	0	0,25	0,5	0,75	1
IPTG (mM)	0			0,1	

Ces différentes concentrations ont été testées dans toutes les combinaisons possibles avec les contrôles négatifs et positifs du Tableau 13. Après ce test, nous avons choisi de travailler avec un milieu M17-0,5% glucose-0,5 μ M XIP₅-0,1 mM IPTG-100 mg/l X-gal qui permettait de distinguer facilement les contrôles négatifs des positifs.

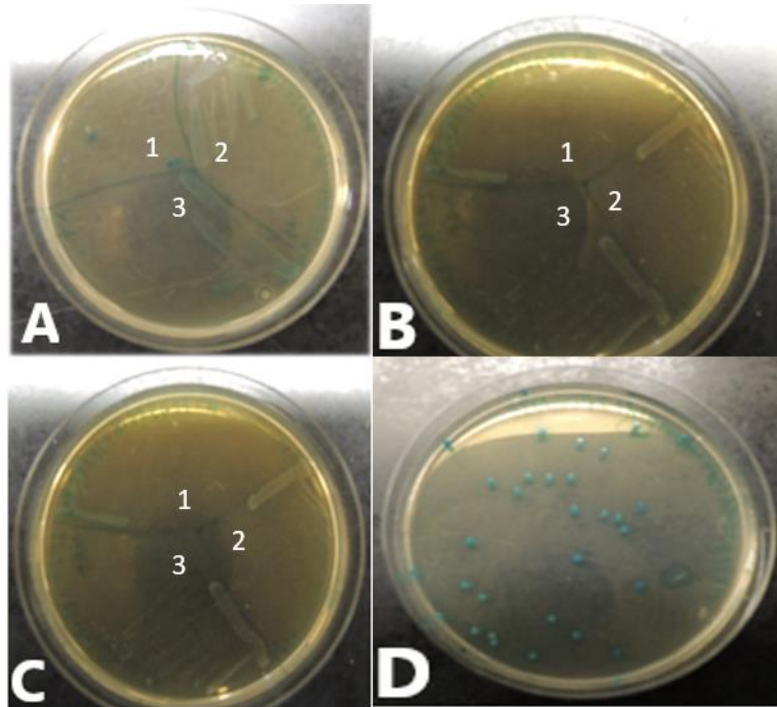


Figure 28 : Photo de boîtes de Petri M17-0,5% glucose-0,1 mM IPTG-100 mg/l X-gal. **A. Souche P_{comGA} -lacZ** : **A1.** P_{comGA} -lacZ « WT », **A2.** Contrôle négatif ($\Delta comX::ery$), **A3.** Contrôle positif ($\Delta clpC::ery$). **B. Souche P_{comS} -lacZ + xylose 1%** : **B1.** Contrôle positif (P_{xyI2} -comR), **B2.** P_{comS} -lacZ « WT », **B3.** Contrôle négatif ($\Delta comR$). **C. Souche P_{comX} -lacZ + xylose 1%** : **C1.** Contrôle positif (P_{xyI2} -comR), **C2.** P_{comX} -lacZ « WT », **C3.** Contrôle négatif ($\Delta comR$). **D. Transposants Kan^R de P_{comX} -lacZ + XIP₅ 0.5 μ M.**

Les différents clichés de la Figure 28 montrent que les contrôles négatifs et les clones sans mutation et sans XIP sont blancs. Ces résultats sont logiques car ces souches ne doivent pas exprimer *lacZ* dans ces conditions. Nous pouvons également constater que les contrôles positifs sont bleus. Et que les colonies isolées sont plus bleues que les cellules qui poussent en masse dans la strie.

2. Criblage via auxotrophie

En parallèle du criblage X-gal, une sélection via la capacité à pousser sur un milieu CDM-1% lactose a été testée.

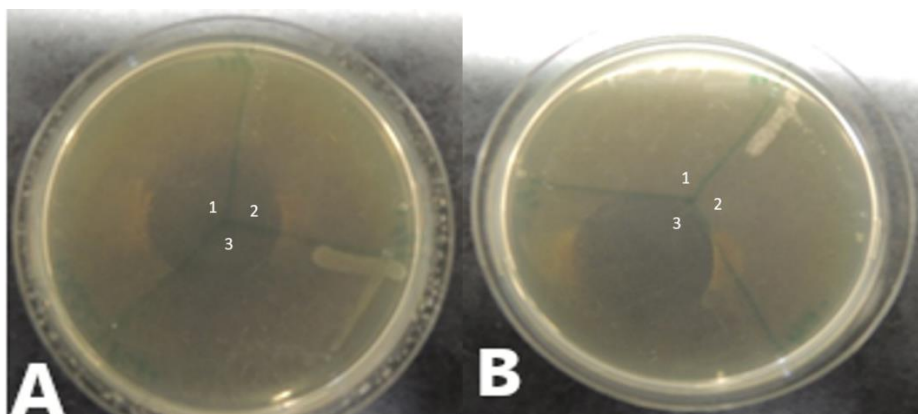


Figure 29 : Photos de boîte de Petri CDM-1% lactose. **A. Souche P_{comGA} -lac-Z** : **A1.** P_{comGA} -lacZ « WT », **A2.** Contrôle négatif ($\Delta comX$), **A3.** Contrôle positif ($\Delta clpC$) **B. P_{comX} -lacZ + xylose 1%** : **B1.** P_{comX} -lacZ « WT », **B2.** Contrôle positif (P_{xyI2} -comR) **B3.** Contrôle négatif ($\Delta comR$).

Les différents clichés de la Figure 29 nous montrent que seuls les contrôles positifs sont capables de pousser dans le milieu CDM-1% lactose. La sélection est donc très stricte et seul les clones avec une délétion dans des gènes impliqués dans le *shut-off* seraient en mesure de pousser.

Après avoir vérifié la croissance des contrôles positifs et l'auxotrophie des contrôles négatifs, nous avons étalés sur ces boîtes nos mutants de transposition aléatoire. Malheureusement, aucune colonie n'a pu être observée.

iv. Caractérisation des insertions

Maintenant que nous avons validé notre système de criblage, il faut pouvoir déterminer où a été inséré le mini-transposon porteur de la cassette kanamycine. Comme nous ne voulons pas séquencer le génome complet de chaque clone, on va devoir générer des produits PCR couvrant la cassette de résistance à la kanamycine et se prolongeant dans le locus d'insertion de *Ssa*. Etant donné que nous ne connaissons pas le locus d'insertion, nous avons utilisé une amorce dégénérée capable de s'hybrider de manière aléatoire (Figure 30).

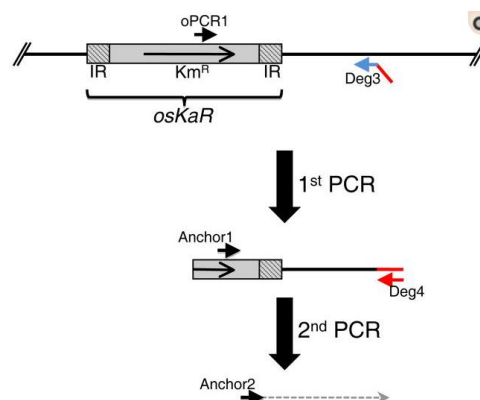


Figure 30 : Schéma des deux PCR successives à effectuer pour pouvoir amplifier l'ADN joutant l'insertion de la cassette kanamycine. Les amorces oPCR1, Anchor1 et Anchor2 sont des oligonucléotides classiques qui s'hybrident dans le gène de résistance à la kanamycine. L'amorce Deg3 possède une partie aspécifique qui se fixe n'importe où dans le génome et une queue flottante. Deg4 est une amorce classique qui se fixe sur la queue flottante de Deg3 (Le breton, 2013).

La difficulté de cette PCR réside dans l'hybridation de Deg3 car il doit se lier sur le gène inactivé à identifier. Il est à noter que l'amorce dégénérée est beaucoup plus courte qu'une amorce classique pour pouvoir se fixer dans tout le génome de manière aspécifique. Après quelques ajustements de température, de temps et de polymérase, on est parvenu à avoir nos premiers « smears » (Tableau 11).

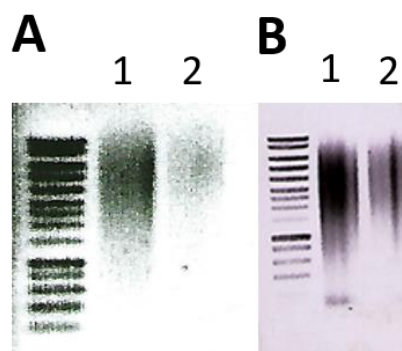


Figure 31 : Photos des gels d'agarose sur lesquels une migration des produits PCR a été réalisée. **A.** Amplification PCR 1 effectuée sur deux clones différents. **B.** Amplification PCR 2. Les 2 puits contiennent la deuxième PCR effectuée sur les 2 produits PCR de l'étape précédente.

Les résultats obtenus avec la première PCR sont des « *smears* » comme attendu car l'amorce dégénérée peut se fixer n'importe où et de cette façon générer des tailles de fragment différents (Figure 31A). Après avoir effectué la deuxième PCR, la migration sur gel donne toujours un « *smear* » comme attendu (amplification de différentes tailles de fragments) (Figure 31B).

L'envoi au séquençage de ces fragments n'a pas permis d'obtenir de séquence. Une première hypothèse qui pourrait expliquer ce résultat serait que nous n'avons pas réussi à intégrer la cassette kanamycine dans le chromosome de nos clones (ex. mutants spontanés de résistance à la kanamycine). Pour vérifier cela, nous avons réalisé une PCR plus classique sur nos clones pour amplifier uniquement le gène de résistance à la kanamycine (Figure 32 et Figure 33). Pour cela, nous avons utilisé les oligonucléotides ML17 et ML18 (Tableau 3)

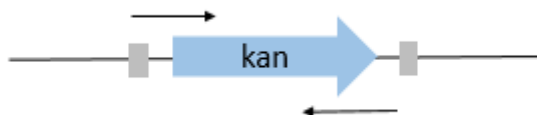


Figure 32 : Schéma de PCR classique pour vérifier la présence de la résistance à la kanamycine. La flèche bleue représente le gène de résistance à la kanamycine et les rectangles gris représentent les IR.

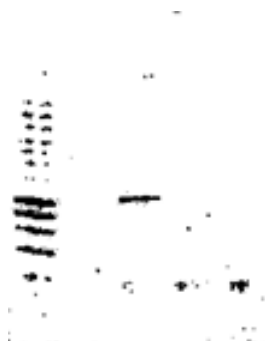


Figure 33 : Photo du gel d'agarose sur lequel une migration du produit PCR d'amplification de la cassette kanamycine a été réalisée (avec les amorces ML17 et ML18). Un fragment de la taille attendue est observable à 1 kb.

Nous avons constaté que nos clones avaient effectivement intégré la cassette de résistance à la kanamycine (Figure 33). Dès lors, le problème ne venait peut-être pas de nos clones mais de la méthode PCR. Pour vérifier notre méthode, nous avons créé des clones dans lesquels nous avons inséré la cassette de résistance par transformation naturelle, soit dans le locus ARNt sérine ou soit dans le locus ARNt thréonine (Figure 34).

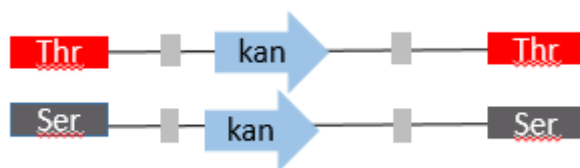


Figure 34 : Schéma d'intégration de la cassette de résistance à la kanamycine dans le locus tRNA sérine ou thréonine. La flèche bleue représente le gène de résistance à la kanamycine et les rectangles gris représentent les IR.

Nous avons ensuite recommencé les PCR à amorce aléatoire sur ces clones. De la même façon que précédemment, nous avons obtenu des « smears » impossibles à séquencer. En parallèle, la même méthode PCR a été testée sur le plasmide pKmit afin de servir de contrôle positif (Figure 35), mais une fois de plus le séquençage n'a pas donné les résultats attendus.

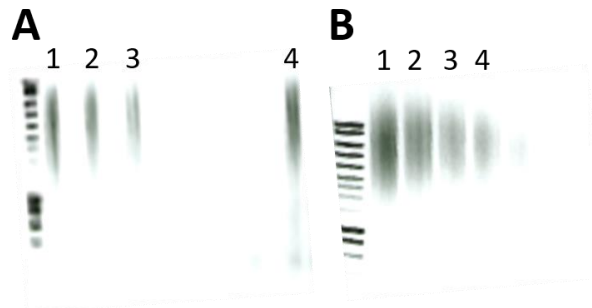


Figure 35 : Photo du gel d'agarose sur lequel une migration de produits PCR aléatoires d'amplification de la cassette kanamycine a été réalisée. **A.** PCR1 sur des clones possédant la cassette de résistance kanamycine dans le locus ARNt serine (bande 2) ou thréonine (bande 3). La bande 1 provient d'une PCR faite directement sur le plasmide pKmit. **B.** PCR2 effectuée sur les produits PCR de l'étape précédente.

Nous avons alors décidé de changer les amorces pour essayer d'obtenir des produits PCR positifs en séquençage. L'amorce dégénérée (Deg3) a été remplacée par un mix contenant 4 amorces. Chacune de ces amorces est composée d'une partie dégénérée de 10 nucléotides comme pour Deg3 mais son extrémité 3' contient un pentanucléotide particulier. Celui-ci est un des quatre pentanucléotides le plus fréquemment retrouvé dans le génome de *Ssa* (voir matériel et méthode pour les détails).

Nous avons directement testé les PCR sur les clones possédant la cassette de résistance insérée dans le locus ARNt sérine ou thréonine et après quelques ajustements de temps et de température, nous avons pu obtenir des produits PCR positifs en séquençage (Figure 36).

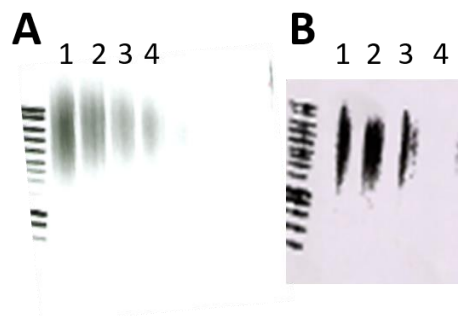


Figure 36 : Photo du gel d'agarose sur lequel une migration de produits PCR aléatoires d'amplification de la cassette kanamycine a été réalisée avec des amorces contenant des séquences de pentanucléotides fréquemment retrouvés dans le génome de *Ssa*. **A.** PCR1 sur des clones possédant la résistance kanamycine dans le locus ARNt serine (2,3) ou thréonine (4). La bande 1 provient d'une PCR faite directement sur le plasmide pKmit. La PCR est réalisée avec les amorces oPCR1 et le mix de 4 amorces avec pentanucléotides. **B.** PCR2 effectuée sur les produits PCR de l'étape précédente avec les amorces Anchor1 et Deg4.

Après avoir réussi à obtenir un séquençage sur les produits PCR des insertions au locus ARNt serine et thréonine, nous avons tenté de transférer la technique à des transposants aléatoires mais nous n'avons pas pu obtenir de produits PCR positifs en séquençage.

Nous avons alors investigué si ce résultat négatif ne provenait pas des clones eux-mêmes et non pas d'un problème d'ordre technique. Comme nous nous étions assurés par PCR qu'ils avaient tous une

insertion de la cassette kanamycine, nous en avons déduit qu'il pouvait y en avoir plusieurs. Nous avons donc cherché une technique pour isoler chaque insertion dans un clone séparé.

Pour ce faire, nous avons purifié l'ADN de nos mutants aléatoires et nous l'avons digéré avec des enzymes de restriction (BamI, Bsp1286I ou NspI) (Figure 37). Nous avons choisi ces enzymes car leur motif de reconnaissance était fort récurrent dans l'ADN de la bactérie (environ tous les 1000 pb) mais qu'il n'était pas présent dans le min-transposon. Ensuite nous avons choisi des enzymes capables de couper une seule fois dans le plasmide pUC18 (Figure 39) et pour lesquels les extrémités obtenues étaient compatibles avec les extrémités obtenues sur l'ADN chromosomique.

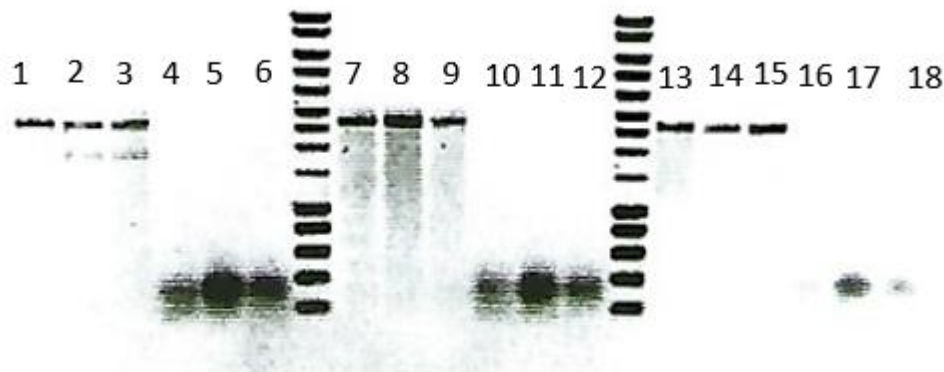


Figure 37 : Photo du gel d'agarose sur lequel une migration des produits de digestion enzymatique. Les puits 1, 2 et 3 contiennent le plasmide pUC18 digéré par KpmI, 4, 5 et 6 l'ADN digéré par BamI, 7, 8 et 9 pUC18 digéré par SacI, 10, 11 et 12 l'ADN digéré par Bsp1286I, 13, 14 et 15 pUC18 digéré par SphI et 16, 17 et 18 l'ADN digéré par NspI.

Après cela, nous avons effectué une ligation pour insérer les fragments d'ADN chromosomique dans le plasmide. Ensuite, nous avons effectué une électroporation afin de transférer le mélange de ligation (pUC18 + ADN de *Ssa*) dans *E. coli*. Finalement, nous avons sélectionné les transformants sur LB + kanamycine. Nous n'avons malheureusement obtenu aucun transformant. En revanche, les contrôles sans sélection kanamycine mais avec sélection ampicilline (cassette de résistance initialement présente sur le pUC18) ont parfaitement poussé, ce qui suggère que la ligation a bien pris place (Figure 39).

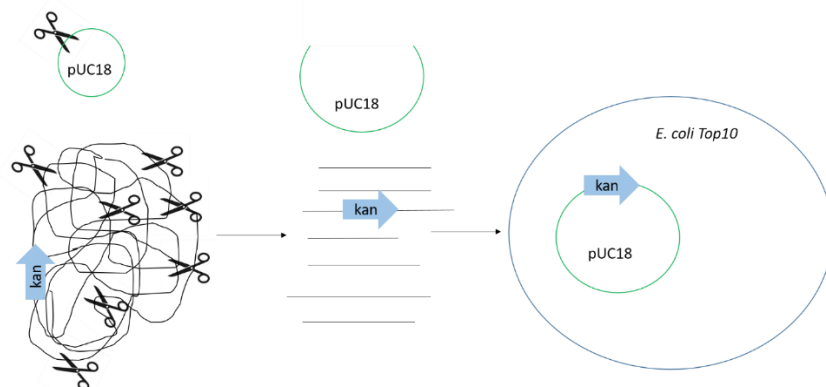


Figure 38 : schéma de clonage des fragments chromosomiques porteurs du mini-transposon. Le chromosome de *Ssa* est digéré via restriction et inséré dans un plasmide pUC18. Les produits de ligation sont ensuite transformés dans *E. coli* via électroporation et les clones sont sélectionnés sur milieu LB + kanamycine. La flèche bleue correspond à la cassette de résistance à la kanamycine présente dans le transposon du pKrmI, les ciseaux représentent la digestion via enzyme de restriction.

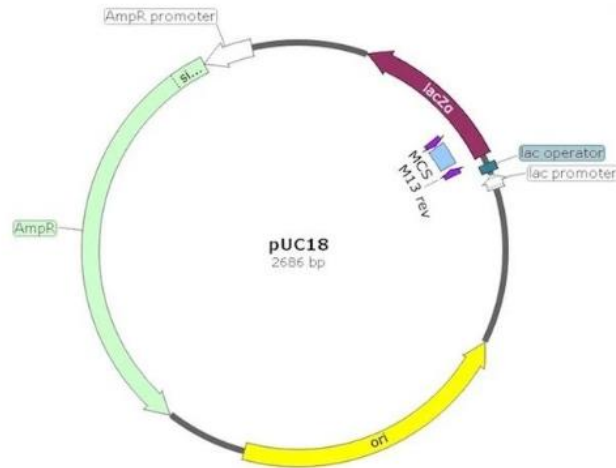


Figure 39 : Schéma du plasmide pUC18. Il comprend ori : son origine de réplication, le gène *lacZ* dans lequel on trouve la zone de restriction pour le clonage (MCS) et enfin *Amp^R* : le gène de la résistance à l'ampicilline.

La Figure 40 montre une boîte LB + ampicilline + X-gal sur laquelle on peut constater la présence de colonies. Mais on remarque également que les clones sont bleus, ce qui indique que le gène *lacZ* est intègre. Etant donné que les fragments du chromosome de *Ssa* doivent s'insérer dans le gène *lacZ*, ceci nous indique qu'aucun fragment n'a été cloné dans le plasmide. Ceci pourrait être dû à une mauvaise digestion de l'ADN chromosomique ou à une dégradation des produits de restriction. Etant donné que nous avons amplifié les plasmides via PCR et traité ensuite les plasmides via DpnI (digestion des plasmides méthylés) il est peu probable que les transformants observés proviennent d'ADN plasmidique non digéré issu de la mini-préparation.

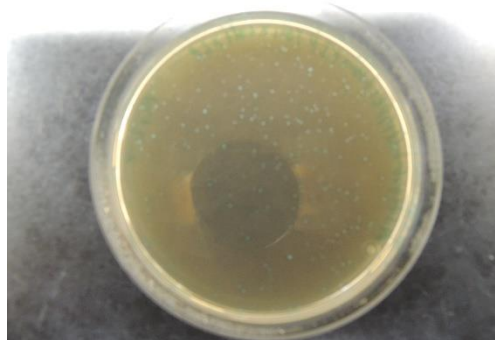


Figure 40 : photo de boîte de Petri LB ampicilline X-gal. Les bactéries sur cette boîte sont *E. coli* dans lesquelles on a transformé le produit de ligation du pUC18 linéarisé + ADN chromosomique de *Ssa* digéré avec la même enzyme.

Une dernière méthode a été tentée afin d'identifier les loci d'insertion des transposons dans *Ssa*. Afin de limiter le nombre d'insertions multiples qui pourraient interférer avec le bon déroulement du séquençage, nous avons réalisé une *back-transformation*. Nous avons de nouveau utilisé l'ADN de nos mutants aléatoires, mais cette fois-ci, nous n'avons pas digéré l'ADN chromosomique et nous nous en sommes directement servis pour transformer *Ssa* (via transformation naturelle). Cette méthode permet de limiter le nombre d'insertion de la cassette Kan^R par clone. La transformation a fonctionné et nous avons pu isoler certains clones sur lesquels nous avons tenté d'identifier le locus d'insertion du transposon via la méthode de PCR aléatoire (amorces pentanucléotides) (Figure 41).

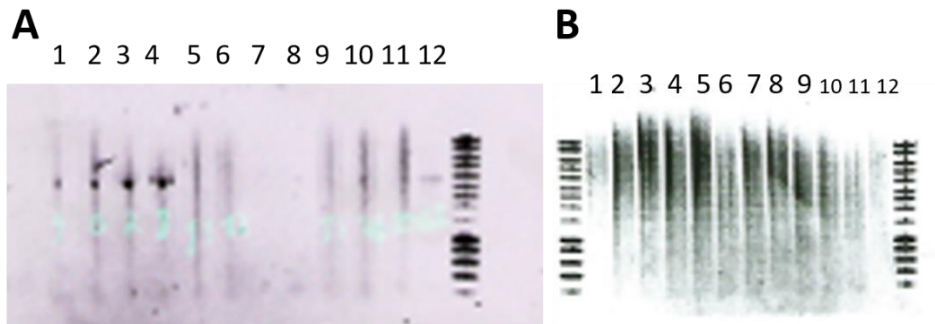


Figure 41 : Photo de gels d'agarose sur lesquels une migration de produits PCR aléatoires d'amplification de la cassette kanamycine a été réalisée avec des amorces contenant des séquences de pentanucléotides fréquemment retrouvé dans le génome de *Ssa*. **A.** PCR1 sur des clones aléatoires. La bande 1 provient d'une PCR faite directement sur le plasmide pK_{mit}. La PCR est réalisée avec les amorces oPCR1 et le mix de 4 amorces avec pentanucléotides. **B.** PCR2 effectuée sur des produits PCR de l'étape précédente avec les amorces Anchor1 et Deg4.

Malheureusement, ces amplifications PCR n'ont pas généré de séquences exploitables. Par faute de temps, l'expérimentation pour identifier des évènements de transposition via pK_{mit} s'est arrêté à ce stade.

4. DISCUSSION

Le premier résultat intéressant obtenu lors de ce mémoire est la caractérisation de l'effet du régulon de ComX sur le *shut-off*. Les données précédentes obtenues chez *Sth* montrant la présence d'une boucle de rétroaction négative issue de la phase tardive sont donc également validées pour l'espèce *S. salivarius* (*Ssa*) (Haustenne et al., 2015).

Etant donné que *Ssa* n'active pas la compétence de manière constitutive en conditions de laboratoire et que nous voulions étudier l'arrêt de la compétence, il nous fallait travailler dans des conditions qui active celle-ci. Or la surexpression de *comS* n'a pas d'effet sur le système contrairement à l'ajout de XIP dans le milieu (donnée non publiées, Adrien Knoops). Une autre façon de forcer l'activation est de surexprimer le récepteur intracellulaire ComR. Nous avons donc testé ces deux types d'induction afin d'observer l'effet de la délétion de *comX* sur la transcription de *comS* et *comR*. Alors que la délétion de *comX* semble peu influencer la transcription de *comR* pour les deux types d'induction (Figure 15 et 18), on observe une différence notable de la délétion sur l'expression de *comS* pour les deux types d'induction (Figure 14 et 17). Afin de retenir le résultat le plus pertinent, nous devons nous demander quel type d'induction est le plus proche des réalités physiologiques naturelles. Nous n'avons malheureusement aucune donnée de quantification de la concentration en XIP dans des conditions naturelles pour savoir si celle imposée par l'ajout de XIP_s est pertinente. Bien que des concentrations de l'ordre du micromolaire aient été mesurées chez des espèces proches (Ricomini Filho, Khan, Åmdal, & Petersen, 2019), l'identification récente d'un régulateur transcriptionnel de ComR chez *Ssa* permettant d'induire la compétence via une augmentation du niveau basal de ComR suggère que ce mode d'activation serait préférentiel (A. Knoops et al., manuscrit en préparation). Aussi, puisque certaines données (A. Knoops, données non-publiées) suggèrent que le *shut-off* prendrait place via la dégradation de ComS/XIP, un ajout de XIP_s pourrait entraîner une saturation de l'activité peptidase et interférer avec le mécanisme naturel d'extinction de la compétence. Pour ces deux raisons, nous préférons interpréter les résultats issus de l'induction via surexpression de ComR.

Ces résultats (Figure 17 et Figure 18) suggèrent que seule la transcription de *comS* est significativement impacté par la délétion de *comX*. Or *comS* est activé par ComRS, ce qui n'est pas le cas de *comR*. Ceci nous laisse penser que le *shut-off* agirait sur ComRS de manière post-traductionnelle ou bien directement sur l'expression de *comS*. Pour vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de réaliser l'expérience avec un rapporteur P_{comX} car celui-ci est également régulé positivement par ComRS. Le mode d'inhibition du complexe ComRS pourrait être de différents types. Il pourrait s'agir d'une inhibition compétitrice comme dans la cas du peptide XrpA chez *S. mutans* (J. Kaspar, 2016) ou Prx chez *S. pyogenes* (Mashburn-Warren et al., 2018). Une autre possibilité est une séquestration du complexe ComRS comme chez *S. pneumoniae* via DprA. Une autre possibilité est une dégradation du complexe similaire à celle observée sur ComX via l'inhibition de ComW chez *S. pneumoniae* (Piotrowski et al., 2009). Pour vérifier ces hypothèses, nous pourrions faire du *cross-linking in vivo* afin de co-immuno-précipiter les interactants qui interagissent avec ComRS. Cette technique a d'ailleurs permis d'identifier XrpA chez *S. mutans* (J. Kaspar, 2016). Une autre approche serait de réaliser un criblage avec une mutagenèse aléatoire sur l'entièreté du génome. Cela permettrait d'étudier des gènes actifs dans le *shut-off* sans que ce soit forcément ceux qui agisse sur

ComRS directement. De fait, on peut supposer que comme le *shut-off* de *S. pneumoniae*, celui de *S. salivarius* possède plusieurs acteurs agissant à des niveaux différents. Particulièrement, des données récentes obtenues sur l'activité de peptidases de dégradation de XIP sous contrôle de ComX suggèrent que plusieurs mécanismes seraient possibles (A. Knoop, données non publiées).

Un autre objectif de ce mémoire était de développer des outils fonctionnels en phase stationnaire pour étudier les mécanismes de *shut-off*. Que ce soit la luciférase bactérienne (LuxAB) ou celle de la luciole (Luc), aucune des deux luciférases n'a maintenu son activité durant la phase stationnaire. Une partie de l'explication réside dans leur utilisation de cofacteurs (ATP pour Luc et FMNH₂ pour LuxAB). En effet, la concentration de ces deux cofacteurs va diminuer dès l'entrée en phase stationnaire et limiter la réaction de production de lumière.

Une autre possibilité expliquant la chute rapide de la luminescence des deux systèmes rapporteurs pourrait être le choix des promoteurs P_{xy11} et P_{xy12}. En effet, ces promoteurs sont issus du métabolisme du xylose (absent chez *Ssa*) mais qui pourraient être réprimés en phase stationnaire (ex. inhibition du transport du xylose). La fusion d'un autre promoteur plus indépendant du métabolisme de l'hôte aux deux rapporteurs pourrait peut-être permettre de mieux distinguer l'activité des deux systèmes. Finalement, d'autres rapporteurs actifs en phase stationnaire tels que la GFP pourraient être testés pour l'étude du *shut-off*.

L'optimisation d'une méthode de mutagenèse aléatoire via transposition réalisée lors de ce mémoire a montré que cette approche était applicable à *Ssa* mais que certaines difficultés devaient être contournées. Tout d'abord, il est à noter que la production du plasmide pKmit via sa purification dans *E. coli* n'est pas toujours évidente à réaliser étant donné le caractère instable du plasmide. En effet, la transposase est sous contrôle d'un promoteur constitutif et puisque le transposon est de type *cut & paste*, celui-ci peut à tout moment s'intégrer dans le génome de l'hôte avec une perte de la structure du plasmide natif. Une possibilité pour éviter ce genre de problème serait de préférer une transposase sous contrôle d'un promoteur inductible qui serait induit seulement lorsque le plasmide est transformé dans *Ssa*.

Une autre difficulté rencontrée pour l'utilisation du plasmide pKmit est la cassette de résistance *kan^R* présente sur le transposon. En effet, cet antibiotique n'est pas très adapté à *Ssa* car le MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) pour le WT est de 0.5 mg/ml alors que la souche possédant le gène de résistance *kan^R* présente un MIC de 1.5 mg/ml. Cette dernière concentration peut même diminuer en conditions de stress de température (40°C) nécessaire pour curer le plasmide. L'utilisation d'une autre cassette de résistance sur le mini-transposon permettrait de réduire facilement ce genre de problèmes.

Alors que le taux de transformation du plasmide dans *Ssa* ($1,5 \cdot 10^{-5}$) et le taux de transposition des transformants (100%, n=80) sont suffisants pour générer une banque d'insertion couvrant l'entièreté du génome (équivalent à une insertion tous les 250pb), nous n'avons pas réussi à déterminer si ces insertions étaient réellement aléatoires. Néanmoins, les PCR effectuées au sein du gène de

résistance à la kanamycine nous permettent d'être sûr que les transposants possèdent le transposon et ne sont pas des faux positifs.

Une partie importante de ce mémoire a donc été consacrée à optimiser une méthode d'identification des insertions dans *Ssa*. Alors qu'aucune amplification PCR n'était possible avec l'utilisation d'une polymérase à haute fidélité (Q5, NEB), l'utilisation d'une polymérase plus permissive (TaqPol) a permis d'obtenir des « *smears* », probablement grâce à une permissivité plus importante par rapport à l'amorce dégénérée.

Lorsque les amplifications PCR ont été obtenues, nous avons eu des difficultés à obtenir des séquençages de nos fragments. Puisque des amplifications PCR réalisées sur le plasmide et sur des sites d'insertions connus ne nous permettait pas non plus d'obtenir de séquençage, nous avons utilisé des amorces à pentanucléotides préférentiels, ce qui nous a permis d'obtenir des séquençages des insertions connues. Malheureusement, aucun séquençage d'insertions aléatoires n'a été obtenu. Une hypothèse pour expliquer cette différence est que chaque bactérie a plusieurs sites d'insertions ce qui rend la lecture du séquençage impossible car plusieurs chromatogrammes se superposent. Plusieurs stratégies ont été testées pour contourner ce problème (PCR inverse, *back-transformation*) mais aucune n'a été fructueuse. Une dernière possibilité non testée serait d'utiliser les amplifications PCR issues des transposants aléatoires et de les cloner via restriction dans un plasmide chez *E. coli*. La sélection sur milieu kanamycine permettrait d'obtenir des candidats ayant intégré la cassette de résistance *kan^R* ainsi que des portions adjacentes du génome de *Ssa*. De plus, l'utilisation de deux enzymes de restriction en simultané pour la digestion permettrait d'empêcher la recircularisation du plasmide.

Finalement, une autre possibilité serait d'utiliser un autre système de criblage pour lequel l'identification du locus d'insertion ou d'inhibition serait plus facile à identifier. Une possibilité serait d'utiliser un criblage via « *CRISPR interference* » (Cui et al., 2018). Cette méthode, basée sur l'utilisation d'un mutant catalytique de la protéine Cas9 couplé à une banque de guides aléatoires s'hybridant partout sur le génome de *Ssa*, permettrait d'obtenir une banque de mutants conditionnels aléatoires. Cette stratégie aurait un double avantage. D'une part, elle permettrait de contourner la toxicité potentielle liée à une absence de *shut-off* et d'autre part, elle permettrait d'identifier facilement le locus d'interférence, puisque les guides seraient insérés à un locus précis qu'il suffirait de séquencer. Cette méthode est actuellement à l'essai dans le laboratoire.

5. CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré lors de ce mémoire que le *shut-off* de la compétence chez *S. salivarius* est contrôlé, au moins en partie, par le régulon de ComX. Cette donnée est renforcée par des résultats similaires obtenus chez *S. thermophilus* (Haustenne et al. 2015).

En parallèle, une méthode de criblage via mutagenèse aléatoire a été adaptée pour *Ssa* et est fonctionnelle, bien que des difficultés techniques soient encore à résoudre pour caractériser les sites d'insertions du transposon.

Finalement, ce travail aura permis de mieux comprendre la régulation de la compétence chez *S. salivarius* et plus particulièrement sa désactivation ainsi que de développer des outils spécifiques à son étude.

6. Bibliographie

- Aziz, R. K., Edwards, R. A., Taylor, W. W., Low, D. E., McGeer, A., & Kotb, M. (2005). Mosaic prophages with horizontally acquired genes account for the emergence and diversification of the globally disseminated M1t1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*, 187(10), 3311–3318. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3311-3318.2005>
- Breton, Y. Le, & McIver, K. S. (2013). *Genetic manipulation of Streptococcus pyogenes (The Group A Streptococcus, GAS)*. *Current Protocols in Microbiology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09d03s30>
- Chandler, J. R., Hirt, H., Dunny, G. M., & Greenberg, E. P. (2005). A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0505545102
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241–249. <https://doi.org/10.1038/nrmicro844>
- Colmin, C., Pebay, M., Simonet, J. M., & Decaris, B. (1991). A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiology Letters*, 81(2), 123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04733.x>
- Cui, L., Vigouroux, A., Rousset, F., Varet, H., Khanna, V., & Bikard, D. (2018). A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04209-5>
- Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: Cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1185–1193. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2043>
- Fontaine, L., Wahl, A., Fléhard, M., Mignolet, J., & Hols, P. (2015). Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.010>
- Haustenne, L., Bastin, G., Hols, P., & Fontaine, L. (2015). Modeling of the ComRS signaling pathway reveals the limiting factors controlling competence in *Streptococcus thermophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01413>
- Håvarstein, L. S. (2010). Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*, 78(3), 541–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07380.x>
- J. Kaspar, S. Ahn, S. Palmer, S. Choi, M. Stanhope, R. B. (2015). A unique open reading frame within the comX gene of *Streptococcus mutans* regulates genetic competence and oxidative stress tolerance. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- J. Kaspar, R. S. and R. B. (2016). Competence Inhibition by 1 the XrpA Peptide Encoded Within the comX Gene of *Streptococcus mutans*. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Kenzaka, T., Tani, K., & Nasu, M. (2010). High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *The ISME Journal*, 4, 648–659. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.145>

- Marie, L., Rapisarda, C., Morales, V., Bergé, M., Perry, T., Soulet, A. L., ... Polard, P. (2017). Bacterial RadA is a DnaB-Type helicase interacting with RecA to promote bidirectional D-loop extension. *Nature Communications*, 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms15638>
- Martin, B., Soulet, A. L., Mirouze, N., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., Granadel, C., ... Claverys, J. P. (2013). ComE/ComE~P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence). *Molecular Microbiology*, 87(2), 394–411. <https://doi.org/10.1111/mmi.12104>
- Mashburn-Warren, L., Goodman, S. D., Federle, M. J., & Prehna, G. (2018). The conserved mosaic prophage protein paratox inhibits the natural competence regulator ComR in *Streptococcus*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34816-7>
- Mignolet, J., Fontaine, L., Kleerebezem, M., & Hols, P. (2016). Complete Genome Sequence of *Streptococcus salivarius* HSISS4, a Human Commensal Bacterium Highly Prevalent in the Digestive Tract. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01637-15>
- Mignolet, J., Fontaine, L., Sass, A., Nannan, C., Mahillon, J., Coenye, T., & Hols, P. (2018a). Circuitry Rewiring Directly Couples Competence to Predation in the Gut Dweller *Streptococcus salivarius*. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.055>
- Mignolet, J., Fontaine, L., Sass, A., Nannan, C., Mahillon, J., Coenye, T., & Hols, P. (2018b). Circuitry Rewiring Directly Couples Competence to Predation in the Gut Dweller *Streptococcus salivarius* Data and Software Availability GSE100416 GSE35849 Mignolet et al. *Cell Reports*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.055>
- Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A. L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., ... Claverys, J. P. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1219868110>
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Pié, O., McGovern, S., ... Claverys, J.-P. (2016). A Key Presynaptic Role in Transformation for a Widespread Bacterial Protein: DprA Conveys Incoming ssDNA to RecA. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.038>
- Moura De Sousa, J. A. (2017). Embracing the enemy: The diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer Article in *Current opinion in microbiology* . <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.010>
- Muyllaert, A., & Mainil, J. G. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : Les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Medecine Veterinaire*, 156(2), 109–123.
- Nicolas, G. G., & Lavoie, M. C. (2011). *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(1), 1–20. <https://doi.org/10.1139/W10-095>
- Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E., & Aas, J. A. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721>
- Piotrowski, A., Luo, P., & Morrison, D. A. (2009). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Termination of activity of the alternative sigma factor ComX is independent of proteolysis of ComX and ComW. *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3359–3366. <https://doi.org/10.1128/JB.01750-08>
- Ricomini Filho, A. P., Khan, R., Åmdal, H. A., & Petersen, F. C. (2019). Conserved Pheromone Production, Response and Degradation by *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Microbiology*,

10(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02140>

- Shi, K., Kent Brown, C., Gu, Z.-Y., Kozłowicz, B. K., Dunny, G. M., Ohlendorf, D. H., ... Greenberg, E. P. (2005). *Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgXpheromone complexes and regulation of conjugation in Enterococcus faecalis*. Retrieved from <http://cathwww.biochem.ucl.ac.uk>
- Sigve Havarstein, L., Coomaraswamy, G., & Morrisont, D. A. (1995). *An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae (ABC transporter/bacteriocin/peptide signal/comC gene)* (Vol. 92).
- Talagas, A., Fontaine, L., Ledesma-Garcia, L., Mignolet, J., Li De La Sierra-Gallay, I., Lazar, N., ... Nessler, S. (2016). Structural Insights into Streptococcal Competence Regulation by the Cell-to-Cell Communication System ComRS. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005980>
- Tunkel, A. R., & Sepkowitz, K. A. (2002). Infections Caused by Viridans Streptococci in Patients with Neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, 34(11), 1524–1529. <https://doi.org/10.1086/340402>
- Weng, L., Piotrowski, A., & Morrison, D. A. (2013). Exit from Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated at Multiple Levels. *PLoS ONE*, 8(5), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064197>
- Zaccaria, E., Wels, M., Baarlen, P. van, & Wells, J. M. (2016). Temporal regulation of the transformosome and competence development in *Streptococcus suis*. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01922>